

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09992

研究課題名(和文) 網膜色素変性の新規原因遺伝子の同定-罹患者の全エクソーム解析のデータを活用して-

研究課題名(英文) Identification of novel causative genes for retinitis pigmentosa - Utilizing data from whole exome analysis of affected patients

研究代表者

佐藤 茂 (Sato, Shigeru)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70738525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、新規遺伝性網膜変性症の候補遺伝子を22個同定することに成功した。実際は、研究計画通り、遺伝性網膜変性症患者の全エクソーム解析の結果を利用し、候補遺伝子を絞りこんだ。それらの遺伝子群を順次 *in situ hybridization* にて野生型マウス網膜にて遺伝子発現を確認した。その結果、更なる検討を進めていくべきこれまでに網膜での機能解析が行われていない22個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の網膜における機能解析を目指しモデル動物の作成を開始した。今後、モデル動物での生体内での遺伝子機能を解析することにより、新規遺伝性網膜変性症の原因遺伝子の同定を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により同定した新規網膜色素変性症の候補遺伝子は非常に有望と考えている。実際22個のうち1遺伝子は本研究期間内に、新規遺伝性網膜色素変性症の原因遺伝子であると他のグループから報告されたことから、非常に有効な絞り込みができていていると考えている。本研究を継続することにより、新規網膜色素変性症の原因遺伝子が同定できれば、網膜色素変性症の新規メカニズムの解明、並びに新規治療開発に役立つのみならず、遺伝カウンセリングにも有用な情報となる。

研究成果の概要(英文)：This study successfully identified 22 candidate genes for novel inherited retinal degenerations. In fact, as planned, we used the results of whole exome analysis of patients with hereditary retinal degeneration to extract rare SNPs in cases where the causative gene could not be identified or candidate mutations were not found, and further narrowed down the list by referring to the gene expression profile in the retina of mouse models of retinitis pigmentosa, as previously reported. The genes were checked gene expression patterns in wild-type mouse retina was confirmed by *in situ hybridization*. As a result, we identified 22 genes whose functions in the retina have not yet been analyzed for further investigation. We have started to create animal models to analyze the functions of these genes in the retina. We will analyze the gene functions *in vivo* in the model animals in order to identify the causative genes of new hereditary retinal degenerations.

研究分野：眼科学

キーワード：遺伝性網膜変性症 全エクソームシーケンス

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の難治性疾患政策研究事業による 2015 年度の疫学調査では、日本における失明原因疾患の第二位が網膜色素変性(14.0%)となったと報告された。但し、50-69 歳での第一位は網膜色素変性(21.2%)となっている。成人後期に高度の視覚障害を引き起こし、罹患数が非常に多い網膜色素変性の病態解明と治療の進歩は、医学的のみならず、社会的にも大きな福音をもたらすことが明らかである。しかしながら、これまで網膜色素変性に対しては有効性が証明された治療法が全く存在しなかった。網膜色素変性の治療開発を困難にしている大きな要因の一つに遺伝的異質性が挙げられる。現在までに網膜色素変性の原因遺伝子は 60 以上報告されているが(Retnet™: <https://sph.uth.edu/retnet/>)、少数の例外を除いて、表現型から遺伝子型を推定することは通常の眼科臨床検査では不可能である。その結果、これまで病的にヘテロな集団である網膜色素変性を一つの疾患として扱わざるを得なかったこともあり、遺伝子診断、進行予測や治療法開発は非常に立ち遅れていた。近年、診断面では、マイクロアレイや次世代シーケンサーの登場により網羅的遺伝子解析が可能となり、特に網膜色素変性のような遺伝的異質性を示す疾患の病態解明・遺伝子診断に対してその有用性が明らかとなっている。治療開発面では、昨年未 RPE65 遺伝子異常に伴う Leber 先天黒内障(網膜色素変性の超早期発症型)に対する遺伝子治療が米国 FDA の認可を受けた。また、人工網膜では Argus® が、両眼が光覚もしくは失明した進行した網膜色素変性症例に対して治療デバイスとしてこれまでに 100 例以上埋植されたとのことである。

申請者らも以前より独自方式の強膜内電極埋植型人工網膜の開発に取り組んでいる(Fujikado T, *et al.* IOVS, 6147-6157, 2016)。更に、網膜で機能する遺伝子に関する研究も進めており、ピカチュリン(Sato S, Fujikado T, *et al.* Nature Neurosci. 923-931. 2008)、MAK(Omori Y, Sato S, *et al.* PNAS. 22671-22676, 2010)、Blimp1(Katoh K, Sato S, *et al.* J Neurosci. 6515-6526, 2010)を見出し、詳細な解析結果を報告した。MAK については 2011 年に網膜色素変性の原因遺伝子(RP62; MIM154235)であることが相次いで報告されている。申請者は、2013 年に英国での RPGR 遺伝子異常による X 連鎖性網膜色素変性に対する AAV を用いた遺伝子治療開発研究の機会を得た。その中で遺伝子診断の重要性を改めて認識するに至り、帰国後全エクソーム解析のプラットフォームを構築して解析をすすめている。これまでに網膜色素変性については非症候性 68 例、症候性 4 例の全エクソーム解析を終了した。この研究で、症候性網膜色素変性を示す Bardet-Biedl syndrome 症例において、世界でこれまで 16 家系のみ報告されている病型の新規変異を同定した。この全エクソーム解析研究では、既知の原因遺伝子内に候補となるレアバリエーションを持たない症例が 26% あり、網膜色素変性には未知の原因遺伝子が残されていることが強く推測された。更には病因遺伝子内のレアバリエーションが同定されても、その病的意義が確定しておらず(Variant of uncertain significance: VUS)診断に至らない症例がほぼ半数にのぼった。これらのことが、現時点でも網膜色素変性のクリニカルシーケンスの普及のみならず、病態解明、予後予測、治療法の開発の大きな妨げとなっていることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

日本人網膜色素変性症の新たな原因遺伝子を同定することである。申請者らがこれまで行ってきた日本人網膜色素変性症に対する全エクソーム解析の結果とマウス網膜での遺伝子発現プロファイルデータを活用することにより、新規網膜色素変性原因遺伝子の非常に有望な候補を得ている。本研究では、それらの家系解析、マウス網膜や培養細胞内での発現・局在・機能、ノックアウトマウスでの表現型等を解析することにより、新たな網膜色素変性原因遺伝子を同定する。

### 3 . 研究の方法

遺伝性網膜変性症患者の全エクソーム解析の結果を利用し、候補遺伝子を絞りこんだ。それらの遺伝子群を順次 in situ hybridization にて野生型マウス網膜にて遺伝子発現を確認した。網膜内(特に視細胞)にシグナルを認めた遺伝子については、順位付けを行い、順次、免疫組織学的に網膜内でのタンパクの局在解析、モデル動物の作成を開始した。モデル動物としては、マウスとゼブラフィッシュを選択した。

### 4 . 研究成果

本研究により、更なる検討を進めていくべきこれまでに網膜での機能解析が行われていない新規遺伝性網膜変性症の候補遺伝子を 22 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の網膜における機能解析を目指しモデル動物の作成を開始した。現在ゼブラフィッシュ 3 系統、マウス 2 系統のノックアウトアレルを持つ個体の作成に成功している。引き続き、モデル動物での生体内での遺伝子機能を解析することにより、新規遺伝性網膜変性症の原因遺伝子の同定を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Shigeru, Morimoto Takeshi, Tanaka Sayaka, Hotta Kikuko, Fujikado Takashi, Tsujikawa Motokazu, Nishida Kohji	4. 巻 20
2. 論文標題 Novel mutation identified in Leber congenital amaurosis - a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12886-020-01577-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato S, Morimoto T, Hotta K, Fujikado T, Nishida K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Eleven-year Follow-Up of a Japanese Retinitis Pigmentosa Patient With an HK1 Gene Mutation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmic Genet .	6. 最初と最後の頁 466-469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13816810.2019.1678179.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shigeru Sato, Takeshi Morimoto, Kikuko Hotta, Motokazu Tsujikawa, Takashi Fujikado, Kohji Nishida
2. 発表標題 27-year follow-up of Japanese siblings with juvenile cone rod dystrophy 13 due to a novel RPGRIP1 gene mutation
3. 学会等名 ARVO(米国) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤茂、森本壮、田中さやか、堀田紀久子、辻川元一、不二門尚、西田幸二
2. 発表標題 RPGRIP1に新規変異を認めたレーバー先天黒内障6型の兄妹例
3. 学会等名 第74回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤茂、森本壮、堀田紀久子、不二門尚、西田幸二
2. 発表標題 TTC8遺伝子に新規コンパウンドヘテロ変異を認めた 日本人Bardet-Biedl症候群の1例
3. 学会等名 第64回日本人類遺伝学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeru Sato, Noriyasu Hashida, Takeshi Morimoto, Kikuko Hotta, Takashi Fujikado, Kohji Nishida
2. 発表標題 Novel OPA1 gene mutations in Japanese patients with optic atrophy
3. 学会等名 ARVO (米国) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	不二門 尚  (Fujikado Takashi)  (50243233)	大阪大学・生命機能研究科・特任教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------