

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23005

研究課題名(和文) 定型網膜色素変性患者の臨床的意義不明の遺伝子変異に関するエビデンスの創出

研究課題名(英文) Characteristics of retinitis pigmentosa in Japanese patients with variants of uncertain significance

研究代表者

小柳 俊人 (Koyanagi, Yoshito)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80880690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性(retinitis pigmentosa: RP)の遺伝的な原因が不明な症例には、臨床的意義不明の変異(variants of unknown significance: VUS)の関与が考えられるが、遺伝子変異に関する新規報告やデータベース情報等の更新に基づくACMGガイドラインでの再評価により、病因と判断されうる変異が存在することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜色素変性(RP)は現時点で確立された治療法がなく眼科領域における重要な研究課題であるが、遺伝的に明らかな病因が認められない日本人のRP症例が半数以上に存在する。それらの症例に検出された臨床的意義不明の遺伝子変異に関するエビデンスを継続的に蓄積することは新たな病因究明に繋がる可能性があり、将来的な治療法の開発やその適応の選定の際の有用なエビデンスとなる。

研究成果の概要(英文)：Variants of unknown significance (VUS) should be considered as a potential cause of RP in the genetically unsolved patients. We performed the re-evaluation using the ACMG guidelines based on recent reports and updates to database information related to genetic variants and confirmed the causal genetic variants of some cases.

研究分野：遺伝性網膜変性疾患

キーワード：遺伝性疾患 網膜色素変性 次世代シーケンサー 遺伝子変異 臨床的意義不明 ゲノム医療 遺伝性網膜変性疾患 データベース

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (retinitis pigmentosa: RP) は、最も頻度の高い遺伝性網膜変性疾患 (Inherited retinal disease: IRD) であり、網膜の変性により進行性の視覚障害をきたす。主要な失明原因疾患の一つであり、その視力障害は、桿体細胞の機能障害による夜盲および視野狭窄から始まり、錐体細胞の喪失による中心視力障害へと続くことが典型的である。RP の有病率はおよそ 3,000-4,000 人に 1 人で、本邦の症例数は 29,330 人とされている。常染色体優性(顕性)遺伝、常染色体劣性(潜性)遺伝、X 染色体劣性遺伝、孤発型など様々な遺伝形式をとり、80 種類以上の病因遺伝子が報告されている。現時点で確立した治療法はないが、近年、遺伝子治療の臨床治験が行われており、病因遺伝子及び変異を評価する重要性がますます高まっている。以前、我々は日本人の多数の RP 症例の発症者のみを対象としたターゲットリシーケンシングを実施し、日本人の集団における多数例の遺伝的背景の特定を行い、東アジア人に特異的な変異が日本人の RP の主要な病因であることを明らかにしてきた。一方で、網羅的なシーケンスを行っても、本邦では遺伝的な病因が不明な症例が依然として半数以上に存在する (Oishi M, et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014, Maeda A, et al. *Jpn J Ophthalmol.* 2018, Koyanagi Y, Akiyama M, et al. *J Med Genet.* 2019, Numa S, et al. *Sci Rep.* 2020)。それらの症例における遺伝的な病因究明は急務である。

特に、病因遺伝子変異が不明であった症例についての詳細な検討で、約 40%の症例は既知の常染色体劣性(潜性)遺伝形式の病因遺伝子変異を 1 つ有するものの、対立遺伝子に病因遺伝子変異が検出されない症例であることが判明している (Koyanagi Y, Akiyama M, et al. *J Med Genet.* 2019)。病因遺伝子が不明であった症例における保因者の割合と、東アジア人の一般集団における保因者の割合を比較すると、疾患群で *EYS*、*USH2A*、*CRB1* の病因遺伝子変異保有者の割合が統計学的に有意に高く、これらの病因遺伝子が潜在的に発症に関わっていることが示唆されている。また、変異毎に検証すると、病因遺伝子が不明であった症例において東アジア人の一般集団と比較して有意に高頻度である既知の常染色体劣性(潜性)遺伝子の 4 つの病因遺伝子変異 [*EYS* の p. (Ser1653fs)、p. (Tyr2935*) および p. (Gly2186Glu)、ならびに *MAK* の p. (Ala114fs)] が検出されており、同様にこれらの病因遺伝子変異が潜在的に発症へ関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

前述の遺伝的な病因が不明な症例には、現時点では発症と関連する変異か良性の変異か明らかになっていない臨床的意義不明の変異 (variants of unknown significance: VUS) の関与が考えられる。その病原性の解釈は重要な課題であるが、RP の病因遺伝子で検出された VUS を対象とした網羅的な検討はなされていなかった。前述の我々の先行研究でも未解決症例に VUS が多数検出されたが、その病的意義の解釈が与える影響は未だ不明であり、RP の多数例における VUS の網羅的評価は診断率の大幅な上昇に繋がる可能性があると考えられる。

当研究では病因遺伝子が不明であった症例に検出された VUS に対して、症例毎の詳細な臨床情報および遺伝情報の追加取得を行い、American College of Medical Genetics (ACMG)、Association of Molecular Pathology (AMP)、College of American Pathologists (CAP) の提唱するガイドライン (Richards S et al., *Genet Med.* 2015) に基づく病的意義の再評価を行う。

3. 研究の方法

九州大学病院眼科で経過観察をしている RP 症例のうち、RetNet に登録されている 83 の病因遺伝子のシーケンスを行った症例に検出された VUS を対象とした。病原性の評価は、ACMG ガイドラインに遵守して行った。重要項目が家系解析及びビッグデータ解析であるが、前者では、①症例毎に家族歴の聴取、②臨床的な遺伝形式の決定、③両親および同胞の過去の医療情報 (遺伝学的検査を含む検査結果等)、④同一変異をもつ複数の発症家系における分離の情報を取得した。家系の遺伝情報は、患者の家族より採取した血液もしくは唾液検体由来の DNA サンプルを用いて、サンガー法又は次世代シーケンサー (NGS) によるシーケンスを行った。後者では、⑤公共のデータベースでの変異の頻度情報、⑥遺伝子変異に関する新規報告や基礎研究の結果、⑦変異のホットスポットや機能ドメイン情報、⑧アルゴリズムを用いた機能予測結果等のデータを統合し評価した。最終的に VUS の病的意義を pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign, benign に分類し、変異毎のエビデンスを創出した。

4. 研究成果

症例毎の臨床情報の追加取得、遺伝子情報の再解析を行い、既存の臨床情報及び変異情報のデータベースの更新を行った。遺伝子検索後の症例については、The Japanese Retinitis Pigmentosa Registry Project (JRPRP) という疾患データベースへの登録を進めた。それらの情報を用いた変異情報と各種臨床情報との層別解析を施行し、遺伝的な病因が不明な症例の臨床的な特徴を検証した。遺伝的診断を行った症例における年代毎の解析では、高齢になるに従って特定率が低下していくという現象が確認できた。病因遺伝子変異については、特に *EYS* 遺伝子などの統計学

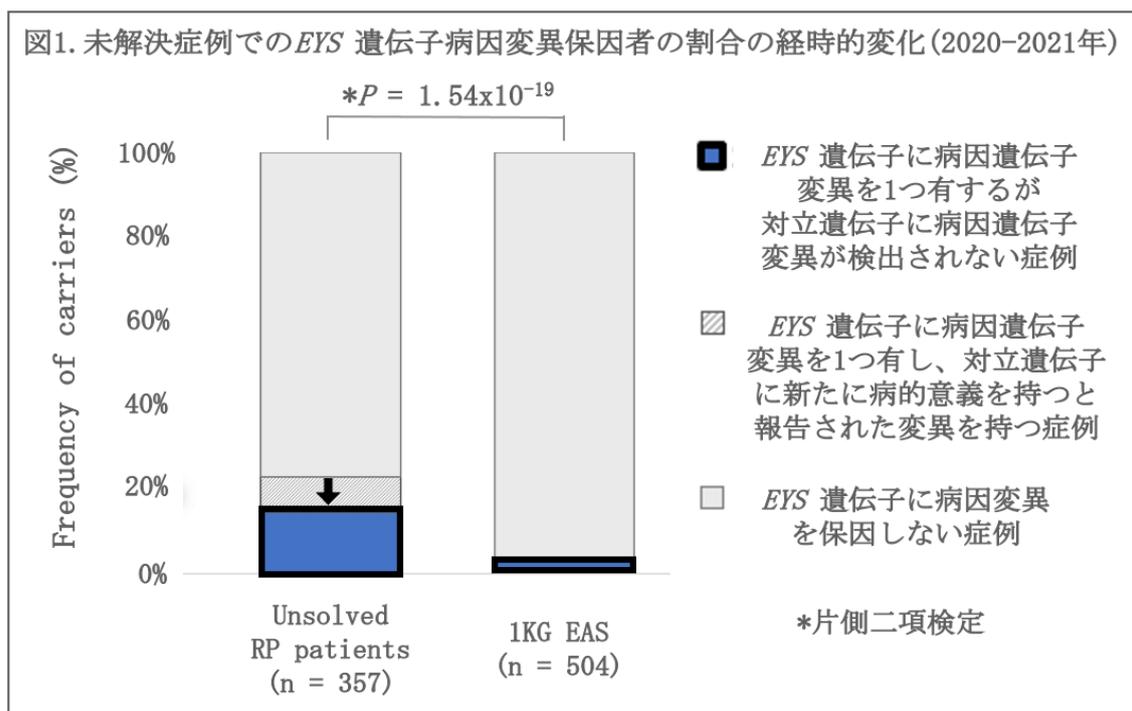
的有意にその病因変異が保因者に存在している症例について評価を行った。遺伝的な病因が不明の症例に以下の新規報告された病因遺伝子変異が存在することを確認した。

(1) *EYS* 遺伝子の一般集団のデータベースで比較的頻度が高い非同義的変異[p. (G843E)]は、常染色体劣性 RP の症例を対象に行われたゲノムワイド関連解析において、有意な独立したピークの一つとして検出され、機能解析により病原性を持つことが報告された(Nishiguchi KM, et al. *Commun Biol.* 2021)。この *EYS* 遺伝子変異を遺伝的な病因が不明な症例の病因と判断した場合、本邦における *EYS*-RP の遺伝子病因変異の上位にくる、RP の病態に大きく寄与する変異であることが示唆された。

(2) 前述の研究で我々が用いた短鎖シーケンサーを用いた手法では大きな構造多型を完全には検出することはできない。以前、RP において *EYS* の大きな構造変異がその病因であったとする既報が存在し(Nishiguchi KM, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013)、大きな構造多型を検出する方法の開発と改良がさらなる解明のために必要であると考えられた。左野らは常染色体劣性(潜在)遺伝形式の病因遺伝子に1つの病因変異を有するものの、対立遺伝子に病因変異及び VUS が検出されなかった症例、特に *EYS* に1つの病因変異を有する症例に対し、長鎖シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンス解析を施行し、短鎖シーケンサーで検出が困難な likely pathogenic と判定される大きな構造変異の検出に成功した(Sano Y, et al. *J Med Genet.* in Press)。

図1に未解決症例での *EYS* 遺伝子病因変異保因者の割合の経時的変化(2020-2021年)を示す。新たに病的意義を持つと報告された(1)及び(2)の *EYS* 遺伝子変異を遺伝的な病因が不明な症例の病因と判断した場合、30症例の遺伝的病因が新たに特定できたことになる(図1斜線部)。更新した変異情報に基づき、前述の研究で行った未解決症例での *EYS* 遺伝子病因変異保因者の割合と東アジア人の一般集団における保因者の割合を比較すると、依然として有意に高頻度 ($p = 1.54 \times 10^{-19}$)であった(図1)。この知見は *EYS* 遺伝子の病因変異の保因者に対するさらなる検証の必要性を示唆している。

大部分の VUS は依然として病的意義が不明であるが、VUS に関するエビデンスの蓄積は新たな病因究明や将来的な治療法の開発やその適応の選定の際に重要である。今後、より大規模な病因遺伝子変異探索により、症例・対照比較と家族解析を効率よく行い、本邦における比較的高頻度の新規病因変異の特定を進める必要がある。前述の(1)、(2)のように新規病因変異の特定には新規シーケンス手法や解析手法の当疾患への応用が必要であり、今後も当疾患の遺伝子解析への新規手法の応用を進めていくことが、遺伝的な病因の特定率の上昇につながると考えられる。遺伝性網膜変性疾患のゲノム医療実現に向け、今後さらなる大規模な病因遺伝子変異探索を展開し、変異の解釈に寄与するエビデンスの創出を進めていく計画である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Yoshito Koyanagi et al.
2. 発表標題 Regional differences in causative genes and variants in 1,204 Japanese patients with retinitis pigmentosa
3. 学会等名 EURETINA 2020 Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小柳 俊人、村上 祐介、下川 翔太郎、藤原 康太、秋山 雅人、武田 篤信、池田 康博、園田 康平
2. 発表標題 網膜色素変性の発症年齢と原因遺伝子の関連
3. 学会等名 日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小柳俊人、村上祐介、下川翔太郎、藤原康太、沖田絢子、左野 裕介、武田篤信、秋山雅人、池田康博、園田康平
2. 発表標題 定型網膜色素変性における原因遺伝子の特定率の年代毎の違い
3. 学会等名 第125回日本眼科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshito Koyanagi, Yusuke Murakami, Shinji Ueno, Yuji Inoue, Kentaro Kurata, Masato Akiyama, Koh-Hei Sonoda, Masayo Takahashi, Koji M Nishiguchi, Yasuhiro Ikeda
2. 発表標題 The frequent pathogenic variants in 145 Japanese patients with EYS-associated retinal disease
3. 学会等名 The 14th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小柳 俊人, 秋山 雅人, 園田 康平	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 8
3. 書名 臨床眼科 75巻12号 【網膜色素変性:最近の話題】 遺伝子解析でわかったこと	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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