

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861626

研究課題名(和文)日本人網膜色素変性患者におけるEYS遺伝子変異の迅速検査法の開発と臨床への応用

研究課題名(英文)The development and clinical application of EYS gene mutation diagnosis in Japanese Retinitis pigmentosa patients

研究代表者

細野 克博(Hosono, Katsuhiko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60402260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

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、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名の日本人arRPに対しEYSの変異解析を行い、18名の患者から7種の原因変異を同定した。更に我々はEYS遺伝子の片側アリルにのみ変異を認めたと9名の患者に対してエキソンレベルのコピー数異常を検討するためMLPA法を施行した。結果、1名にエキソンの欠失、もう1名にエキソンの重複を同定した。RP患者のEYS遺伝子や他の原因遺伝子においてコピー数変異が少なからず寄与している可能性が高い事がわかった。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) is a highly heterogeneous genetic disease with autosomal recessive (ar), autosomal dominant, or X-linked inheritance. We analyzed mutations of EYS and USH2A in Japanese arRP cases (total 100). The analysis of EYS for 100 RP patients elucidated 7 probable pathogenic mutations from 18 cases. Our recent analysis of the EYS using MLPA method to assay the copy number of each exon elucidated a case with an exon deletion and another case with an exon duplication from 9 patients in which only one probable causative mutation had been detected. It is quite possible that more of copy number mutations latently exist in EYS and others of RP patients.

研究分野：分子生物学、遺伝学

キーワード：網膜色素変性 EYS遺伝子

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ことが多い。

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おり(56.3%)、日本のRPの症例は孤発例を含むarRPが80%を占めている。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が孤発例に見えている可能性がある。

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、国立成育医療研究センター東範行教授、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100名のarRP患者を収集し、arRPの原因遺伝子の1つであるEYS(Eyes Shut Homolog)遺伝子の変異解析を実行した。結果、日本人arRP患者でEYS遺伝子に変異が検出される頻度は18%と大きく、特にc.4957_4958insA(p.S1653KfsX)とc.8868C>A(p.Y2956X)の2種類の変異は東アジアにおけるarRPの主要な原因変異の可能性のある事を明らかにした(Hosono K. et al., PLoS One 2012)。日本人のRP遺伝子診断システムを構築するためには、簡便かつ精密なEYS遺伝子の変異解析法の開発が重要である。しかし、EYS遺伝子はエキソン数が多く翻訳領域も長いいためゲノムDNAを用いた変異解析法は効率が悪い。申請者はEYS遺伝子の

mRNAが鼻腔粘細胞に発現していることを発見した。このことは国内外で未だに報告がなく世界初の知見と思われる。毛根cDNAを用いた変異解析法は既に報告されているが(Nakanishi H. et al., J. Hum. Genet. 2011)、鼻粘膜から検体を採取する方が患者にとって侵襲性は低い。また、採取法も専用の綿棒を鼻孔へ挿入し粘膜を擦過するだけなので簡便である。申請者は鼻粘膜から擦過した検体を用いて簡易で精密なEYS遺伝子の変異解析法の開発を計画した。

またEYS遺伝子に変異が同定されている患者の中で片側アリルの変異のみしか同定されていない患者が複数例見つかっている。変異が片側アレルにしか同定されなかった症例の原因の1つとして、変異が見つかっていない片側アリルの一部エキソン領域に欠失や重複が存在している可能性がある。その場合、PCRダイレクトシーケンス法では検出できないためにMLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)を用いてエキソンレベルのコピー数異常を検出する実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究は鼻粘膜から擦過した検体を用いて簡易で精密なEYS遺伝子の変異解析法を開発し、日本人RP患者の遺伝子診断に応用するための基礎データを収集することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 鼻粘膜cDNAを用いたEYS遺伝子の変異解析法の確立

鼻粘膜cDNAの合成とRT-PCR

鼻孔から鼻腔へ専用の滅菌された綿棒を挿入して粘膜を擦過し、RNAを抽出する。次に逆転写反応を行いtotal RNAからcDNAを合成して変異解析を行う。抽出精製されるRNAは微量であるので精製した検体ごとにG3PDH遺伝子を用いてRT-PCRを行いcDNA

が合成されているかどうか、ゲノム DNA の混入がないかどうかを確認する

EYS 遺伝子の cDNA クローニングと遺伝子構造解析

で合成した cDNA を用いて鼻粘膜に発現している *EYS* 遺伝子の構造を明らかにする。

(2) 変異探索

患者鼻粘膜 cDNA を用いて *EYS* 遺伝子の変異解析を行う。片側アレルの変異のみしか同定できなかった患者や片側アレルの欠失が疑われた患者に対して MLPA 解析を実施する。遺伝子変異を同定できた患者では、家族の検体を利用して分離解析を行う。

4 . 研究成果

正常人の鼻腔粘膜細胞から RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて鼻腔粘膜細胞に発現している *EYS* 遺伝子の構造解析を行った。結果、鼻腔粘膜細胞由来 cDNA からは、網膜で発現している *EYS* 遺伝子のエキソン 33 の一部とエキソン 34~44 の転写物を確認した。しかし、エキソン 1~32 の転写産物は RT-PCR 法では同定出来なかった。鼻腔粘膜で発現している主な *EYS* 遺伝子は、網膜で発現している転写物と異なる構造の転写物が発現している可能性が高い。鼻粘膜細胞由来 cDNA を用いて *EYS* 遺伝子の変異解析を行うには、鼻粘膜特異的に発現している *EYS* 遺伝子の遺伝子構造や発現量について更なる検討が必要である。また、片側アレルの変異のみしか原因変異を同定されていない 9 名の患者に *EYS* 遺伝子について MLPA 解析を行った。上記 9 名については 6 名から c.4957_4958insA、3 名から c.8868C>A 変異を同定している(Hosono K. et al., PLoS One 2012)。結果、c.4957_4958insA のヘテロ接合体患者(RP12H)から片側アレルのエキソン 1 とその周辺イントロン領域の欠失、c.8868C>A のヘテロ接合体患者(RP8H)から片側アレルのエキソン 23 とその周辺イン

トロン領域の重複が示唆された。RP12H については分離解析を行い、エキソン 1 の欠失アレルは母親由来であることが分かった。*EYS* 遺伝子の変異解析にエキソンレベルのコピー数変異の検討は重要である事がわかった。

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) Yang Zhao, Katsuhiko Hosono, Kimiko Suto, Chie Ishigami, Yuki Arai, Akiko Hikoya, Yasuhiko Hiramami, Masafumi Ohtsubo, Shinji Ueno, Hiroko Terasaki, Miho Sato, Hiroshi Nakanishi, Shiori Endo, Kunihiro Mizuta, Hiroyuki Mineta, Mineo Kondo, Masayo Takahashi, Shinsei Minoshima, Yoshihiro Hotta. The first *USH2A* mutation analysis of Japanese autosomal recessive retinitis pigmentosa patients: a totally different mutation profile with the lack of frequent mutations found in Caucasian patients. *J Hum Genet.* 査読有 59、2014、521-528. doi:10.1038/jhg.2014.65.
- (2) Kimiko Suto, Katsuhiko Hosono, Masayo Takahashi, Yasuhiko Hiramami, Yuki Arai, Yasunori Nagase, Shinji Ueno, Hiroko Terasaki, Shinsei Minoshima, Mineo Kondo, Yoshihiro Hotta. Clinical phenotype in ten unrelated Japanese patients with mutations in the *EYS* gene. *Ophthalmic Genet.* 査読有、35、2014、25-34. doi: 10.3109/13816810.2013.768673
- (3) C-X Wang, Katsuhiko Hosono, Masafumi Ohtsubo, Kentaro Ohishi. Jie Gao, Nobuo Nakanishi, Akiko Hikoya, Miho Sato, Yoshihiro Hotta, Shinsei Minoshima. Interaction between optineurin and the bZIP transcription factor NRL. *Cell Biol Int.* 査読

有、38、2014、16-25. doi: 10.1002/cbin.10174.

- (4) 鈴木寛子、浅井竜彦、藤田太一、細野克博、堀田喜裕、Thiel-Behnke 角膜ジストロフィーの1例、眼科、55(3):277-283、2013.

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Katsuhiro Hosono, Yang Zhao, Chie Ishigami, Shinji Ueno, Hiroshi Nakanishi, Hiroko Terasaki, Mineo Kondo, Masayo Takahashi, Shinsei Minoshima, and Yoshihiro Hotta, Mutation Analysis of the *USH2A* Gene in Japanese Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa, ARVO2014, May 5, 2014, Orland.

- (2) Katsuhiro Hosono, Yang Zhao, Kimiko Suto, Chie Ishigami, Yuuki Arai, Akiko Hikoya, Yasuhiko Hirami, Masafumi Ohtsubo, Shinji Ueno, Hiroko Terasaki, Miho Sato, Hiroshi Nakanishi, Shiori Endo, Kunihiro Mizuta, Hiroyuki Mineta, Mineo Kondo, Masayo Takahashi, Shinsei Minoshima, and Yoshihiro Hotta, The first *USH2A* mutation analysis of Japanese Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa patients: A totally different mutation profile with the lack of frequent mutations found in Caucasian patients, XVIth International Symposium on Retinal Degeneration, July 13-18, 2014, California.

- (3) Yuko Harada, Katsuhiro Hosono, , Akiko Hikoya, Shinsei Minoshima, Miho Sato, Yoshihiro Hotta, A twin with Leber congenital amaurosis possibly caused by the *GUCY2D* gene mutation, AAPOS-JAPO-JASA Joint Meeting, November 30th, 2014, Kyoto.

- (4) 細野克博、石上智愛、須藤希実子、荒井優

気、趙洋、水田邦博、峯田周幸、上野真治、寺崎浩子、近藤峰生、高橋政代、蓑島伸生、堀田喜裕、常染色体劣性網膜色素変性の日本人患者における *USH2A* 遺伝子の変異解析、第 118 回日本眼科学会総会、2014 年 4 月、東京

- (5) 永瀬康規 須藤希実子、細野克博、中西啓、水田邦博、峯田周幸、蓑島伸生、堀田喜裕、*USH2A* 遺伝子異常によるわが国の網膜色素変性の臨床像、第 68 回日本臨床眼科学会、2014 年 11 月 13 日、神戸

- (6) 堀田喜裕、細野克博、趙洋、須藤希実子、石上智愛、荒井優気、彦谷明子、平見恭彦、大坪正史、上野真治、寺崎浩子、佐藤美保、中西啓、遠藤志織、水田邦博、峯田周幸、近藤峰生、高橋政代、蓑島伸生、常染色体劣性網膜色素変性の日本人患者における *USH2A* 遺伝子の変異解析、日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会、2014 年 11 月 20 日、東京

- (7) 細野克博、石上智愛、高橋政代、朴 東浩、上野真治、萩原 章、山本修一、佐藤美保、寺崎浩子、金 仁澤、東 範行、近藤峰生、蓑島伸生、堀田喜裕、網膜色素変性と関連疾患における *EYS* 遺伝子の 2 種類の変異の分子遺伝学的解析、第 117 回日本眼科学会総会 2013 年 4 月 5 日、東京

- (8) 須藤希実子、細野克博、趙 洋、永瀬康規、水田邦博、峯田周幸、蓑島伸生、堀田喜裕、*USH2A* 遺伝子異常を認めた非症候性網膜色素変性の 3 症例、第 67 回日本臨床眼科学会、2013 年 11 月 2 日、横浜

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 細野克博、堀田喜裕、金原出版、眼と遺伝 2.網膜色素変性 眼科、2014、56、

569-574.

- (2) 堀田喜裕、細野克博、先端医学社、ゲノムと網膜関連疾患の関与を探る 網膜色素変性 *RETINA Medicine*、2014、3、26-32.

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕
シンポジウム発表

- (1) Katsuhiko Hosono, Molecular Genetics of Retinitis Pigmentosa in East Asian Populations, WOC2014, April 3rd, Tokyo.

- (2) 細野克博、わが国の網膜色素変性患者の遺伝子解析の現状と近未来の可能性、第61回日本臨床視覚電気生理学会、2013年10月4日、大阪

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) 連携研究者

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

東 範行 (AZUMA NORIYUKI)

独立行政法人国立成育医療研究センター
一・感覚器・形態外科部・医長
研究者番号：10159395