

厚生労働科学研究費補助金  
感覚器障害研究事業

網膜色素変性症の原因遺伝子の探索に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 誠志

平成15(2003)年4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 網膜色素変性症の原因遺伝子の探索に関する研究 ----- 1  
加藤誠志

### II. 分担研究報告

1. 網膜色素変性症の原因遺伝子の探索に関する研究 ----- 4  
築島謙次

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
総括研究報告書

網膜色素変性症の原因遺伝子の探索に関する研究

主任研究者 加藤 誠志

国立身体障害者リハビリテーションセンター研究所障害工学研究部長

研究要旨 本研究は、視覚障害の主要因である網膜色素変性症の原因となる新しい遺伝子を見つけることを目的とする。これまで少数の原因遺伝子しか見つかっていない網膜色素上皮細胞由来の遺伝子を対象とする。新しく開発した完全長cDNA合成法「G-キャッピング法」を用いてヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19から完全長cDNAライブラリーを作製した。このライブラリーに含まれる4,490クローンの部分塩基配列を解析した結果、95.2%にあたる4,276クローンがキャップ部位からポリAテールまでを含む完全長cDNAを有しており、1,239種類の遺伝子に分類できた。この中にはデータベースに遺伝子として登録されていない新規なものが20個含まれていた。また、47名の網膜色素変性症患者のゲノムDNAを収集することができた。今後、網膜色素変性症患者のゲノムDNAを用いて、新しく同定された網膜色素上皮細胞由来遺伝子の変異の有無を検討する。

分担研究者 築島謙次（国立身体障害者リハビリテーションセンター病院第三機能回復訓練部部長）

列を決定し、この配列をデータベースに登録されているヒト遺伝子の配列と比較することによって、網膜色素上皮細胞に特異的に発現している遺伝子を同定した。

（2）網膜色素変性症患者のゲノム解析

当センター病院眼科外来に来院した視覚障害者の中から網膜色素変性症を発症していると思われる患者を選び、この中でインフォームド・コンセントを得ることができた患者から14mlの血液を採取した（分担研究者）。血液サンプルからゲノムDNAを抽出し、今後のゲノム解析の材料とした。

（倫理面への配慮）

網膜色素変性症患者のゲノム解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に相当する。そこで、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守し、下記の点に留意して研究を進めた。研究計画については、国立身体障害者リハビリテーションセンター遺伝子解析研究倫理審査委員会において審査を受け承認を得た。視覚障害者の方々には遺伝子試料（血液）を提供してもらうにあたっては十分なインフォームド・コンセントを得た。血液サンプルは個人識別情報管理者によって連結可能匿名化を行なった後、研究に使用した。

A. 研究目的

視覚障害の主要因である網膜色素変性症の多くは遺伝性の疾患であり、診断・治療のためには原因遺伝子の特定が不可欠である。本研究は、網膜色素変性症の原因となる新しい遺伝子を見つけることを目的として行う。網膜色素変性症を引き起こす原因遺伝子は多様であることが知られており、これまでにすでに40種類以上の原因遺伝子が報告されている。本研究では、これまであまり注目されてこなかった網膜色素上皮細胞で発現している遺伝子の中から網膜色素変性症の原因遺伝子を見つけることを目標とする。

B. 研究方法

（1）網膜色素上皮細胞で特異的に発現している遺伝子の取得

ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19からmRNAを単離・精製した。このmRNAを鋳型にして新しく開発した完全長cDNA合成法「G-キャッピング法」を用いて、完全長cDNAライブラリーを作製した。ライブラリーから任意に選択したcDNAクローンの5'末端の部分配

## C. 研究結果

### (1) 網膜色素上皮細胞完全長cDNAライブラリーの作製

ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19を大量培養し、約100  $\mu$ gの高純度mRNAを単離・精製した。このmRNAを鋳型にして、加藤らが以前開発したDNA-RNAキメラオリゴキャッピング法により、完全長cDNAライブラリーの作製を試みたが、良質のライブラリーを作製できなかった。そこでDNA-RNAキメラオリゴキャッピング法の反応工程を全面的に見直し、全く異なる原理に基づく新しい完全長cDNA合成法「G-キャッピング法」を開発した。

この方法を用いて、ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19から単離精製したmRNAを鋳型にして、完全長含有率95%（従来法では70%）という高品質の完全長cDNAライブラリーを作製できた。

### (2) 網膜色素上皮細胞特異的発現遺伝子の選別

上記の完全長cDNAライブラリーから、cDNAクローンを無作為に約6,000クローン選択し、それぞれの5'末端の部分塩基配列約800bpを決定した。塩基配列が確実に読めた4,490クローンについて、データベース検索 (BLAST) を行なったところ、4,276クローン (95.2%) がキャップ部位からポリAテールまでを含む完全長cDNAを有していた。これらのクローンは、1,239種類の遺伝子に分類できた。上記で取得した完全長cDNAクローンのほとんどはすでにデータベースに登録されている既知の遺伝子 (ESTのみと一致するものを除く) であったが、新規cDNAクローンも20種類得られた。これらの多くは、網膜色素上皮細胞に特異的に発現している遺伝子と考えられる。

### (3) 網膜色素変性症患者のゲノムDNA収集

当センター病院眼科外来に来院した視覚障害者の中から網膜色素変性症を発症していると思われる患者を選び、この中でインフォームド・コンセントを得ることができた47名の患者から14mlの血液を採取した。連結可能匿名化された血液サンプルから、平均300  $\mu$ gのゲノムDNAを精製できた。

## D. 考察

本研究の成否は、完全長cDNAの品質にかかっている。今回新しく開発した方法を用いることによって、完全長含有率95%という高品質の完全長cDNAライブラリーを作製できたため、研究効率の大幅な向上がはかられた。事実、約4,500クローンの解析によって、1,239種類もの完全長cDNAを取得することができた。これは従来法では考えられない高効率である。また、データベースに登録されていない新規クローンも20種類同定できた。今後、ライブラリーの残りのクローンの解析を進めることによって、さらに多くの新規クローンの同定が期待できる。

網膜色素変性症患者のゲノムDNA収集に関しては、多くの網膜色素変性症患者の方の協力を得ることができ、予想以上のペースでDNAサンプルの収集が進行している。このペースでいけば、来年度は100検体以上の収集が期待でき、それだけ新規原因遺伝子が見つかる可能性も高くなると思われる。

## E. 結論

ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19から完全長含有率95%という高品質の完全長cDNAライブラリーを作製でき、この中から網膜色素上皮細胞に特異的に発現していると考えられる候補遺伝子を20個選別することができた。また、47名の網膜色素変性症患者のゲノムDNAを収集することができた。このように当初設定した二つの大きな目標が達成され、今後これらの材料を用いることによって、網膜色素変性症の新規原因遺伝子探索への道が開かれた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

1) 大床国世, 加藤エリ奈, 押川未央, 宇佐美論, 掘越弘毅, 木村知子, 加藤誠志. “ヒト網膜色素上皮細胞株ARPE-19並びにブタ網膜由来の完全長cDNA解析”. 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集. 横浜, 2002-12, 日本分子生物学会. 2002, p. 716.

2) Kato, S., Ohtoko, K. “Retinal pigment epithelium-derived full-length cDNA

collection”, The 8<sup>th</sup> Human Genome Meeting  
HGM2003, Cancun, Mexico, 2003-4 発表予  
定.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

1) 国立身体障害者リハビリテーションセ  
ンター, 日立計測器サービス(株), 加藤誠  
志. 加藤誠志, 大床国世, 木村知子, 「cDN  
A合成方法」, 特願2003-91373.

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

網膜色素変性症の原因遺伝子の探索に関する研究

主任研究者 築島 謙次

国立身体障害者リハビリテーションセンター病院第三機能回復訓練部部长

研究要旨 日本における視覚障害の主要原因は網膜色素変性症である。特に更生援護施設や視覚障害者の訓練施設に入所する人たちの4人～5人に一人は網膜色素変性症である。我が国において視覚障害者の問題を考えるときに網膜色素変性症は最も重要な疾患である。最近の遺伝子工学の進歩により、多くの原因遺伝子が見つかってはいるが将来の遺伝子治療を考えると十分ではなく、さらなる原因遺伝子の究明が不可欠である。国立身体障害者リハビリテーションセンター病院眼科には、全国から網膜色素変性症の患者がロービジョンケアを求めて来院するため、多数の網膜色素変性症患者が来院する。それらの患者さんの協力のもと原因遺伝子の究明を行なう。

A. 研究目的

網膜色素上皮細胞で発現している遺伝子の中から網膜色素変性症の原因遺伝子の究明を目的としている。

B. 研究方法

1. 対象

国立リハビリテーションセンター病院眼科通院中の網膜色素変性症患者を対象として、当該研究について十分な理解が得られ、自主的に協力を申し出てくれた患者から採血が行われた。

2. 方法

受け持ち医ではない医師が研究に対する協力をお願いし、協力をお願いいただける場合に、網膜色素変性症の遺伝子究明のための研究協力の説明及び同意書を渡し、同意いただけた場合には、本人が署名できる場合には本人に、視覚障害のために署名不可能な場合には説明者が患者の同意のもと代理署名をした。その後説明を行った医師が7mlの試験管二本に採血を行った。採血した試験管にはプライバシー保護のためにコード化された番号の書かれたテープが貼られ、個人識別情報管理者によって連結可能匿名化を行なった後、研究所に運ばれた。サンプルはその間4℃で保存された。採血を行なった患者の臨床データとして、視力検査、視野検査はもちろんのこと、無

散瞳眼底撮影や蛍光造影撮影、網膜電図の記録が行われた。しかし必ずしも全ての患者で、全ての臨床データが得られたわけではなく、遺伝子の研究で必要となったときに足りない部分のデータを集めることとし、採血の段階では全ての臨床データ収集を強要しなかった。

C. 研究結果

現時点では47名の網膜色素変性症患者から採血をすることが出来た。網膜色素変性症はいろいろの遺伝形式で遺伝することが知られている。またはっきりと遺伝形式が特定できないケースもあり、今回採血した47人には明らかに、性染色体性劣性遺伝、常染色体性優性遺伝、常染色体性劣性遺伝の患者が含まれ、聴覚障害を合併するUsher症候群の患者も含まれている。臨床的な観点からも、原発性と言われる古典的なものから、区画型や中心部から臨床像が変化する逆型も含まれている。また意見の分かれるところではあるが、骨小体様の色素沈着がほとんどない無色素性網膜色素変性症も含まれている。

D. 考察

今年度は採血に集中していたので特別な問題には遭遇しなかった。しかしながら患者は自分の原因遺伝子について知りたいが、

散瞳して検査したり、蛍光造影検査等にはかなりの拒否反応があった。従来からの眼科医療における検査は、検査のための検査で、患者にとって何のメリットもなく、特に国立身体障害者リハビリテーションセンター病院のロービジョン外来を受診するまでは、眼科医に対する不信感が強く、今回もまた同じように検査のための検査をやられるのではないかとの不安から臨床検査データをとることに問題があった。そのため今回は採血の段階で全ての臨床データの収集は強要しなかった。

#### E. 結論

平成15年3月27日現在47名の網膜色素変性症患者から採血し、サンプル収集を行なった。しかしこれだけのサンプルでは研究を続けるのに十分ではなく、さらなるサンプルの収集につとめる必要がある。さらに臨床データの収集にもつとめる必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。