

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861445

研究課題名(和文) 遺伝性網膜変性疾患のtarget exon sequencing

研究課題名(英文) Targeted exome sequencing for the genotyping of inherited retinal dystrophy

研究代表者

荻野 顕(Ogino, Ken)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70622629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の遺伝性網膜変性患者において次世代シーケンサーを用いて原因遺伝子変異を約40%で検出することができた。また、遺伝子変異ごとの患者の視力などの眼科所見について比較した。多くの網膜色素変性では原因遺伝子が異なっても臨床所見はオーバーラップすることが確認することができた。日本人の網膜色素変性ではEYS遺伝子、USH2A遺伝子、RHO遺伝子が原因変異として多いことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We achieved the genotype screening in a Japanese cohort of inherited retinal diseases using next generation sequencing. The results of screening were analyzed with the result of the clinical examination. The clinical features in retinitis pigmentosa were overlapped in many genes.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜色素変性 錐体-桿体ジストロフィー 遺伝子検査 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

遺伝性網膜変性疾患 (inherited retinal dystrophy, IRD) は網膜色素変性、錐体ジストロフィー、クリスタリン網膜症、黄斑ジストロフィー、白点状眼底など単一遺伝子の変異によって起こると考えられている網膜疾患の総称である。これらのうち、クリスタリン網膜症、白点状眼底については、原因遺伝子が一つか二つであるのに対し、網膜色素変性、錐体ジストロフィー、黄斑ジストロフィーについては原因遺伝子が 60 以上も知られており、heterogeneous な疾患群である。これらの疾患は現在まで自覚症状を改善する有効な治療法が確立されておらず、その遺伝的背景を調べることは単に研究者の欲求を満足させるためだけのものであり、本邦では 2000 年以降 systematic にスクリーニングされることは少なかった。しかし、近年、RPE65 遺伝子異常の Leber 先天盲に対する遺伝子治療や ES 細胞を用いた Stargardt 病に対する再生医療が報告されるようになり、現在フォローアップ中の患者の遺伝的背景を調査することが急務となっている。

我々は 2009 年から京都大学附属病院通院中の IRD 患者からの全血サンプルの採取を開始し、2010-2011 年には 87 検体についてマイクロアレイを用いた網羅的スクリーニングを行った。しかし、マイクロアレイに載っている変異は主に白人で認められる変異であり、錐体ジストロフィー、黄斑ジストロフィー、Leber 先天盲、クリスタリン網膜症では比較的高率に原因と考えられる変異を検出したが、網膜色素変性ではほとんど原因変異を特定することはできなかった。(Ogino et al. Nihon Ganka Gakkai Zasshi 2012) 2012 年には常染色体劣性遺伝の網膜色素変性の原因遺伝子として EYS 遺伝子が本邦でも寄与率が高いということが報告され、国立障害者リハビリテーションセンターと共同でスクリーニングを行い、22/210 症例での診断が確定した。

2005 年に登場した次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析 (next generation sequencing, NGS) が、急速に広がっており、exome sequencing や whole genome sequencing も安価になり、IRD を対象とした報告も散見されるようになってきている。また、exon 全部や genome 全体を解析するのではなく、候補遺伝子のみを選択した target exon sequencing も従来のサンガー法と比較して、はるかに効率よく NGS では解析できる。この方法を利用して我々は 2013 年に IRD 患者 427 症例に対し 384 遺伝子を米国の National Institute of Health (NIH) と共同で検索中であった。

当研究室の特徴としては、国内では最大規模 (1000 名以上) の IRD 患者の臨床データが存在することであり、2009 年から開始したこれらの患者からの血液サンプルについては 800 以上となっている。また患者のみならず、

患者家族からの血液サンプルも得ており、原因遺伝子の特定へのインフラは整っていた。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、日本人の遺伝性網膜変性疾患における遺伝的背景をスクリーニングすることである。具体的には次世代シーケンサーを用いて網膜変性疾患の遺伝子を target sequencing し、既知の変異、新規変異を検出する。日本人の遺伝性網膜変性疾患、特に網膜色素変性においては原因遺伝子の同定は 10-30% 程度に留まっているが、これは従来の Sanger sequencing で少ない遺伝子のみを解析しているからであり、次世代シーケンサー、既知の変異データベース、ならびに日本人の正常 variant データベースを利用することで、50-70% の原因変異同定を目指す。また、原因変異を同定した症例については表現型との比較を行う。

3. 研究の方法

研究 1. IRD 患者における既知の変異検索
Agilent 社 Haloplex により capture し、Illumina 社 HiSeq2000 により読取った read は mapping、variant call された後、当研究室に納品されている。HGMD professional および Alamut software により、報告された 427 症例の SNV について検索を行った。

研究 2. 遺伝子型と表現型の比較 (genotype-phenotype correlation)

今回遺伝子スクリーニングを行っている IRD 患者は、2008 年から 2013 年まで、光干渉断層計 (OCT) 検査、静的視野検査、視力検査が半年おきに行われており、遺伝子型による 5 年間の経時変化を検討する。

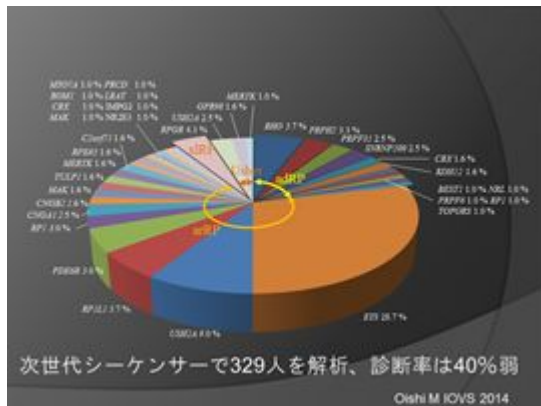
4. 研究成果

日本人の網膜色素変性患者および Usher 症候群患者 329 名に対し、次世代シーケンサーを用いて、網膜変性疾患関連遺伝子 193 遺伝子を網羅的にシーケンスを行った。網膜色素変性患者 317 名中 115 名、Usher 症候群患者 12 名中 6 名において分子遺伝学的診断を行うことができた。EYS 遺伝子、USH2A 遺伝子、RHO 遺伝子異常による網膜色素変性が多く認められた。またこれまで網膜色素変性の原因変異として報告されていた 189 遺伝子のうち、55 変異は日本人の正常データベースで頻度の高い変異であり、網膜色素変性の原因変異ではないことが判明した。

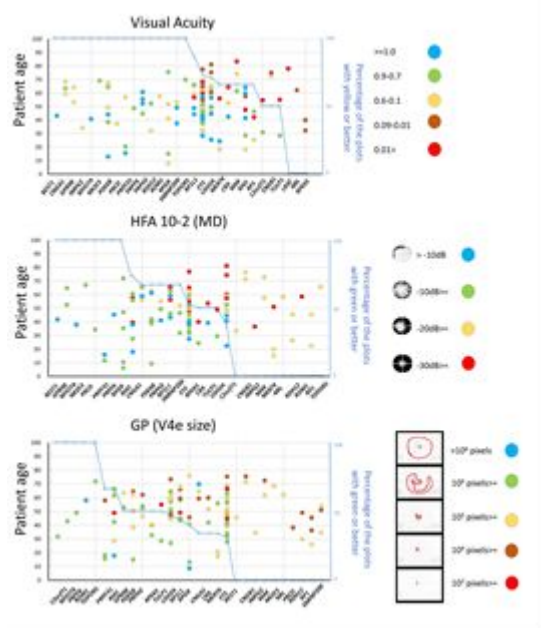
日本人の錐体-桿体ジストロフィー患者 43 名に対して、上と同様の網羅的シーケンスを行った。43 名中 12 名で原因変異を同定した。原因遺伝子は ABCA4、CDHR1、CRB1、CRX、GUCY2D、KCNV2、PROM1、PRPH2、RDH5 と多岐にわたり、錐体-桿体ジストロフィーが heterogenous な遺伝的背景を持つことが判明した。

分子遺伝学的診断の確定した 121 名の網膜色素変性患者および錐体-桿体ジストロフィー

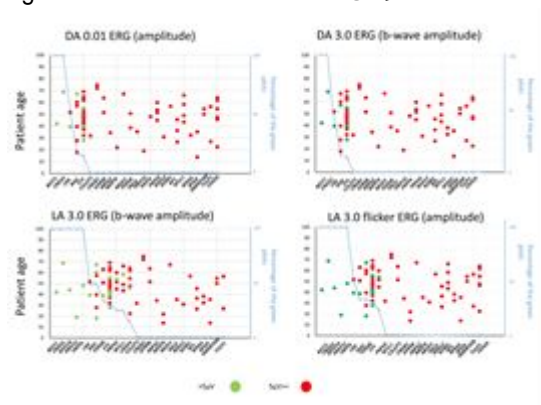
患者の臨床所見を列散布図を用いて、評価した。PDE6B, PRPH2, RPGR 変異を持つ患者、RP1L1 およびUSH2A 変異を持つ 55 歳以下の患者は視力 0.1 以上を保っていた。RPGR 変異を持つ患者のうち半分は錐体 ERG が残存していた。



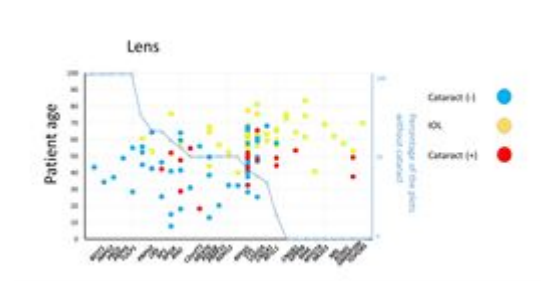
Oishi M. et al IOVS. 2014 より



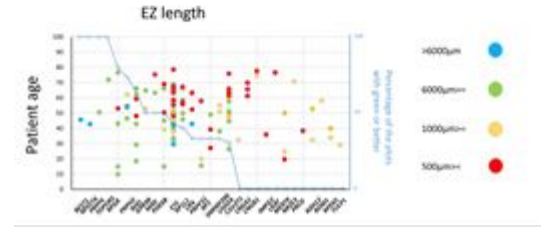
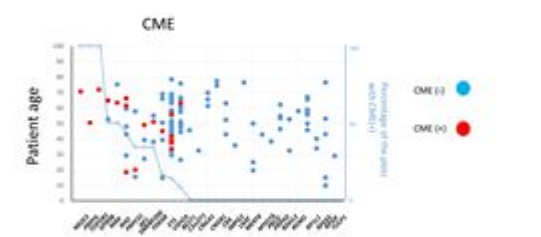
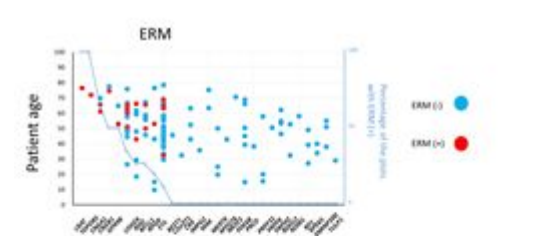
Ogino K. et al TVST. 2016 より



Ogino K. et al TVST. 2016 より



Ogino K. et al TVST. 2016 より



Ogino K. et al TVST. 2016 より

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)
Ogino K, Oishi A, Oishi M, Gotoh N, Morooka S, Sugahara M, Hasegawa T, Miyata M, Yoshimura N. Efficacy of Column Scatter Plots for Presenting Retinitis Pigmentosa Phenotypes in a Japanese Cohort. *Transl Vis Sci Technol.* 2016.5:4

Oishi M, Oishi A, Gotoh N, Ogino K, Higasa K, Iida K, Makiyama Y, Morooka S, Matsuda F, Yoshimura N. Next-generation sequencing-based comprehensive molecular analysis of 43 Japanese patients with cone and cone-rod dystrophies. *Mol Vis.*2016.22:150-60

Furutani Y, Ogino K, Oishi A, Gotoh N, Makiyama Y, Oishi M, Kurimoto M, Yoshimura N. Intra-familial Similarity of Wide-Field Fundus Autofluorescence in Inherited Retinal Dystrophy. *Adv Exp Med Biol.* 2016.854:299-305

Shimizu K, Oishi A, Oishi M, Ogino K, Morooka S, Sugahara M, Gotoh N, Yoshimura N. Next-Generation Sequencing-Based Molecular Diagnosis of Choroideremia. Case Rep Ophthalmol. 2015.6:246-50

Ogino K, Oishi M, Oishi A, Morooka S, Sugahara M, Gotoh N, Kurimoto M, Yoshimura N. Radial fundus autofluorescence in the periphery in patients with X-linked retinitis pigmentosa. Clin Ophthalmol. 2015.9:1467-74

Oishi M, Oishi A, Gotoh N, Ogino K, Higasa K, Iida K, Makiyama Y, Morooka S, Matsuda F, Yoshimura N. Comprehensive molecular diagnosis of a large cohort of Japanese retinitis pigmentosa and Usher syndrome patients by next-generation sequencing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2014.55:7369-75

〔雑誌論文〕(計 6 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻野 顕 (OGINO Ken) 京都大学・大学院医学研究科眼科学・助教

研究者番号：70622629

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

