

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13802
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791975
 研究課題名（和文） 日本人網膜色素変性患者における原因遺伝子 EYS の寄与と遺伝子変異-
 病態の関連解析
 研究課題名（英文） Genotype-phenotype analysis and prevalence study of disease-causing
 mutations in the EYS gene among Japanese patients with retinitis pigmentosa
 研究代表者
 細野 克博（HOSONO KATSUHIRO）
 浜松医科大学・医学部・助教
 研究者番号：60402260

研究成果の概要（和文）：

網膜色素変性(RP)は常染色体優性遺伝(ad)、常染色体劣性遺伝(ar)、X連鎖性遺伝形式が知られ、
 遺伝的異質性が高い疾患である。我々は、100人のarRPに対しEYSの変異解析を行った。結果、
 18人の患者から7種の原因変異を同定した。18人中9人は片側アレルの原因変異のみ同定でき
 た。18人中16人にc.4957_4958insAまたはc.8868C>Aの変異を同定した。これら2種の変異は
 日本人arRPにおいて突出して頻度の高い遺伝子変異である可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：

Retinitis pigmentosa (RP) is a highly heterogeneous genetic disease including autosomal recessive (ar),
 autosomal dominant (ad), and X-linked inheritance. This study was conducted to determine the spectrum
 and frequency of EYS mutations in 100 Japanese arRP patients. We detected 7 very likely pathogenic
 mutations in 18 patients. Of these 18 patients, second mutant allele could not be detected in 9
 patients. Among these 7 mutations, 2 truncating mutations, c.4957_4958insA and c.8868C>A, were
 detected in at least one mutated allele in 16% of Japanese arRP patients and may be the most
 frequent mutations causing RP in the Japanese populations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜色素変性

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性 (RP) は臨床的にも遺伝的にも異質性の高い疾患であり、臨床的重症度や
 症状、進行の速さは症例や家系により多彩である。本疾患は、夜盲が初期症状であること
 が多く、進行すると周辺部視野障害・視力低下へつながり、最終的に失明に至る。

RP は常染色体優性遺伝 (ad)、常染色体劣性遺伝 (ar)、X連鎖性遺伝の3つの遺伝形式
 をとり、我が国の各遺伝形式の占める割合は、adが16.9%、arが25.2%、X連鎖性が1.6%と
 報告されている。また、家系内に他に患者が見られず遺伝形式が明らかでない孤発例が

多く存在している (56.3%)。我が国では以前、
 近親婚率が諸外国に比べて比較的高かった
 ため arRP の相対頻度が高かったが、近年の
 近親婚率の低下によりその相対頻度が減少
 しつつある。また少子化に伴って arRP が孤
 発例となっている可能性がある。

RP は、これまでに ad、ar、X連鎖性 RP、
 それぞれ 23、36、2 個の原因遺伝子が同定さ
 れている。欧米ではこれまでに見つかった原
 因遺伝子を検討し、adRP の約半数、arRP の
 約 60% で原因を同定することができると見
 積もられている。将来、本疾患に対して有効
 な治療法が開発されるためには遺伝子レベ

ルでの病因解明が必要である。

RP 原因遺伝子のスクリーニングは、既に欧米、中国等の多数の施設によって行われている。我が国では adRP や X 連鎖性 RP の原因遺伝子の報告はあるが、大半を占める孤発例を含む arRP の原因遺伝子の報告は極めて少なかった。

この状況を打開するために、申請者は研究協力者である浜松医科大学堀田喜裕教授、神戸理化学研究所高橋政代チームリーダー、千葉大学山本修一教授、三重大学近藤峰生教授（当時名古屋大学准教授）と共同で arRP 患者を収集し、arRP 原因遺伝子として頻度が高い EYS (Eyes Shut Homolog) 遺伝子の大規模スクリーニングを実行することを計画した。

2. 研究の目的

本研究は、日本の基幹施設から収集した arRP 患者を用いて EYS 遺伝子の変異解析を行い、日本人 RP 患者における EYS 遺伝子変異の寄与と高頻度に認められる遺伝子変異のデータを蓄積し、日本人における RP 患者の EYS 遺伝子の変異と臨床像の対応関係についての基礎データを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RP 患者の診断

本研究は日本の基幹施設から収集した100人のRP患者を遺伝子解析の対象とした。各施設の眼科外来では倫理規定に基づき遺伝子検査について十分な説明を行い、インフォームドコンセントが得られた患者に対し、詳細な問診と眼科的検査（視野検査、視力検査、眼底検査、網膜電図、OCT検査）を行った。

(2) DNA の調整、細胞の株化

確定診断された患者より末梢血を収集し、EYS 遺伝子変異解析を行った。また同患者の末梢血より可能な限り B リンパ芽球様細胞株の樹立を行った。実験方法を下記に示す。

① EYS 遺伝子の変異解析

患者の末梢血より DNA を抽出し、EYS の 44 エキソンと周囲のイントロン配列を PCR 法により増幅する。PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定する。

② B リンパ芽球様細胞株の樹立

患者の末梢血よりリンパ球を抽出し、EB ウイルス (Epstein-Barr virus) に感染させる。その後、活発に増殖する B リンパ芽球様細胞が得られるまで培養と継代を続ける。

(3) 日本人 RP 患者の EYS 遺伝子の変異と病態の関連解析

EYS 遺伝子の両方のアレルに原因が強く疑われる異常が検出された RP 患者を対象とする。それら患者の視力、視野を含む眼科検査を施行し、日本人における RP 患者の EYS 遺伝子の変異と病態の対応関係の基礎データを創

出する。

4. 研究成果

EYS 遺伝子の変異解析の結果、100 人の日本人 arRP 患者において 18 人の患者から 7 種 (c.4957_4958insA, c.8868C>A, c.2522_2523insA, Deletion exon 32, c.6557G>A, c.7793G>A, c.8351T>G) の疾患原因変異を同定した。18 人中 9 人は片側アレルの原因変異のみ同定できた。また上記 18 人の患者以外の 8 人から 6 種のミスセンス変異 (c.77G>A, c.2923T>C, c.5404C>T, c.5884A>G, c.8875C>A, c.9272T>C) を同定した。今回同定した 13 種の変異のうち c.6557G>A 以外の 12 種は新規変異であった。c.4957_4958insA は 12 人の患者から、c.8868C>A は 4 人の患者から同定した。これら 2 種類の変異は日本人 arRP 患者において突出して頻度の高い遺伝子変異である可能性が高い (表)。

同様に日本人レーバー先天盲患者 28 人に対して c.4957_4958insA と c.8868C>A のスクリーニングを行ったが、上記 2 変異は見つからなかった。これら解析結果は 2012 年 2 月 17 日に PLoS ONE 誌に掲載された。

Family ID	Nucleotide change	Predicted effect	Domain	Location in gene	Type of change	Reference
Families with very likely pathogenic mutations and both alleles affected						
RP3H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Homozygous	This study
RP48K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Homozygous	This study
RP54K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Homozygous	This study
RP44K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
	c.6557G>A	p.G2186E	Laminin G	Exon 32	Heterozygous	Abel et al. 2010 Lambert et al. 2010 This study
RP56K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Compound	This study
	c.8351T>G	p.L2794R	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
RP87N	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
	c.7793G>A	p.G2598D	Close to Laminin G	Exon 40	Heterozygous	This study
RP81K	c.2522_2523insA	p.Y841X	EGF	Exon 16	Compound	This study
	c.6557G>A	p.G2186E	Laminin G	Exon 32	Heterozygous	Abel et al. 2010 Lambert et al. 2010 This study
RP21H	deletion exon32	p.D2142_S2191delinsG	Laminin G	Exon 32	Homozygous	This study
RP35K	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Homozygous	This study
Families with single very likely pathogenic mutations						
RP1H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP6H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP12H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP51K	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP96H	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP100N	c.4957_4958insA	p.S1653KfsX2	Close to coiled-coil	Exon 26	Heterozygous	This study
RP8H	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
RP25H	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
RP80K	c.8868C>A	p.Y2956X	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
Families with single possible pathogenic mutations						
RP4H	c.9272T>C	p.I3091T	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
RP9H	c.8875C>A	p.L2959M	EGF	Exon 44	Heterozygous	This study
RP49K	c.9272T>C	p.I3091T	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
RP53K	c.5884A>G	p.T1962A	Laminin G	Exon 28	Heterozygous	This study
RP55K	c.9272T>C	p.I3091T	Laminin G	Exon 44	Heterozygous	This study
RP74K	c.5404C>T	p.L1802F	Close to Laminin G	Exon 26	Heterozygous	This study
RP79K	c.77G>A	p.R26Q	Close to signal peptide (near start site)	Exon 4	Heterozygous	This study
RP83K	c.2923T>C	p.C975R	EGF	Exon 19	Heterozygous	This study

表. 100 人の日本人 arRP 患者において同定された EYS 遺伝子の変異

上記研究成果の報告後も arRP 患者の収集を継続して、更に 106 人の arRP 患者を収集した。新たに収集した arRP 患者に対しては c.4957_4958insA と c.8868C>A の 2 か所のみを PCR ダイレクトシーケンス法で変異解析を行い、arRP 患者 106 人中 15 人に

c.4957_4958insA(14%)、5人にc.8868C>A(5%)変異を同定した。これまでに解析したarRP患者を含めると206人中27人に

c.4957_4958insA(13%)、9人にc.8868C>A(4%)変異を同定した。これら2種の変異は我が国のarRP患者の主要な原因変異の可能性が高いことが改めて明らかとなり、同内容を第66回日本臨床眼科学会で報告した。

また、昨年度と本年度の解析でEYS遺伝子より原因変異を両アレルより同定できた10名について個々の臨床像と変異の関連について詳細な検討を行った。結果、EYS遺伝子異常によるRP患者の臨床像は類似しており、多くの患者は10-20代で夜盲を発症し、30代まで比較的良好な視力を保ち、40-50代で視機能が低下していることが分かった。特にc.4957_4958insA変異をホモ接合体でもつ患者の臨床像はEYS遺伝子に他の変異を持つ患者と比べて臨床像のばらつきが少なかったことを明らかとした。同内容は*Ophthalmic Genetics*誌へ投稿し、来年度公開される予定である。

今回の遺伝子解析により、日本人arRP患者におけるEYS遺伝子の寄与は18%と大きく、原因変異c.4957_4958insAとc.8868C>A変異は我が国のarRP患者において突出して頻度の高い遺伝子変異である可能性が高いことがわかった。この情報は網膜色素変性疾患を研究する研究者、患者をケアする臨床医にとって重要なデータである。日本人RPの遺伝形式のうち孤発例を含むarが最も多く、その内18%もの原因であることは、全RP症例の14%にEYS遺伝子の異常が存在することになる。これ程の頻度で見つかるのであれば、通常の遺伝子検査によって十分に検出できる。日本人RP患者の早期診断が可能となり、遺伝カウンセリングを行う上で極めて有用な情報となり、創薬による薬物療法に道を開く可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Katsuhiko Hosono, Chie Ishigami, Masayo Takahashi, Dong Ho Park, Yasuhiko Hirami, Hiroshi Nakanishi, Shinji Ueno, Tadashi Yokoi, Akiko Hikoya, Taichi Fujita, Yang Zhao, Sachiko Nishina, Jae Pil Shin, In Teak Kim, Shuichi Yamamoto, Noriyuki Azuma, Hiroko Terasaki, Miho Sato, Mineo Kondo, Shinsei Minoshima, YoshihiroHotta, Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population, *PLoS ONE*, 査読有, 7(2) E31036, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0031036.

(2) Kazutoshi Nojima, Katsuhiko Hosono, Yang Zhao, Takaaki Toshiba, Akiko Hikoya, Tatsuhiko Asai, Masaru Kato, Mineo Kondo, Shinsei Minoshima, Yoshihiro Hotta, Clinical features of a Japanese case with Bothnia dystrophy, *Ophthalmic Genet*, 査読有, 33(2), 83-88, 2012. DOI:10.3109/13816810.2011.634877.

(3) Genetic diagnosis from buccal mucous membrane in cases of chronic progress ophthalmoplegia, Kaoruko Torii, Takashi Negishi, Katsuhiko Hosono, Mayu Sawada, Akiko Hikoya, Miho Sato, Yoshihiro Hotta, *Jpn.J.Clin.Ophthalmol*, 査読無, 66(10), 1497-1502, 2012.

(4) 眼白子が疑われた姉妹例, 野村隆仁、佐藤美保、細野克博、彦谷明子、根岸貴志、澤田麻友、堀田喜裕、服臨紀、査読有, 5(4), 367-372, 2012.

[学会発表] (計2件)

(1) Katsuhiko Hosono, Chie Ishigami, Masayo Takahashi, Yasuhiko Hirami, Shinji Ueno, Noriyuki Azuma, Hiroko Terasaki, Mineo Kondo, Shinsei Minoshima, YoshihiroHotta. An Adenine Insertion between Nucleotide Positions 4957 and 4958 in the EYS Gene Is a Possible Major Cause of arRP in the Japanese Population. ARVO, 2012, Fort Lauderdale.

(2) 細野克博、石上智愛、高橋政代、平見恭彦、上野真治、山本修一、東範行、寺崎浩子、佐藤美保、近藤峰生、養島伸生、堀田喜裕、本邦網膜色素変性患者のEYS(Eyes Shut Homolog)遺伝子の変異解析、第116回日本眼科学会、2012年、東京

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：遺伝子の変異を検出するためのプライマー、プローブ、マイクロアレイ、及び、これらを備える検出キット、並びに、網膜色素変性症原因遺伝子変異の検査方法、網膜色素変性症への遺伝的感受性の検査方法

発明者：細野克博、堀田喜裕

権利者：国立大学法人浜松医科大学

種類：特許

番号：特願 2010-294236

出願年月日：2010年12月28日

国内外の別：国内

[その他]

シンポジウム発表

細野克博、わが国の網膜色素変性患者の遺伝子解析、第66回日本臨床眼科学会、2012年、京都

受賞

細野克博、第16回JRPS研究助成受賞、日本人網膜色素変性患者の遺伝子診断システムの構築

新聞、雑誌等による報道

日本人の網膜色素変性症 原因遺伝子を発見 日本経済新聞 平成24年2月2日

目の難病、原因遺伝子特定 日本人患者に高頻度で異常 共同通信 平成24年2月2日

目の難病原因遺伝子を特定 中日新聞 平成24年2月2日

日本人に高頻度、目の難病 浜医大が遺伝子特定 静岡新聞 平成24年2月2日

国立成育医療研究センターと浜松医大、日本人で高頻度で網膜色素変性を起こす原因遺伝子を発見、PLoS ONE 誌で発表 日経バイオテク ONLINE 平成24年2月18日

科学 網膜色素変性症 日本人に多い遺伝子異常判明 朝日新聞 平成24年2月23日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 克博 (HOSONO KATSUHIRO)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：60402260

(2) 研究協力者

堀田 喜裕 (HOTTA YOSHIHIRO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：90173608

高橋 政代 (TAKAHASHI MASAYO)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：80252443

近藤 峰生 (KONDO MINEO)
三重大学・医学部・教授
研究者番号：80303642

山本 修一 (YAMAMOTO SHUICHI)
千葉大学・医学部・教授
研究者番号：20230550