

令和元年6月2日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11284

研究課題名(和文)テーラーメイド医療に向けた先天性視覚障害患者に対する診断プログラム開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development of diagnosis program and clinical application with congenital visual impairment patients for tailor-made medicine

研究代表者

細野 克博 (Hosono, Katsuhiko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60402260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Leber先天盲(LCA)は生後早期より高度に視力が障害される遺伝的異質性の高い疾患であり、最も重篤な遺伝性網膜変性疾患(IRD)である。本研究は日本人LCAの原因遺伝子の寄与を明らかにする為、収集した34家系の日本人LCAに対して既報のIRDの原因遺伝子74個を解析対象とした次世代シーケンサーによるターゲットシーケンス(TS)解析を実施した。結果、19家系の患児から原因変異を検出した。他人種のLCAの変異スペクトラムとは異なっていた。既知のIRD原因遺伝子のスクリーニングにより56%の日本人LCAの原因変異を同定した。日本人LCAの遺伝子診断にTS解析は有効な手段である事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Leber先天盲(LCA)は、生後早期より高度に視機能が障害される遺伝性網膜疾患である。LCAの原因遺伝子の同定は、予後の判定に重要である。2017年末にアメリカ食品医薬品局がLCAの原因遺伝子RPE65の遺伝子治療を承認し、患児らに希望を与える事になった。この遺伝子治療を受けるには原因遺伝子の特定が必須であり、遺伝子診断の重要性は増している。本研究では、日本人LCA 34家系の遺伝子診断を行い19家系の患児から原因変異の可能性が高い変異を検出した。今回検討した家系からはRPE65遺伝子治療に適応する患児は検出されなかったが、本研究の成果はわが国の今後の遺伝子治療を考える上で必要な情報である。

研究成果の概要(英文)：Leber congenital amaurosis (LCA) is a genetically heterogeneous disease, whose clinical features include blindness or severe visual impairment within the first year of life and represents the most severe form of inherited retinal dystrophy (IRD). We performed the mutation analysis in 34 Japanese families with LCA to evaluate the mutation spectrum and frequency of known LCA-associated genes in the Japanese population. 74 genes responsible for IRD were examined by targeted-next generation sequencing (NGS). The results of these analyses revealed 30 potential pathogenic variants in 12 genes among 19 of the 34 analyzed families. The results also showed the mutation spectra and frequencies identified in the analyzed Japanese population to be distinctly different from those previously identified for other ethnic backgrounds. The observed detection rate of about 56% indicated that targeted NGS is a valuable method for molecular diagnosis of LCA cases in the Japanese population.

研究分野：遺伝学

キーワード：先天性視覚障害 遺伝子診断 Leber先天盲

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児期に発症する眼疾患は先天異常や遺伝性疾患が多い事が特徴である。小児の失明原因の3/4は遺伝性疾患であり、眼形態形成異常(無虹彩、小眼球、コロボーマ)、前眼部疾患(Peters奇形)、水晶体疾患(先天白内障)、網膜疾患(レーバー先天盲(LCA)、スターガルト病、家族性滲出性硝子体網膜症、若年性網膜分離症、先天性停止性夜盲、眼振・黄斑低形成)、視神経障害(遺伝性視神経萎縮)など非常に多くの先天性の視覚障害が存在する。

先天性視覚障害は、早期に発見して適切な治療と訓練を行うことで視力が期待できるものもあり、期待できない場合でも早くからロービジョンケアの参加やリハビリテーションを行って社会参画を促す事が重要である。先天性視覚障害は早期発見が予後に重要であるが、小児では十分な検査が出来ないため原因、病態、経過、予後が明らかでない症例が多く、臨床所見のみでは診断が困難な事が多い。また、就学前は眼科検診が行われないために発見が遅れやすいという問題がある。上記疾患の早期発見が予後に重要な事を考えると原因遺伝子の同定は極めて速やかに行われるべき課題である。研究代表者らは、疾患原因や発症機序を明らかにするために原因遺伝子の同定は非常に重要であると考えている。

わが国の遺伝子診断はオーファンネットジャパン(<http://onj.jp/>)に委託する事が可能であるが、検査対象遺伝子は一部の網膜疾患の原因遺伝子のみであり、上記遺伝子群を網羅的に検査する事は出来ない。欧米のようなテーラーメイド医療をわが国の先天性視覚障害患者に提供する為に、効率の良い遺伝子診断法を確立し、臨床の場において迅速に遺伝子検査ができるシステムの確立が急務である。

### 2. 研究の目的

LCAは、生後早期より高度に視力が障害される網膜色素変性の類縁疾患であり、失明につながる重篤な遺伝性網膜疾患である。これまでに25個の原因遺伝子が同定されており、同定された原因遺伝子のスクリーニングにより欧米のLCAの約7割の原因が説明できると見積もられている。LCAは80,000人に1~2人の頻度で認められ、先天盲の約20%を占めるとされている。2017年12月にLCAの原因遺伝子*RPE65*に対する遺伝子治療がアメリカ食品医薬品局(FDA)により承認され(US Food and Drug Administration. FDA approves novel gene therapy to treat patients with a rare form of inherited vision loss. December 19, 2017)、これまで治療法が存在しなかったLCAの患児とその家族に希望を与える事となった。しかし、この遺伝子治療の適応は遺伝子ごとに異なり、LCAの原因遺伝子の特定が必須であるため、近年、遺伝子治療を希望する患者と家族にとって遺伝子診断の重要性は急増している。

そこで本研究はわが国のレーバー先天盲患児に高頻度で変異が認められる原因遺伝子と日本人固有の遺伝子変異を効率よく同定する為に次世代シーケンサー(NGS)を用いた遺伝子変異診断法を構築して臨床の場において迅速に遺伝子診断を実施できるシステム化を目指す。更に、研究の成果として得られる蓄積した変異と臨床の統合データを実際の臨床の場で遺伝情報に基づき予後予測と治療方針の決定に応用する事も検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1)症例

国立成育医療研究センター眼科、東京慈恵会医科大学眼科、浜松医科大学眼科、産業医科大学眼科で詳細な問診と眼科的検査によりLCAと診断された34家系39人の患児を解析対象にした。本研究では下記3項目を全て満たす症例をLCAとして収集した。

生後早期から高度な視機能障害をもつ(夜盲、眼振、対光反応の欠如、指眼症候など)

網膜電図にて消失または著しい減弱を示す。

検査時にて神経発達遅延以外の全身症状を認めない。

各眼科外来で倫理規定に基づき、両親に遺伝子検査について十分な説明を行い、書面上でインフォームドコンセントを取得の上、患児と一部両親から採血を行い、DNAを精製した。

当該研究に関する遺伝子及び末梢血の収集にあたり、成育医療研究センター、東京慈恵会医科大学、産業医科大学、浜松医科大学の倫理委員会(承認番号686、24-232 6997、H29-03、14-040)の承認を受けている。末梢血は、同意を得た患者または保護者より提供を受けた。採血前に本研究の研究内容、協力の任意性と撤回の自由、研究計画書等の開示、個人情報保護、提供者の利益および不利益、解析結果の通知、研究成果の公表、研究終了後の試料等の取扱いの方針、知的財産権、費用、遺伝カウンセリング等について詳しく説明し、インフォームドコンセントを書面で得られたもののみを対象とした。本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)及び、「疫学研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省)を遵守して行った。

#### (2)NGSを用いたターゲットシーケンス解析

使用機器は、浜松医科大学の先進機器共用推進部の次世代シーケンサーMiSeq (イルミナ社)を使用した。遺伝子変異を同定するため、RPとLCAの原因遺伝子74個を解析対象とした遺伝性網膜疾患パネルをデザインした。研究代表者らは、このライブラリーを使用して複数の遺伝性網膜疾患患者より新規の原因変異を同定している。<sup>1)</sup> サンプルライブラリーの作成は、HaloPlex Target Enrichment kit(アジレント社)を使用した。MiSeq用のシーケンス試薬はMiSeq Reagent Kit v2 300 cycle (イルミナ社)を使用した。

#### (3)変異の抽出法

MiSeqより出力された大量のシーケンスデータは当教室で構築した専用のパイプラインを用いて解析した。研究分担者らは、MiSeqから出力された大量データを用いて変異を検出する手技や、検出した変異が疾患原因変異かどうかを評価する経験と実績がある。<sup>1,2)</sup>

#### (4) 疾患原因変異の判定

原因変異を同定できた検体はサンガー法を用いて確認実験を行う。その後、家族の検体を利用して分離解析を行うと共に、他種生物での相同遺伝子のホモロジー解析、収集済み健常コントロールでの解析、1000ゲノムデータベース(<http://www.1000genomes.org/>)、Exome Aggregation Consortium データベース (<http://exac.broadinstitute.org/>)、Human Genetic Variation データベース(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>)、東北メガバンクデータベース (<https://ijgvd.megabank.tohoku.ac.jp/>)を用いて評価する。既報告の疾患原因変異はHuman Gene Mutation データベース (<https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>)を用いて評価した。スプライス変異は、スプライス部位予測ソフトを用いてドナー/アクセプターサイトの影響を評価した。新規のミスセンス変異は、SIFT([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_seq\\_submit2.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html))、PolyPhen2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>)、CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>)の4種類の *in silico* 解析を行いアミノ酸置換による病原性を評価した。

#### 4 . 研究成果

19 家系の患児から原因変異の可能性が高い変異を検出した。LCA の原因遺伝子以外の原因遺伝子からも変異を検出した。同定した原因遺伝子の中では *CRB1*、*MMNAT1*、*RPGRIP1* の寄与が高かった。LCA の原因遺伝子以外の原因遺伝子 (*RPGR*、*RP2*、*BEST1*) から原因変異の可能性が高い変異を検出した。定量 PCR 法により *LRAT* の全 3 エキソン領域の片側アレルが欠失している症例を検出した。

NGS を用いたターゲットシーケンス解析によって 56% の日本人 LCA 患者から原因の可能性の高い変異を検出した。欧米の LCA の変異スペクトラムと異なっていた。日本人 RP に原因変異の寄与が極めて高い *EYS* 遺伝子変異のような高頻度変異は検出されなかった。

#### <引用文献>

Hosono K, et al., Novel *GUCY2D* gene mutations in Japanese male twins with Leber congenital amaurosis, *J. Ophthalmol.* 2015, 693468.

Hosono K, et al., Two novel mutations in the *EYS* gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS One*, 2012, 7, e31036.

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Hosono K, Nishina S, Yokoi T, Katagiri S, Saitsu H, Kurata K, Miyamichi D, Hikoya A, Mizobuchi K, Nakano T, Minoshima S, Fukami M, Kondo H, Sato M, Hayashi T, Azuma N, Hotta Y. Molecular Diagnosis of 34 Japanese Families with Leber Congenital Amaurosis Using Targeted Next Generation Sequencing. 査読有, *Sci Rep.* 2018, 8(1):8279

doi: 10.1038/s41598-018-26524-z.

Kurata K, Hosono K, Hotta Y, Clinical and genetic findings of a Japanese patient with RP1-related autosomal recessive retinitis pigmentosa. 査読有, *Doc Ophthalmol.* 2018, 137(1):47-56.

doi: 10.1007/s10633-018-9649-7.

Katagiri S, Hosono K, Hayashi T, Kurata K, Mizobuchi K, Matsuura T, Yoshitake K, Iwata T, Nakano T, Hotta Y. Early onset flecked retinal dystrophy associated with new compound heterozygous *RPE65* variants. 査読有, *Mol Vis.* 2018, 24:286-296.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893010/>

Kurata K, Hosono K, Hayashi T, Mizobuchi K, Katagiri S, Miyamichi D, Nishina S, Sato M, Azuma N, Nakano T, Hotta Y: X-linked retinitis pigmentosa in Japan: clinical and genetic findings in male patients and female carriers. 査読有, *Int J Mol Sci.* 2019, 20(6): E1518.

doi: 10.3390/ijms20061518.

Kurata K, Hosono K, Hikoya A, Kato A, Saitsu H, Minoshima S, Ogata T, Hotta Y. Clinical characteristics of a Japanese patient with Bardet-Biedl syndrome caused by *BBS10* mutations. 査読有, *Jpn J Ophthalmol.* 2018, 62(4):458-466.

doi: 10.1007/s10384-018-0591-8.

Kurata K, Hosono K, Hotta Y, Long-term clinical course of two Japanese patients with *PRPF31*-related retinitis pigmentosa. 査読有, *Jpn J Ophthalmol.* 2018, 62(2):186-193.

doi: 10.1007/s10384-017-0560-7.

Hosono K, Minoshima S, Hotta Y, Retinitis pigmentosa in Japanese population. 査読有, *Essentials in Ophthalmology Advances in Vision Research*, volume I, 2017, 111-128. <https://www.springer.com/in/book/9784431565093>

Miyamichi D, Asahina M, Nakajima J, Sato M, Hosono K, Nomura T, Negishi T, Miyake N, Hotta Y, Ogata T, Matsumoto N. Novel HPS6 mutations identified by whole-exome sequencing in two Japanese sisters with suspected ocular albinism. 査読有, *J Hum Genet*. 2016, 61(9):839-42. doi: 10.1038/jhg.2016.56.

〔学会発表〕(計 9 件)

Hosono K et al., Mutation Analysis of 34 Japanese Families with Leber Congenital Amaurosis by Next Generation Sequencing, The 25th Hamamatsu Symposium on Medical Science, 2019

Hosono K et al., Mutation analysis of Japanese patients with Leber congenital amaurosis by next generation sequencing, ARVO, 2018

Hosono K et al., Molecular Analysis of 34 Japanese Families with Leber Congenital Amaurosis Using Targeted Next Generation Sequencing, The 63th annual meeting of the Japan Society of Human Genetics, 2018

細野克博 他、日本人 Leber 先天盲の次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析、第 122 回日本眼科学会総会、2018 年

細野克博 他、次世代シーケンサーを用いた日本人 Leber 先天盲の遺伝子変異解析 (シンポジウム)、第 66 回日本臨床視覚電気生理学学会 2018 年

細野克博 他、次世代シーケンサーの登場により遺伝性網膜変性の変異解析は大きく進歩した(シンポジウム)、第 121 回日本眼科学会、2017 年

細野克博 他、レーバー先天盲の日本人患者に対する次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断、第 121 回日本眼科学会、2017 年

細野克博 他、次世代シーケンサーを用いたレーバー先天盲の 1 家系 3 症例の遺伝子変異解析とその臨床像、第 22 回浜松医科学シンポジウム、2017 年

細野克博 他、次世代シーケンサーを用いたレーバー先天盲の 1 家系 3 症例の遺伝子変異解析、第 41 回日本小児眼科学会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：堀田 喜裕

ローマ字氏名：(HOTTA, yoshihiro)

所属研究機関名：浜松医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8 桁): 90173608

研究分担者氏名：佐藤 美保  
ローマ字氏名：(SATO, miho)  
所属研究機関名：浜松医科大学  
部局名：医学部  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：50252242

研究分担者氏名：蓑島 伸生  
ローマ字氏名：(MINOSHIMA, shinsei)  
所属研究機関名：浜松医科大学  
部局名：光先端医学教育研究センター  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：90181966

研究分担者氏名：横井 匡  
ローマ字氏名：(YOKOI, tadashi)  
所属研究機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター  
部局名：感覚器・形態外科部  
職名：医師  
研究者番号(8桁)：80514025

(2)研究協力者

研究協力者氏名：才津 浩智  
ローマ字氏名：(SAITSU, hirotomo)

研究協力者氏名：東 範行  
ローマ字氏名：(AZUMA, noriyuki)

研究協力者氏名：仁科 幸子  
ローマ字氏名：NISHINA Sachiko

研究協力者氏名：深見 真紀  
ローマ字氏名：(FUKAMI, maki)

研究協力者氏名：中野 匡  
ローマ字氏名：(NAKANO, tadashi)

研究協力者氏名：林 孝彰  
ローマ字氏名：(HAYASHI, takaaki)

研究協力者氏名：近藤 寛之  
ローマ字氏名：(KONDO, hiroyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。