

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592654

研究課題名(和文)眼稀少疾患の遺伝子解析システムの構築

研究課題名(英文)Construction of a genomic analysis system of an ocular orphan disease.

研究代表者

藤巻 拓郎 (Fujimaki, Takuro)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50333042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロアレイを用いて、LCAを含むARRP105例における遺伝子変異の概要を示した。マイクロアレイは従来の直接塩基配列決定法と比較し、LCAを含むARRPの遺伝子診断に有用である可能性が示唆された。また、FEVRにおいて直接塩基配列決定法は遺伝子診断に有用な手法であるが、今回のNorrie病症例の場合、変異の同定が困難な症例も存在する。そのような症例においてMLPA法は有用であった。

研究成果の概要(英文)：Arai E, et al. Familial cases of Norrie disease detected by copy number analysis. JJG. 2014
Suzuki T, et al. A novel exon 17 deletion mutation of RPGRIP1 gene in two siblings with LCA. JJG. 2014

研究分野：Genetics

キーワード：Genetics Molecular genetics Gene analysis Orphan disease Inherited eye disease Sequencing Micro Array Mutation

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

1. 研究開始当初の背景

我々は遺伝子異常が関与する眼科稀少疾患患者の迅速、正確な遺伝子解析システムを構築することで、各疾患の原因究明と治療可能な患者を見出すことを目指している。重症型の常染色体劣性網膜色素変性

(autosomal recessive retinitis pigmentosa:

ARRP)および Leber 先天盲(Leber congenital amaurosis: LCA, MIM204000)の他、臨床所見から家族性滲出性硝子体網膜症(Familial exudative vitreoretinopathy : FEVR, MIM

133780)、Norrie 病(MIM 300658)、先天異常、小眼球、コロボーマなど様々な稀少疾患や、網膜色素変性を含む網膜ジストロフィの患者血液からゲノム DNA を抽出し、全ての翻訳領域の塩基配列を標準配列と比較しその配列差により、また現行の手法で遺伝子異常が検出されなかったもの一部はコピー数解析により、変異の有無、種類、頻度の概要を明らかにしようと試みてきた。

2. 研究の目的

臨床所見から LCA を含む ARRP、FEVR、Norrie 病が疑われた患者に対し、遺伝子解析を行った。各原因遺伝子について、日本人における変異の種類と頻度の概要を明らかにする。

3. 研究の方法

対象: LCA を含む ARRP については 1988 年から現在までに当科を受診し、説明と同意が得られた早期発症症例を含む ARRP 105 例(男性 66 例、女性 39 例、平均年齢 43.4 ± 23.2 歳)を対象とした(表 1)。13 歳以降発症孤発例は ARRP から除外した。現時点で診療録と試料の双方が保存されており、常染色体劣性遺伝形式は、親、子、

血縁者に発症がなく、同胞発症、両親が近親婚、祖父母の出身地が同じもののみとした。X 連鎖遺伝形式と判別不能の場合も対象に含めた。FEVR、Norrie 病が疑われた患者は、当科受診した FEVR 疑いの 9 家系 22 名と Norrie 病疑いの 1 家系 3 名である。

表 1 対象の内訳

発症年齢	病型	症例数
0 歳	LCA	12
1~2 歳	幼年型網膜色素変性	6
3~12 歳	早期発症型網膜色素変性	30
13 歳~	ARRP のみ	57

計 105 例

方法: 患者血液からゲノム DNA を抽出。LCA 原因遺伝子 16 種、*AIP1L1*, *CABP4*, *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D*, *IQCBI*, *KCNJ13*, *LCA5*, *LRAT*, *NMNAT1*, *RD3*, *RDH12*, *RPE65*, *RPGRIP1*, *SPATA7*, *TULP1*、ARRP 原因遺伝子 17 種、*ABCA4*, *ADAM9*, *CNGA1*, *CNGA3*, *CNGB1*, *CNGB3*, *DHDDS*, *EYS*, *FAM161A*, *IMPG2*, *MERTK*, *PDE6A*, *PDE6B*, *PDE6C*, *PDE6G*, *PRCD*, *RLBP1*、計 33 種のエクソン領域を、PCR 法にて増幅。翻訳領域 509 配列、84389 塩基)をマイクロアレイにて塩基配列決定。

FEVR、Norrie 病が疑われた患に対しては *FZD4*, *NDP*, *LRP5*、*TSAPN12*, *SOX17*, *ZNF408* の遺伝子解析を行った。FEVR の家系は上記 6 遺伝子、Norrie 病の家系は *NDP* のエクソン領域を直接塩基配列決定法にて配列を確認した。また変異の確認できなかった家系については MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)法などのコピー数解析も施行した。

いずれにおいても Single nucleotide variants: SNV の機能予測ソフトウェア PolyPhen-2¹⁾と SIFT²⁾、および dbSNP³⁾のデ

データベースと照合し、多型あるいは変異を調査した。倫理面への配慮として、厚生労働省ガイドラインに準拠し順天堂大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した。

4. 研究成果

変異候補特定のための各解析段階での結果を示す(図1)。105例中12例に病因となり得る変異を認め(表2)。そのうち *NMNAT1* Arg237Cys の LCA 症例(図2)と、*RPGRIP1* 遺伝子変異をもつ LCA 症例(図23)の眼底を示す。FEVR の4家系6名に *FZD4* に変異を認め(表3)、Norrie 病の1家系3名に *NDP* のエクソン2を含む領域に欠失を認め(図4)。

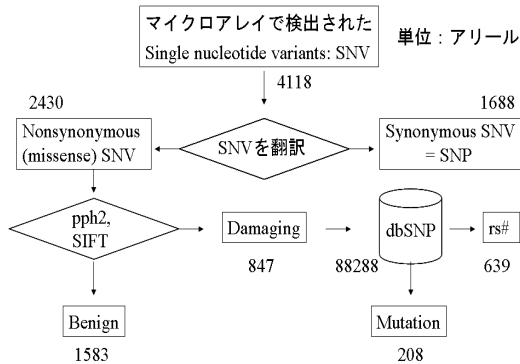


図1 解析のフローチャートと結果

遺伝子	変異	接合発症年齢	pph2*	SIFT*
<i>NMNAT1</i>	p.R237C	ホモ	0	PrD NT
			0	PrD NT
<i>RPGRIP1</i>	exon 17	欠失ホモ	0	
			0	
<i>PDE6B</i>	p.I535N	ホモ	5	PrD NT
<i>RDH12</i>	p.V146E (rs116649873)	ホモ	6	PrD NT
<i>EYS</i>	p.S1653KfsX2	ホモ	10	
			13	
<i>EYS</i>	p.I2188T	ホモ	20	PoD T
<i>EYS</i>	p.C2899S p.Y2935X	複合ヘテロ	40	PrD NT
<i>PDE6B</i>	p.L344P	ホモ	30	B NT
<i>CEP290</i>	p.K632E p.K1930X	複合ヘテロ	55	B T

*PolyPhen-2 スコア:
PrD, probably damaging; PoD, possibly damaging; B, benign...
*SIFT: NT, Not Tolerated; T, Tolerated

表2 変異を認めた症例

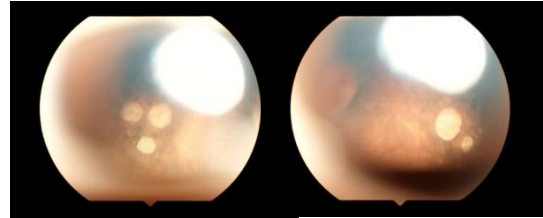
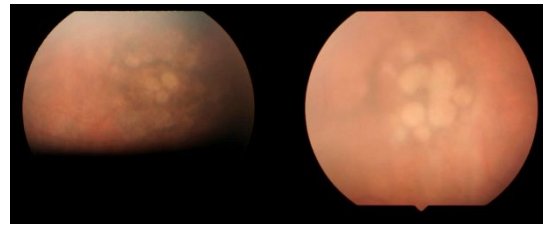


図2 *NMNAT1* Arg237Cys の LCA 症例の眼底 上段家系1、下段家系2

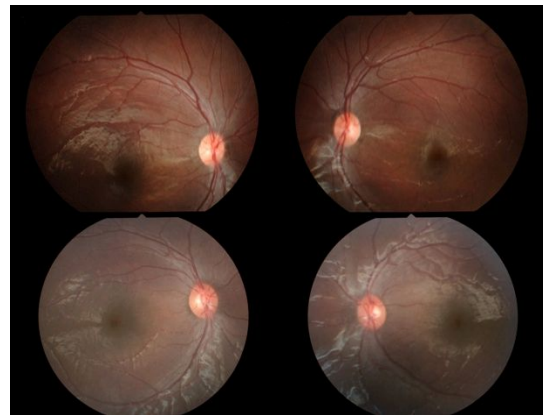


図3 *RPGRIP1* 遺伝子変異を認めた同胞例

Family	Case	Sex	Age	Visual Acuity		Vitreoretinal Findings	Sequene Change
				R	L		
1	-1	M	7M	0.15	0.03	R:dragged disk L:retinal fold	P104T
	-1	M	30	1.2	0.15	B:retinal degeneration	
2	-1	F	2	0.4	0.6	B:retinal degeneration	c.285+1G>T
	-2	F				Not examined	
3	-1	F	7M	1.2	0.7	B:dragged disk	-
	-2	M	26	0.05	0.1	B:retinal fold	
4	-1	M	5M	-	-	R:retinal fold L:dragged disk	Not examined H69Y
	-1	M	40			Not examined	

表3 *FZD4* 遺伝子変異と臨床型

考察 近年、日本人の視覚障害の原因として網膜色素変性をはじめとする遺伝性網膜疾患は、緑内障、糖尿病網膜症に次ぎ第3位⁴⁾となり、厚生省班研究の全国疫学調査⁵⁾では約23000人の患者がいると推定されている。原因遺伝子は約140種、未知を含めると約190種⁶⁾と多岐にわたり、

遺伝的異質性のある疾患である。中でも Leber 先天盲は乳児期に発症する網膜色素変性の重症型で、日本人に頻度の高い ARR1 と同様に有効な治療法がない。2007年、米国と英国で Leber 先天盲患者の遺伝子治療が行なわれ、患者の視機能改善が報告された^{7,8)}。遺伝子治療と遺伝子診断とは表裏一体の関係にあり、わが国でも網膜色素変性、とりわけ重症で頻度の高い ARR1 の遺伝子治療を目指すにあたり、変異の種類と頻度の概要を知る必要があると考えられる。

結論 マイクロアレイを用いて、LCA を含む ARR105 例における遺伝子変異の概要を示した。マイクロアレイは従来の直接塩基配列決定法と比較し、LCA を含む ARR1 の遺伝子診断に有用である可能性が示唆された。また、FEVR において直接塩基配列決定法は遺伝子診断に有用な手法であるが、今回の Norrie 病症例の場合、変異の同定が困難な症例も存在する。そのような症例において MLPA 法は有用であった。

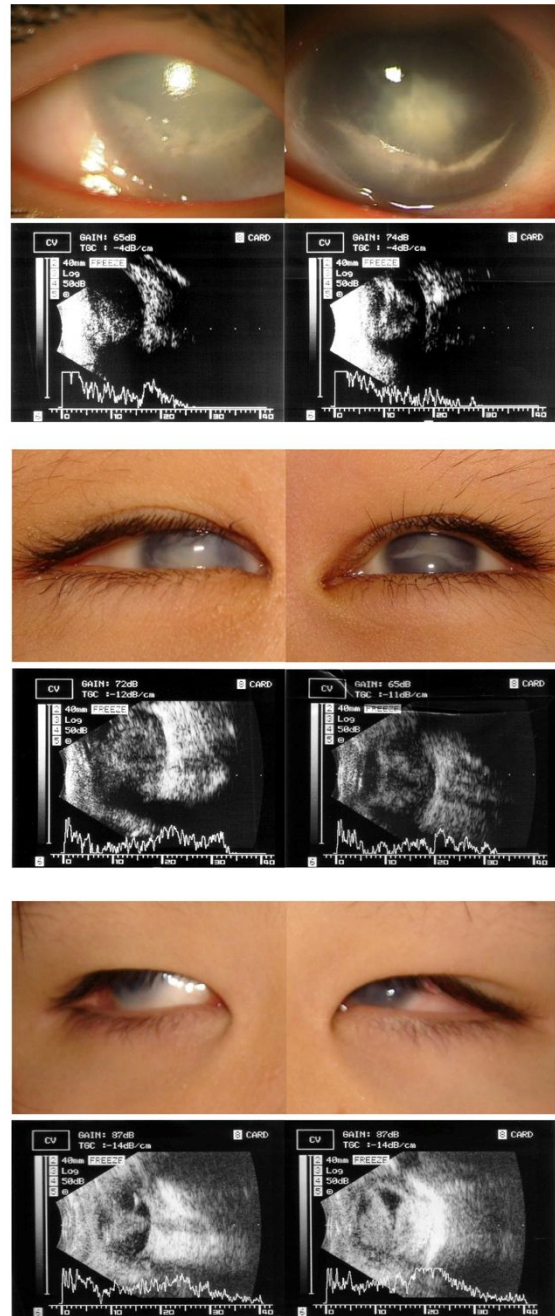


図4 NDP 遺伝子エクソン2の欠失を伴う Norrie 病の同胞例の前眼部と超音波 B-モード

5. 主な発表論文等〔雑誌論文〕(計3件)

1. Suzuki T, Fujimaki T, Yanagawa A, Arai E, Fujiki K, Wada Y, Murakami A. A novel exon 17 deletion mutation of RPGRIP1 gene in two siblings with Leber congenital amaurosis. Jpn J Ophthalmol. 58(6):528-35. 2014

2. Arai E, Fujimaki T, Yanagawa A, Fujiki K, Yokoyama T, Okumura A, Shimizu T, Murakami

A. Familial cases of Norrie disease detected by copy number analysis. Jpn J Ophthalmol. 58(5): 448-54. 2014

3. Okumura A, Arai E, Kitamura Y, Abe S, Ikono M, Fujimaki T, Yamamoto T, Shimizu T. Epilepsy phenotypes in siblings with Norrie disease. Brain Dev. 2015

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計5件)

Tomoka Kambe, Takuro Fujimaki, Ai Yanagikawa, Keiko Fujiki, Akira Murakami. NMNAT1 p.Arg237Cys mutation in Japanese patients with Leber congenital amaurosis World Ophthalmology Congress. 2014年4月2日～2014年4月6日 東京 帝国ホテル

Takuro Fujimaki, Takahide Suzuki, Ai Yanagawa, Eisuke Arai, Keiko Fujiki, Yuko Wada and Akira Murakami. A novel exon 17 deletion mutation of RPGRIP1 gene in two siblings with Leber congenital amaurosis. View Session Detail Abstract Number: 3284 - B0224 2014年5月3日～2014年5月8日 米国 フロリダ州 オーランド

藤巻拓郎 小児疾患の遺伝 第68回日本臨床眼科学会 専門医制度講習会(招待講演) 2014年11月13日～2014年11月16日 神戸ポートピアホテル

藤巻拓郎 Leber 先天黒内障の病態と将来の治療 第68回日本臨床眼科学会 シンポジウム(招待講演) 2014年11月13日～2014年11月16日 神戸 ポートピアホテル

Takuro Fujimaki, Ai Yanagawa, Keiko Fujiki, Akira Murakami. Autosomal dominant cone-rod dystrophy with GUCY2D gene mutations in three Japanese families. Asia Association for Research in Vision and ophthalmology. 2015年2月16日～2015年2月19日 横浜 インターコンチネンタルホテル

〔図書〕(計1件)

藤巻拓郎 網膜色素変性疾患診療のすべて 株式会社医学書院 2015 (印刷中)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤巻 拓郎 (FUJIMAKI, Takuro)
順天堂大学医学部眼科学教室 准教授
研究者番号: 50333042

(2)研究分担者

村上 晶 (MURAKAMI, Akira)
研究者番号: 90157743
順天堂大学医学部眼科学教室 教授