

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791844

研究課題名(和文) 精神遅滞を伴う先天性白内障の原因遺伝子単離

研究課題名(英文) Identification of causative gene in congenital cataract with cognitive deficits

研究代表者

岸本 洋子 (KISHIMOTO, YOKO)

北里大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60523074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：先天性白内障は遺伝学的異質性が高く、原因遺伝子の同定が難しい。本研究では精神遅滞を伴う先天性白内障家系をもとにエキソーム解析を用いて原因遺伝子の同定を目指した。エキソーム解析を用い候補遺伝子の絞り込みを行い、最終的にMAF遺伝子を同定した。MAF遺伝子変異による先天性白内障では、白内障症状の他に小角膜や虹彩コロボーマの合併や、家族間の表現型に差異があることより、本遺伝子の表現型の一端が明らかになった。また、本疾患のように遺伝学的異質性の高い疾患ではその原因遺伝子解析に全エキソーム解析の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：Congenital cataracts are the most important cause of severe visual impairment in infants. Identifying the genetic cause of congenital cataracts can be difficult because of genetic heterogeneity. We analyzed a family with congenital cataracts and identified MAF mutation by whole exome sequencing (WES). The family members showed other eye abnormalities. Congenital cataracts with MAF mutation exhibit phenotypically variable cataracts within the family. Review of the patients with MAF mutations supports the notion that congenital cataracts caused by MAF mutations could be accompanied by microcornea and/or iris coloboma. WES is a useful tool for detecting disease-causing mutations in patients with genetically heterogeneous conditions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：先天性白内障 家族性白内障 遺伝・先天異常学

1. 研究開始当初の背景

先天性白内障は重度視力障害の原因として重要な疾患である。本邦における先天性白内障の発症頻度は、年間約200人とされ、その発症は孤発性、家族性両方の報告がある。その発症には感染などの他に遺伝学的要因の関与が知られており、これまでの報告では常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝、X染色体遺伝形式の報告があるが、このうち原因遺伝子が明らかになっているものは一部である。原因遺伝子は水晶体(*CRYAA*)、ギャップ結合タンパク(*GJA3*,*GJA8*)、膜タンパク(*MIP*)、フィラメントタンパク(*BFSP1*,*BFSP2*)など眼球構造に関わる物質をコードする遺伝子だが、中には成長因子、転写因子(*PAX6*)のように、機能からは原因と推測し難い遺伝子の関与も解明されていることから (Hejtmancik et al., 2008)、先天性白内障の発生には複数の遺伝子が関与し、複雑な機序の上に成り立つと推測されている。また、先天性白内障と精神遅滞や自閉症合併を呈するNance-Horan症候群は連鎖解析により機能不明な原因遺伝子*NHS*が同定され (Burdon et al., 2003)、遺伝子機能の解明から先天性白内障発症機序の解明につながることもあり [Brooks et al., 2010]、先天性白内障において原因遺伝子同定は重要と考えられる。しかし、約2万個のヒト遺伝子から原因遺伝子を特定するためには、従来の手法では限界があった。最近、次世代シーケンサーを用い、遺伝子のエキソン部分のみを抽出し、配列を読み取るエキソーム解析により全ゲノム遺伝子のcoding領域の配列を読み取る技術が普及し、複数の原因遺伝子を持つ遺伝的異質性が強い疾患での解析に応用されている。また、この技術を応用し、これまで原因遺伝子が不明であった疾患についても原因遺伝子解析が可能となった。しかし、本手法を用いた原因遺伝子の特定には、解析対象の選択が必要であり、中でも表現型が一致した患者もしくは、家族内の罹患者のように、同じ遺伝子変異を

有する患者に絞り解析を進めることが重要である。

2. 研究の目的

先天性白内障家系を対象とし、1) 次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析により原因遺伝子の解明を目指す、2) 同定された原因遺伝子における遺伝型と表現型の相関を検討し、特有の臨床症状を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 患者検体収集

対象となる先天性白内障家系より罹患者5名 (女性3名、男性2名) 非罹患者男性2名より協力を得て血液、唾液採取を行い、抽出キットを用いてそれぞれのDNAを抽出した。そのうち、罹患者3名のDNAを用いてエキソーム解析を行った。SureSelectキット (Agilent Technologies社)を用い、エキソンキャプチャーを行った。得られたエキソン領域のみが含まれるDNAにアダプター配列を結合させ、フローセル上にDNAを結合させてクラスターを合成させた。Sequencing-by-Synthesis法により1塩基伸長反応を行い、画像をキャプチャーしてシーケンスを行った。

(2) 候補遺伝子単離

エキソーム解析により得られたデータを、Burrows-Wheeler Aligner (ver.0.5.9)を用いて the reference human genome (UCSC Genome Browser hg19)のデータを利用し、マッピングをおこなった。処理された結果を用いて、各種データベース (dbSNP131、CCDS、RefSeq、Encode) を使用し、報告のある一塩基多型等をデータから除外し、罹患者3人に共通する遺伝子変異の絞りこみを行った。

(3) 候補遺伝子の確認

絞り込んだ候補遺伝子の変異部位を含むエキソンとその近接領域の解析を行うため、各々の箇所についてオリゴプライマーを設計し、ダイレクトシーケンスを行った。シーケンスはABI BigDye Terminator Cycle

Sequencing Kit (Applied Biosystems社)を用いて反応を行い、ABI 3100 semi-automated sequencing analyzer (Applied Biosystems社)を用いて解析を行った。得られた解析データは FinchTV version 1.4.0 (Genospiza Inc.)および GENETYX software (Software Development)を用いて、正常配列との比較を行い変異箇所の確認を行った。

エキソーム解析を実施しなかった罹患者2名及び非罹患者2名で候補遺伝子の解析を行った。罹患者2名に認め、非罹患者2名には認めなかったものを病変変異の可能性が高いと考え、さらに候補遺伝子からの絞り込みを行った。また、さらに病変変異の予測ソフト (PolyPhen-2、SIFT) を用いて、変異部位の解析を行った。絞り込まれた候補遺伝子については健常日本人100人のDNAサンプルを用いて同変異をダイレクトシーケンスで解析を行った。

4. 研究成果

(1) 患者検体収集

本研究開始前にすでに収集されていた罹患者を除き、新たに罹患者2名、非罹患者2名のうち、3名は血液で、1名は唾液にて検体の収集を行い、各検体から解析可能なDNAを抽出した。

(2) 候補遺伝子単離

エキソーム解析を行った3人の罹患者に共通した変異は2231個検出された。そのうち、対象家系で考えられる遺伝形式に基づいて、データ処理を行い、最終的に候補遺伝子として6遺伝子に絞り込んだ。さらに、これまで先天性白内障の原因遺伝子として報告された29遺伝子について対象家系内において変異の有無を確認し、そのうちMAF遺伝子が候補遺伝子の中に含まれていることを確認した。対象家系で認められた塩基置換はこれまでに病変変異や一塩基多型として報告のない新規塩基置換であった。

続いて、エキソーム解析を行わなかった罹

患者2名、非罹患者2名のDNAを用いて候補である6遺伝子の塩基置換の有無を確認した。そのうち、罹患者2名で同定され、非罹患者2名で同定されなかった塩基置換を持つ候補遺伝子はMAF遺伝子のみであった。

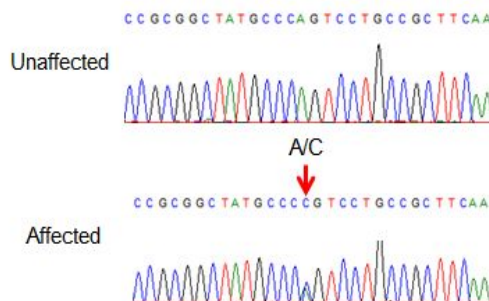


図1：同定された変異部位

(3) 候補遺伝子の確認

日本人健常人100人のDNAを用いて、対象家系で同定されたMAF遺伝子塩基置換を確認したところ、これらの集団100名、200アリの解析では同塩基置換は同定されなかった。以上より、対象家系で同定されたMAF遺伝子変異が病変であると考えられた。

これまでに白内障で同定されたMAF遺伝子変異はDNA-binding domainであるbasic region領域に集積しており(図2赤表記)、本家系の変異も同部位に存在していた。同変異は種をこえて保存されており、病変変異となると考えられた。

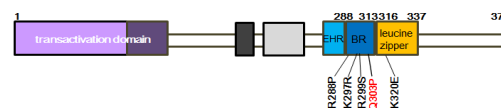


図2：MAF遺伝子と変異部位

MAF遺伝子変異による先天性白内障家系の報告はこれまでに世界で5家系の報告があり、うち1家系は染色体転座によりMAF遺伝子機能が障害されたと考えられ、残り4例は本対象家系と同じく一塩基置換によるミスセンス変異によるものであった。

これまで報告されたMAF遺伝子変異による

白内障患者との比較検討では、白内障症状の他に小角膜、虹彩コロボーマまたは両者を合併している報告を認め、本遺伝子変異の特徴的所見の一部と考えられた。また、眼以外の合併症の報告例は造血管腫瘍の報告が一例のみであり、対象家系男児例で認めた合併症の報告は認めなかったが、全報告者数が少ないことから、今後も同遺伝子変異の臨床所見の集積により表現型との相関検討の継続が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Narumi Y, Nishina S, Tokimitsu M, Aoki Y, Kosaki R, Wakui K, Azuma N, Murata T, Takada F, Fukushima Y, Kosho T. Identification of a novel missense mutation of *MAF* in a Japanese family with congenital cataract by whole exome sequencing: a clinical report and review of literature 2014 Am J Med Genet A: 査読有

(2) Narumi Y, Fueki N, Hayashi Y, Shiba N, Nishino I, Inaba Y, Kosho T, Fukushima Y, Nakamura A Availability of DMD mRNA transcripts analysis in a patient with dystrophinopathy having a nonsense mutation 2013 Journal of neurology & translational neuroscience 1:1005 査読有

〔学会発表〕(計3件)

(1) 鳴海洋子、仁科幸子、時光元温、青木洋子、小崎里華、涌井敬子、村田敏規、古庄知己、福島義光 先天性白内障家系における *MAF* 遺伝子遺伝子新規変異の同定 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月21日 仙台

(2) Narumi Y, Nishina S, Tokimitsu M, Aoki Y, Kosaki R, Kosho T, Murata T, Takada F, Fukushima Y Missense mutation of *MAF* in a Japanese family with congenital cataract

Annual Meeting American Society of Human Genetics 2013年10月23日 米国 ボストン

(3) 鳴海洋子、平林伸一、古庄知己、涌井敬子、福島義光 AKT シグナル伝達経路異常による MPPH 症候群の臨床像 2013年4月18日 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 洋子 (KISHIMOTO YOKO)

北里大学・医療系研究科・助教(特定雇用)

研究者番号: 60523074