

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09825

研究課題名(和文) わが国の難治性未診断眼疾患に対する新しい疾患概念の確立と診断法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Establishing a new disease concept and developing diagnostic methods for intractable and undiagnosed eye diseases in Japan

研究代表者

堀田 喜裕 (HOTTA, Yoshihiro)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：90173608

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)：本研究により、わが国の難治性未診断眼疾患患者に対して次世代シーケンサーを用いて遺伝子診断を行い、原因遺伝子を同定して新たな疾患概念を確立する。

1) CDK9は遺伝性網膜ジストロフィー(IRD)を伴うCHARGE症候群類似の新しい多発奇形症候群の原因遺伝子であること、2) NEK1 遺伝子変異による全身疾患を伴わないIRD、3) 片親性ダイソミーによるIRD、4) RPGRIP1遺伝子の日本人に頻度の高い欠失等を報告した。難治性未診断眼疾患患者の診断に次世代シーケンサーによる遺伝子解析は有効と考える。まれではあるが、片親性ダイソミーのような複雑な遺伝子異常も含まれるので留意が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼所見を有しながら通常の医療では診断に至る事が困難な患者(難治性未診断眼疾患患者)は、まれではあるが存在して、患者・患児と家族は苦しんでいる。本研究はわが国の希少・未診断眼疾患患者に対して次世代シーケンサーを用いた遺伝子検査により確定診断を行った。

原因遺伝子の同定によって、新たな疾患概念を確立し、新しい表現型を発見することができた。さらに、まれな遺伝子変異を発見し、小児網膜ジストロフィーのわが国における高頻度変異を報告した。本研究によって、苦しんでいた患者の診断が可能になった。また、精緻な遺伝カウンセリングを行うことにつながり、患者・患児に有用な情報を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to perform genetic diagnosis on patients with intractable, undiagnosed eye diseases in Japan, identify the causative genes, and establish a new concept of the disease. We employed next-generation sequencers to perform genetic diagnosis.

We have reported that 1) CDK9 could be the causative gene for a new multiple malformation syndrome similar to CHARGE syndrome accompanied by Inherited retinal dystrophy (IRD), 2) IRD without systemic disease caused by NEK1 gene mutations, 3) IRD which could be caused by uniparental disomy, and 4) high frequent pathogenic deletion of the RPGRIP1 gene in Japanese pediatric IRD. We believe that genetic analysis using next-generation sequencers is effective in diagnosing patients with intractable, undiagnosed eye diseases. Genetic counseling requires careful consideration because pediatric IRD includes complex genetic abnormalities such as uniparental disomy.

研究分野：眼科学

キーワード：難治性未診断疾患 遺伝子診断 CDK9 NEK1 RPGRIP1 Uniparental disomy

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床的な眼所見を有しながら通常医療で診断が困難な難治性未診断眼疾患患者は、複数の医療機関を受診しても原因がわからないまま長期に渡って様々な症状に悩まされている。これら患者はこれまでに報告のない新規疾患だけではなく、報告数が極めて少ない希少眼疾患も含まれている。希少眼疾患は、診断法が確立されていない事が多く発症から診断に至るまで数年を要することがある。そこで本研究はわが国の難治性未診断眼疾患患者に対して遺伝子診断を行い、原因遺伝子を同定して新たな疾患概念を提唱すると共にその診断法の開発を行う。既報の原因遺伝子を検出した場合でも、これまでの報告とは異なる表現型を呈する症例であれば、疾患概念を再考して診断法の改定を検討する。本研究により難治性未診断眼疾患患者の確定診断を行い、臨床情報と遺伝情報を蓄積する事で同一の臨床症状を呈する患者に対して自然経過に伴う視機能予測や早期に必要な検査や治療が可能となり、患者の QOL 向上が期待できる。

2. 研究の目的

対象とする疾患に変更はない。当初の背景と異なる点は、遺伝子診断について、全エクソームシーケンシング(Whole exome sequencing, WES)が比較的容易に行えるようになったこと、全ゲノムシーケンシング(Whole genome sequencing, WGS)も可能になったことである。本研究は、わが国の難治性未診断眼疾患患者に対して、次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断を行い、原因遺伝子を同定して新たな疾患概念を提唱すると共にその診断法の開発を行う事を目的とする。既報の原因遺伝子を同定した場合でもこれまでの報告とは異なる表現型を呈する症例であれば疾患概念を再考して診断法の改定を検討する。

3. 研究の方法

(1) 未診断疾患イニシアチブ(Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases: IRUD)との関係

わが国では 2015 年に日本医療研究開発機構主導により 2 つ以上の臓器にまたがり、一元的に説明が出来ない他覚的所見を有し、診断が困難な症例に対する IRUD の取組みが進行している。IRUD 研究により日本全国に IRUD 拠点病院が配置され、未診断疾患症例の収集と遺伝子診断の成果が得られている。代表者の所属する浜松医科大学も IRUD 拠点病院として認定され、症例を収集しているが、眼のみに所見を有する症例は IRUD の研究対象から外れている。したがって、眼科領域の未診断疾患に対して本研究で解析を行った。しかし、検体収集の段階では他の全身疾患の合併が明らかにされていないこともあり、重篤な眼疾患に全身の合併症を伴った症候群も対象に含まれた。

(2) 検体収集

研究期間中、新型コロナウイルス感染症の流行によって検体収集が停滞したため、すでに収集済の未診断眼疾患患者を中心に解析を行った時期もあった。新型コロナウイルス感染症の対策が充実したのに伴い、若年発症の網膜ジストロフィー(Inherited retinal dystrophy: IRD)、前眼部疾患や視神経疾患の検体収集を進めた。当該研究に関する遺伝子及び末梢血・唾液等の収集にあたり、浜松医科大学の臨床研究倫理委員会(承認番号 14-040)の承認を受けている。患者または保護者に対して、採血前に倫理委員会に提出している項目にしたがって研究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、「人を対象とする医学系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。

(3) WES による変異探索

若年発症の IRD、前眼部疾患、視神経疾患、合計 30 症例に対して WES を実施した。バリエーションの探索は、われわれの研究室のパイプラインを用いて行った。RetNet に掲載されている遺伝性網膜、視神経疾患の原因について、一塩基置換や小さな欠失や挿入に加え、Canvas や Manta、TEMP2 を用いたコピー数異常や構造異常の検出、SpliceAI や SpliceRover 等によるスプライシング異常の予測を行い検討した。構造異常が疑われた症例については、de novo assembly にて切断点の配列を決定し、PCR で確認した。診断に難渋した IRD に対して、可能な場合は、発端者と両親に対して WES 又は WGS を実施してバリエーションを絞り込んだ。

(4) WGS による変異解析

WES で原因遺伝子を特定できなかった IRD 症例に対し WGS を実施し、(3)に示す方法でバリエーションの探索を行った。

4. 研究成果

(1) 新しい疾患概念の確立

われわれは、眼、耳、口唇裂、口蓋裂を含む複数の異常、知的障害、および *CDK9* 遺伝子の複

合ヘテロ接合体性変異を有する 8 歳男児を経験した (症例 1)。顔の非対称性、小耳症、両側性難聴、不整脈、停留精巣など、以前に報告されたホモ接合体性 *CDK9* 変異を持つ患者とよく似た表現型であった。関節拘縮、指の屈曲しわがないこと、および大きな母趾は、以前に報告された患者と同様であった。眼科的には、重度の IRD に加えて、眼瞼異常、涙管閉塞、外転障害、先天性白内障を合併していた。この報告までに、CHARGE 様症候群の多発奇形を呈する血縁関係のない 4 家系から、*CDK9* 遺伝子に同じホモ接合体性変異 (p.R225C) が報告されていたが、*CDK9* 遺伝子変異と CHARGE 様症候群との因果関係は確立されていなかった。人種の異なる本症例に、*CDK9* 遺伝子の母由来の p.(A288T) と父由来の p.(R303C) が同定された。どちらの変異も非常にまれで、進化の過程で高度に保存されており、重要なキナーゼドメイン内に存在する。両方の変異体のキナーゼ活性は野生型の *CDK9* と比較して低下していた。以上のことから、*CDK9* は IRD を伴う CHARGE 症候群類似の新しい多発奇形症候群の原因遺伝子の可能性が高いと考えた。

(2) これまでと異なる表現型の報告

NEK1 遺伝子は、短肋骨多指症候群 (short rib polydactyly, SRPS) や軸性脊椎骨幹端異形成症 (axial spondylometaphyseal dysplasia, axial SMD) の原因遺伝子である。*NEK1* 変異が原因と示唆された全身合併症のない IRD の兄妹例を経験した。症例 2 は 14 歳女児、症例 3 は 16 歳男児。両親は近親婚ではない。兄妹ともに進行性の視野狭窄を認めた。両眼底に網膜血管の狭細化、網膜色素上皮の萎縮を認め、光干渉断層計画像では ellipsoid zone が不鮮明で、全視野網膜電図では ab 波の著明な減弱を示した。以上から、若年発症重症網膜ジストロフィー (Early onset severe retinal dystrophy; EOSRD) と診断した。兄妹と両親に対し WES を施行し、2 つのまれなヘテロ接合体性 *NEK1* バリエーション、c.240G>A; p.(M80I) c.634_639dup;p.(V212_L213dup) を認めた。c.240G>A は父親由来、c.634_639dup は母親由来であった。American College of Medical Genetics のガイドラインによると、二つのバリエーションは病原性の可能性が高いと分類された。小児科医による診察では、身体的な問題は指摘されなかった。兄妹はやや身長が低い。現在まで身長の伸びに異常はなく、画像による詳細な骨格検査でも異常は認めない。*NEK1* 遺伝子 (604588, 4q33) は、axial SMD と SRPS の原因遺伝子として知られている。SRPS は、重度の骨格異形成および内臓機能障害と関連しており、周産期死亡につながることが多い。*NEK1* 遺伝子変異による axial SMD は、重度の IRD とも関連していると報告されている。しかし、今回経験した兄妹は、全身的な異常を合併せず、*NEK1* 遺伝子変異によって引き起こされる IRD という新しい表現型を示していると考えられる。

(3) EOSRD における複雑な遺伝子異常の同定

EOSRD 患者の WES によって、片親性ダイソミーによって発症した 2 症例を経験した。症例 4 は 14 歳女児。出生時より眼振と運動発達遅滞が見られた。2 歳時よりてんかんで治療を受けている。8 歳時に紹介されて当院を受診した。症例 5 は 31 歳男性。7 歳から羞明と夜盲を自覚し、10 歳時に網膜色素変性と診断された。症例 4 は 10 歳時に両親に、症例 5 は本人と両親に、研究について詳細な説明を行い、書面による同意を得て WES を行った。症例 4 は第 4 番染色体全体のヘテロ接合体性の喪失を認め、両親の解析結果から母性イソダイソミーが示唆された。患者血清ではグリコシル化の異常を検出し、*SRD5A3* 先天性グリコシル化異常症と診断した。症例 5 は第 8 番染色体全体のヘテロ接合体性の喪失を認め、両親の解析結果から母性イソダイソミーが示唆された。さらなる解析の結果、症例 5 では *RP1* 遺伝子の c.4052_4053ins328:p.(Y1352Afs) をホモ接合体性で認め、*RP1* 関連網膜色素変性と診断した。イソダイソミーによる IRD は主に早期発症の患者に認められるが、イソダイソミーでない患者との臨床的な差異はなかった。

(4) Leber congenital amaurosis (LCA)/EOSRD における *RPGRIP1* のわが国の高頻度変異

WES と WGS によって病的バリエーションを同定した *RPGRIP1* 遺伝子関連網膜症 7 家系 10 例の検討によって、*RPGRIP1* 遺伝子の日本人の高頻度変異が疑われる欠失を同定した。

遺伝相談をする上で、表現型の多様性や、複雑な遺伝子異常は悩ましい問題であるが、今回得られた知見によって、小児期 IRD の遺伝カウンセリングにおいて留意すべき問題が明らかにされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Itai Toshiyuki, Wang Zheng, Nishimura Gen, Ohashi Hirofumi, Guo Long, Wakano Yasuhiro, Sugiura Takahiro, Hayakawa Hiromi, Okada Mayumi, Saisu Takashi, Kitta Ayana, Doi Hiroshi, Kurosawa Kenji, Hotta Yoshihiro, Hosono Katsuhiko, Sato Miho, 他	4. 巻 102
2. 論文標題 De novo heterozygous variants in <i>KIF5B</i> cause kypomelic dysplasia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 3~11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.14133	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 Sano Yusuke, Koyanagi Yoshito, Wong Jing Hao, Murakami Yusuke, Fujiwara Kohta, Endo Mikiko, Aoi Tomomi, Hashimoto Kazuki, Nakazawa Toru, Wada Yuko, Ueno Shinji, Gao Dan, Murakami Akira, Hotta Yoshihiro, Ikeda Yasuhiro, Nishiguchi Koji M, Momozawa Yukihide, Sonoda Koh-Hei, Akiyama Masato, Fujimoto Akihiro	4. 巻 59
2. 論文標題 Likely pathogenic structural variants in genetically unsolved patients with retinitis pigmentosa revealed by long-read sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 1133~1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2022-108428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suga Akiko, Yoshitake Kazutoshi, Fukuchi Takeo, Hatase Tetsuhisa, Horiguchi Masayuki, Shimada Yoshiaki, Tanikawa Atsuhiko, Yamamoto Shuichi, Miura Gen, Ito Nana, Murakami Akira, Fujimaki Takuro, Hotta Yoshihiro, Tanaka Koji, Iwata Takeshi, 他	4. 巻 43
2. 論文標題 Genetic characterization of 1210 Japanese pedigrees with inherited retinal diseases by whole exome sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 2251~2264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/humu.24492	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 Hikoya Akiko, Hosono Katsuhiko, Ono Kaoru, Arai Shinji, Tachibana Nobutaka, Kurata Kentaro, Torii Kaoruko, Sato Miho, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu, Hotta Yoshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 A case of siblings with juvenile retinitis pigmentosa associated with <i>NEK1</i> gene variants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmic Genetics	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13816810.2022.2141788	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 Morikawa Hazuki, Nishina Sachiko, Torii Kaoruko, Hosono Katsuhiro, Yokoi Tadashi, Shigeyasu Chika, Yamada Masakazu, Kosuga Motomichi, Fukami Maki, Saitsu Hiroto, Azuma Noriyuki, Hori Yuichi, Hotta Yoshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 A pediatric case of congenital stromal corneal dystrophy caused by the novel variant c.953del of the DCN gene	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-023-00239-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Hiroyuki, Matsushita Itsuka, Nagata Tatsuo, Fujihara Etsuko, Hosono Katsuhiro, Uchio Eiichi, Hotta Yoshihiro, Kusaka Shunji	4. 巻 10
2. 論文標題 Retinal Features of Family Members With Familial Exudative Vitreoretinopathy Caused By Mutations in <i>KIF11</i> Gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.7.18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizobuchi Kei, Hayashi Takaaki, Oishi Noriko, Kubota Daiki, Kameya Shuhei, Higasa Koichiro, Futami Takuma, Kondo Hiroyuki, Hosono Katsuhiro, Kurata Kentaro, Hotta Yoshihiro, Yoshitake Kazutoshi, Iwata Takeshi, Matsuura Tomokazu, Nakano Tadashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Genotype-Phenotype Correlations in RP1-Associated Retinal Dystrophies: A Multi-Center Cohort Study in JAPAN	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2265 ~ 2265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10112265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tachibana Nobutaka, Hosono Katsuhiro, Nomura Shuhei, Arai Shinji, Torii Kaoruko, Kurata Kentaro, Sato Miho, Shimakawa Shuichi, Azuma Noriyuki, Ogata Tsutomu, Wada Yoshinao, Okamoto Nobuhiko, Saitsu Hiroto, Nishina Sachiko, Hotta Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Maternal Uniparental Isodisomy of Chromosome 4 and 8 in Patients with Retinal Dystrophy: SRD5A3-Congenital Disorders of Glycosylation and RP1-Related Retinitis Pigmentosa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 359 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13020359	査読の有無 無
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 Nishina Sachiko, Hosono Katsuhiko, Ishitani Shizuka, Kosaki Kenjiro, Yokoi Tadashi, Yoshida Tomoyo, Tomita Kaoru, Fukami Maki, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu, Ishitani Tohru, Hotta Yoshihiro, Azuma Noriyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Biallelic CDK9 variants as a cause of a new multiple-malformation syndrome with retinal dystrophy mimicking the CHARGE syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00909-x	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 Torii Kaoruko, Nishina Sachiko, Morikawa Hazuki, Mizobuchi Kei, Takayama Masakazu, Tachibana Nobutaka, Kurata Kentaro, Hikoya Akiko, Sato Miho, Nakano Tadashi, Fukami Maki, Azuma Noriyuki, Hayashi Takaaki, Saitsu Hiroto, Hotta Yoshihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 The Structural Abnormalities Are Deeply Involved in the Cause of RPGRIP1-Related Retinal Dystrophy in Japanese Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13678 ~ 13678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241813678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀田喜裕
2. 発表標題 ゲノム医療をめざして～眼遺伝学の研究と臨床～
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁科幸子、細野克博、横井匡、吉田朋世、富田香、深見真紀、小崎健次郎、堀田喜裕、東範行
2. 発表標題 網膜ジストロフィーを発症した多発奇形症候群の1例
3. 学会等名 第45回日本小児眼科学会
4. 発表年 2020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	岩泉 守哉 (IWAIZUMI Moriya) (60444361)	浜松医科大学・医学部・准教授 (13802)	

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
---------	---------