

200936059A

**厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)**

**先天性難治性網膜・視神経障害に対する  
生体試料の収集及び病態把握に資する  
遺伝子バンクの創生**

**平成21年度 総括・分担研究報告書**

**平成22年(2010年)3月**

**研究代表者 東 範 行  
(国立成育医療センター眼科医長)**

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

先天性難治性網膜・視神経障害に対する  
生体試料の収集及び病態把握に資する  
遺伝子バンクの創生

(課題番号H21-難治-一般-004)

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22年(2010年)3月

研究代表者 東 範 行  
(国立成育医療センター眼科医長)

## 目 次

### I. 総括研究報告書

先天性難治性網膜・視神経障害に対する生体試料の収集  
及び病態把握に資する遺伝子バンクの創生

東 範行 国立成育医療センター 眼科

1

### II. 分担研究報告書

#### 1. 遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析

東 範行 国立成育医療センター 眼科

9

#### 2. 先天性網膜・視神経障害の遺伝子解析

堀田 喜裕 浜松医科大学 眼科学講座

12

#### 3. 生体試料の培養条件の確立および遺伝子解析

梅澤 明弘 国立成育医療センター 研究所生殖・細胞医療研究部

15

#### 4. 難病研究資源バンクにおける疾患患者試料収集におけるシステム化に関する研究

亀岡 洋祐 独立行政法人医薬基盤研究所

17

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

22

### IV. 研究成果の刊行物、別刷

26

先天性難治性網膜・視神経障害に対する生体試料の収集  
及び病態把握に資する遺伝子バンクの創生

研究代表者 東 範行 国立成育医療センター 眼科医長

研究要旨：先天性難治性網膜・視神経障害の多くは、網膜及び視神経を構築する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の障害によって、出生時あるいは成長時に発病し、両眼に重篤な視覚障害をもたらす。いくつかの原因遺伝子は判明しているものの、多くは不明である。希少疾患が多いので、今後の研究、医療行政を考えるために、症例の収集とバンクへの登録の価値は大きい。本研究では、遺伝性・先天性眼疾患患者検体を収集し、遺伝子解析を行うとともに、培養細胞株の確立も試みることを目的とする。国立成育医療センターでは、先天性視神経形成異常および網膜変性に伴う視神経障害症例を集積し、経時的な臨床データを把握した。先天視神経形成異常と無虹彩の遺伝子解析を行い、PAX6 遺伝子の新たな変異を発見した。Leber 先天黒内障のゲノムを集積し、遺伝子変異の検索を開始した。また、手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、iPS 細胞作製を準備している。浜松医科大学では、眼白子、先天無虹彩、眼底白点症の遺伝子解析を行い、前二者について、それぞれ、GPR143 と PAX6 の遺伝子変異を同定した。全例について B リンパ芽球様細胞株樹立に成功した。今回得られた生体試料、解析した遺伝子変異、B リンパ芽球様細胞株、臨床症状等に関する情報を、バンク登録する方針である。

本研究により収集された患者試料を集中化して品質管理を行う「難病研究資源バンク」を創設に伴う問題点を検討し、統合的管理・支援体制を整備し、品質管理された試料を公平に基礎研究機関に提供するシステム構築を目指している。収集研究班へのアンケート調査および収集研究班担当者との討議により患者試料収集に係る単純ではない問題点を明確にすることができた。また基盤研究所内部での難病研究資源バンク専属の医学研究倫理審査委員会を設立することができた。システム整備に関しては、患者試料を処理・検査・保管管理のための施設・機器の整備を行うとともに、コード管理システムの構築を行った。

#### A. 研究目的

先天性難治性網膜・視神経障害の多くは、網膜及び視神経を構築する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の障害によって、出生時あるいは成長時に発病し、両眼に重篤な視覚障害をもたらす。いくつかの原因遺伝子は判明しているものの、多くは不明である。しかし、最近重篤な網膜障害であるレーベル黒内障において欠損遺伝子を補充することにより、視力が改善した臨床報告が行われ、従来は治療不能であると思われていた疾病の治療可能が開けた。そこで本研究では希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害について国立成育医療センターの特徴を生かした生体試料の収集を行うとともに由来組織からの iPS 細胞の樹立を試みる。

国立成育医療センターでは、既に先天性難治

性網膜・視神経障害の治療のために全国各地より患者を受け入れており、日本国内において当該患者数は随一である。本研究では、国立成育医療センターのこうした特徴を生かし、先天性難治性網膜・視神経障害の患者より組織（主に血液）の提供を受け、遺伝子を抽出し、バンク登録を行う。可能であれば組織より細胞株の樹立を行う。我々の樹立した細胞株を日本国内の公的細胞バンク（独立行政法人理化学研究所、独立行政法人 医薬基盤研究所）に登録し、他の研究施設より要請があった場合に提供できる体制を構築する。また、遺伝子の変異に関する情報を発信する。本研究で提供される細胞および遺伝子は、日本国内で進められている様々な先天性難治性網膜・視神経障害に対する治療法の開発材料として極めて価値が高いものであり、その遺伝子および細胞の蓄積は日本国の

資産とも言えるものである。また、バンク化された細胞を用いた iPS 細胞の樹立研究も行えることから、発生学的な病態解明の重要な礎となる。これらの疾患に対する遺伝子発現データベース・分化形質・ゲノム情報を伴った提供システムの構築ならびに技術革新は極めて重要で、本研究は先天性難治性網膜・視神経障害克服への基盤資源となる。

## B. 研究方法

### 1. 国立成育医療センターにおける遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析

#### 1) 経時的な臨床データの把握

国立成育医療センターにおいては、通常の視力や眼底検査のみならず、眼底の撮影、光断層干渉計を用いた病理レベルでの視神経の生体観察、電気生理学的検査による視神経の機能など、最新の形態ならびに機能測定を乳幼児から全身麻酔で行えるシステムが確立されている。これらを用いて、疾患の発症時より経時的に病態の変化を微細構造および機能について計測し、経時的にそのデータを集積した。

#### 2) ゲノムおよび株化リンパ球の集積

先天性視神経形成異常および、網膜変性に伴う視神経障害症例で、末梢血白血球よりゲノムを抽出し、株化リンパ球を作成した。

#### 3) 先天視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

遺伝性視神経形成異常、無虹彩に伴う視神経形成異常のゲノムを集積し、眼形成遺伝子 PAX6 の変異解析を行った。また、培養細胞において、みつけた PAX6 変異の機能的意義も検討した。

#### 4) 先天性網膜形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

Leber 先天黒内障のゲノムを集積し、今後の CRX、RP65 遺伝子等の変異解析を準備した。

#### 5) 眼由来細胞からの iPS 細胞作成の準備

手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、iPS 細胞作成を開始した。

#### 6) 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料に関してバンク登録と寄託を行っていく。

(倫理面への配慮)

#### 1) 診療および生体試料の収集に関する倫理

本研究における検査・手術はいずれも健康保険法上で承認された医療行為であり、実施に際しては、患者もしくは保護者に対するインフォームドコンセントを行い、同意を得ている。生体資料の収集に際しては、以下に述べる倫理委員会の承認のもとに、患者もしくは保護者に対するインフォームドコンセントを行い、同意を得ている。

#### 2) ヒト遺伝子および細胞に対する倫理

当センターにおいては、先天奇形症候群の遺

伝子解析に関して (国立成育医療センター研究所、受付番号 39、平成 15 年承認)、ヒト細胞の培養研究に関して (国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26、27、平成 15 年承認、受付番号 49、平成 15 年承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月承認、受付番号 146、平成 17 年承認、受付番号 156、平成 17 年承認、受付番号 197、201、平成 18 年承認、受付番号 237、238、平成 19 年承認)、既に倫理審査を受け、承認を受けている。これらのうち、樹立細胞は、公的細胞バンクへの寄託についても審査され承認を得ている。今後はさらに、研究分担者を含めて、本研究に所属するすべての施設で得られた生体資料、ゲノムおよび樹立細胞を、独立行政法人医薬基盤研究所に登録し、他の研究施設の要請があれば提供できる、包括的な倫理審査を準備中である。

### 2. 浜松医科大学における遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析

浜松医科大学眼科を受診した 3 名の遺伝性眼疾患の患者 (眼白子症、先天無虹彩、眼底白点症) より末梢血を収集し、各疾患原因遺伝子の変異解析を行った。また同患者の末梢血より B リンパ芽球様細胞株の樹立も行った。実験方法を下記に示す。

#### 1. 疾患原因遺伝子の変異解析

患者の末梢血より DNA を抽出し、疾患原因遺伝子の全エクソンと周囲のイントロン配列を PCR 法により増幅する。PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定する。

#### 2. B リンパ芽球様細胞株の樹立

患者の末梢血よりリンパ球を抽出し、EB ウィルス (Epstein-Barr virus) に感染させる。その後、活発に増殖する B リンパ芽球様細胞が得られるまで培養と継代を続ける。

#### 3. 症例の詳細は下記に示すとおりである。

##### a. 眼白子

4カ月男児、生後3カ月で眼と皮膚の色と、眼球振盪が気になり、近くの病院の小児科を受診し、典型的ではないが白子症による黄斑低形成と言われた。眼所見が強いので、5カ月時に当院眼科を受診した。母親の眼底はモザイク様のキャリアーの眼底であり、臨床所見から眼白子と診断した。遺伝相談では両親が、皮膚、頭髪の色が淡く、眼皮膚白子症にはいろいろな種類があり、紫外線暴露に対する不安を訴え、確定診断できるならと遺伝子診断を強く希望した。

##### b. 先天無虹彩

生後9日の男児、産科医により左眼の混濁を指摘され本学眼科を受診した。両眼の虹彩は欠損し、左眼の水晶体は前房側へ移行し角膜に付着して



いた。生後2ヶ月の眼底検査より両眼に黄斑低形成と眼振が見られた。遺伝相談では両親が遺伝子診断を強く希望した。

### c. 眼底白点症

30歳女性、2歳ごろから薄暗い時間になると見えにくいと訴えていた。症状が持続するため、6歳9カ月時に近くの眼科初診。精査目的に別病院眼科紹介受診となり、眼底白点症が疑われ、精査加療目的に本学眼科紹介受診となった。初診時の眼底では両眼黄斑周囲から周辺部にかけて白点の散在が見られた。20歳頃より視力低下を起し、眼底検査、網膜電図では典型例と異なっており、確定診断のため遺伝子診断を行った。

#### (倫理面への配慮)

当該研究に関する遺伝子及び組織の収集にあたり、浜松医科大学の倫理委員会(ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会承認番号19-18:平成19年11月。医の倫理委員会承認番号19-118:平成19年11月)の承認を受けた。生体試料(血液)は、同意を得た患者または保護者より提供を受けた。採血前に本研究の研究内容、協力の任意性と撤回の自由、研究計画書等の開示、個人情報保護、提供者の利益および不利益、解析結果の通知、研究成果の公表、研究終了後の試料等の取扱いの方針、知的財産権、費用、遺伝カウンセリング等について詳しく説明し、インフォームドコンセントを書面で得られたもののみを対象とした。提供された検体は、適切な状態で保存し、将来の遺伝子解析を含む医学研究に応用されることを本人が承諾した場合のみバンク登録の対象とする。本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)及び、「疫学研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省)を遵守して行う。

### 3. 生体試料の培養条件の確立および遺伝子解析

#### 1) 生体試料収集と由来遺伝子・組織由来細胞の調整とプロファイリング

既に国立成育医療センター・倫理委員会にて承認を受けた、先天性難治性網膜・視神経障害患者由来組織から細胞の単離・精製を行う。これらの組織の遺伝子発現を網羅的に解析する。

#### 2) 細胞樹立の試み

希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害患者に由来する細胞の樹立を行う。国立成育医療センター研究所生殖医療研究部では細胞研究を常時行っており、細胞取扱いのノウハウが蓄積されている。生体試料の入手と同時に細胞樹立研究を行うことで、より実践的な病態解明が可能となる。

#### 3) 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料(細胞)に関してバンク登録と寄託を行っていく。

(倫理面への配慮)

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の樹立と基礎研究応用に関し、既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91、平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認、受付番号197、201、平成18年6月承認、受付番号237、238、平成19年11月承認、受付番号293、315、平成20年10月承認、受付番号319、平成20年12月承認、承認番号350、平成22年1月)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

### 4. 難病研究資源バンクにおける疾患患者試料収集におけるシステム化に関する研究

難治性疾患克服研究事業の対象疾患は指定130疾患と多岐にわたり個々の疾患の克服研究を進める上で有用な研究試料も多種類にわたる。疾患の性質により、研究資源として収集される生体試料は多種類に及ぶ。しかし、基本は血液などの採取しやすい試料が大勢を占めると考えられる。そこで、まず血液から得られる試料の基本操作方法や自動システム、分離された細胞・血漿・DNAなどの分離試料の分注凍結保存を行うに当たり、2次元バーコードチューブ(2Dチューブ)システムを導入し、電子制御によりヒューマンエラーをできる限り回避するシステム構築を行う。

疾患研究に必要とされる試料への研究者側の要請も研究の方向性により多岐にわたると考えられるが、収集研究班へのアンケート調査を行うことにより収集対象試料や研究の目的を調査する。

本事業の特徴の一つに研究試料の収集と提供の両面において倫理問題、権利問題などの社会的法的問題が存在しており、医学研究倫理の専門家を加え、患者試料の収集において倫理問題に適切に対応することとし、難病研究資源バンク事業に

において特異的な医学研究倫理の問題や、試料収集研究に当たる研究班の優先性の問題などの法的、社会的問題について検討を行う。

## C. 研究結果および考察

### 1. 国立成育医療センターにおける遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析

#### 1) 経時的な臨床データの把握

先天性視神経形成異常約 150 例および、網膜変性に伴う視神経障害約 60 例の症例を集積し、視力、広角度眼底撮影を行って、臨床データを集積した。さらに、当該年度後半は、約 20 例で、光干渉断層計による網膜視神経の構築に関する生体観察と、局所網膜電図による機能検査を開始した。これによって、網膜の層や細胞種別の障害状況が、新たに判るようになった。ことに、先天性の視神経および網膜神経節細胞の形成異常において、神経線維が障害されていても、視細胞レベルは機能が保たれていることが判明したのは、大きな成果である。将来の再生医療に役立つ知見と思われる。

#### 2) ゲノムおよび株化リンパ球の集積

先天性視神経形成異常 15 例、先天無虹彩 20 例、網膜変性に伴う視神経障害 20 例で、末梢血白血球よりゲノムを抽出し、株化リンパ球を作成した。

#### 3) 先天視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

視神経疾患では初めて、7 例の PAX6 変異 (P68S、Q205X、F258S、S292I、Q378R、M381V、T391A) を見出した。表現型はコロボーマ、視神経低形成/無形成、朝顔症候群であり、生化学的検討では、PAX6 遺伝子と PAX2 遺伝子が相互に抑制しあい、今回みつかった変異ではこの働きが障害されていることが判明した。したがって、PAX6 は視神経の形成に関与し、その過程では PAX2 と相互に影響あるいは役割分担していることが示唆された。

先天無虹彩では、新たに 3 例のナンセンス変異と、4 例のミスセンス変異を見出した。ミスセンス変異の生化学的解析によって、無虹彩の発症には PAX6 の paired domain の障害が関わっていることが示唆された。

これらの知見は、疾患の発生機転や病態の理解だけでなく、再生医学の応用でも有用である。

#### 4) 先天性網膜形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

Leber 先天黒内障 20 例で、ゲノムを集積した。現在、CRX 遺伝子や RP65 遺伝子の変異解析を開始したところである。

#### 5) 眼由来細胞からの iPS 細胞作成の準備

手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、遺伝子導入によって、網膜様細胞になることを確認した。これは、網膜再生医療において、大きな成果であるが、今後は安定

した iPS 細胞からの網膜細胞の作成が課題である。これまでの我々の研究では、幼若な細胞の方が iPS 細胞作成効率が高いことが判明している。現在、網膜に分化しやすい虹彩由来幹細胞をさらに iPS 細胞にして再生医療に資するべく、準備中である。

#### 6) 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料に関してバンク登録と寄託を行っていく。これらのバンク登録情報として、1)~5) で得られたデータを添付することで、国内の研究者が利用する際の有益な生体試料バンクとして機能することが可能となる。

既に、国立成育医療センターでは、臨床において膨大な疾患症例を集め、生体観察などの最先端の機器を揃えていたため、十分な臨床データを得ることができたとともに、ある程度数のゲノム、株化リンパ球を集積することができた。また、幾つかの疾患で遺伝子変異を見出し、疾患の原因や病態の機転を一部明らかにすることができた。これらは、疾患の原因や病態、治療の研究に大いに役立つと思われる。

先天性難治性網膜・視神経形成異常の多くは、網膜視神経を構成する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の変異によって起こる。大部分は出生時に発症しているが、成長時に発症するものもある。視神経形成に関わる遺伝子としては、PAX2、HESX が知られていたが、我々は PAX6 で初めて多くの変異を発見した。また、レーベル先天黒内障は、網膜・視神経の形成異常によって、出生後まもなくから重篤な視覚障害を起こす疾患であるが、これまでに網膜に関わる原因遺伝子がいくつか判明している。ことに、RP65 遺伝子の変異においては、遺伝子治療によって視力が改善した臨床報告があり、治療の可能が示されている。本研究では、これらの希少な眼疾患について、国立成育医療センターの特徴を生かした生体試料の収集を行うとともに由来組織からの iPS 細胞の樹立を試みる。生体資料、ゲノム遺伝子および樹立した iPS 細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所に登録し、他の研究施設より要請があった場合に、疾患の原因解明や再生医療の研究に資する提供を行える体制を構築する。当該年度は、先天性視神経形成異常および、網膜変性に伴う視神経障害症例のゲノムおよび株化リンパ球を集積し、併せて遺伝子変異の検索を行った。

今後は iPS 細胞の樹立と、これら生体資料の公的バンクへの登録、そのための包括的な倫理審査を進める予定である。公的バンクに登録に際しては、極めて慎重な倫理的手続きを行う希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害に由来する細胞や遺伝子を提供することは、病態解明や遺伝子・細胞治療の研究に有用であるので、医薬

基盤研究所等で議論された枠組みに沿って、登録を進めたい。

## 2. 浜松医科大学における遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析

### 1) 変異解析

#### a. 眼白子

我が国で見られる眼白子はほとんどが X 連鎖性の Nettleship-Falls 型であり、それらの症例は *GPR143* (G protein-coupled receptor 143) 遺伝子異常によることが知られている。*GPR143* は Xp22.3 に位置し、9 個のエキソンから構成されている。患児について、*GPR143* 遺伝子の各エキソンとその周辺の塩基配列解析を行ったところ、エキソン 5 の直後のイントロン 5 先頭に塩基配列異常 (c.658+1G>A) を認めた。父親は正常、母親は同変異と正常アリのヘテロ接合体であった。同変異は、スプライシング異常を起こし、それが本症例の発症原因であると考えられる。また、同患児には他に 2 つの塩基変化 (c.251-135T>C 及び c.767+10C>G) も認めたが、これらは既に疾患原因とならない多型であることが報告されている。

#### b. 先天無虹彩

先天無虹彩は、虹彩の形成不全のみならず白内障、水晶体偏位、緑内障、黄斑低形成などの異常を伴うことが少なくない。多くの先天無虹彩症例は常染色体優性遺伝を示し、原因遺伝子として *PAX6* (Paired box 6) が知られている。*PAX6* は 11p13 に位置し、13 個のエキソンから構成されている。

患児について、*PAX6* 遺伝子の塩基配列解析を行ったところ、一方のアリのエキソン 11 に塩基配列異常 (c.949C>T) を認めた。他方のアリは正常であった。また、両親は共に両アリとも正常であった。同変異は、アミノ酸レベルでは、ナンセンス変異 p.Arg317X を生じ、既に論文報告がなされていて、本症例の発症原因であると考えられる。

#### c. 眼底白点症

眼底白点症は眼底に無数の白点を有する夜盲性疾患である。常染色体劣性遺伝を示し、原因遺伝子として *RDH5* (Retinol dehydrogenase 5) が知られている。*RDH5* は 12q13-q14 に位置し、5 個のエキソンから構成されている。

患者について、*RDH5* 遺伝子の塩基配列解析を行ったが、エキソン及びその周辺領域および、同遺伝子の上流約 1kb (プロモーター領域) に変異は認められなかった。

### 2) 培養細胞株樹立

上述の a~c の 3 症例から収集した末梢血より B リンパ芽球様細胞株の樹立を試みた。3 例とも、約 1 か月の培養で株化に成功した。

眼白子、先天無虹彩、眼底白点症の遺伝子解析を行い、前二者については遺伝子変異を同定する

ことができた。また、全例について、B リンパ芽球様細胞株を樹立できた。

特に、眼白子における *GPR143* 遺伝子異常を同定し、報告するのは、本研究が我が国で最初の例である。患児の母親の眼底はモザイク様を呈し、ランダムな X 染色体不活化を反映しているものと考えられた。

本研究では浜松医科大学眼科を受診した網膜色素変性症、錐体(杆体)ジストロフィー、眼底白点症、先天白内障などの遺伝性・先天性眼疾患の患者を収集し、生体試料 (主に血液) の提供を受け、試料より抽出した DNA から疾患原因遺伝子の変異解析を行い、全症例について、可能な限り培養細胞株の樹立も行った。

先天無虹彩症例では、患児に既報告の変異 (c.949C>T, p.Arg317X) がヘテロ接合体として見られたが、両親は両アリとも正常であった。すなわち、同患児の変異は、*de novo* で生じたと考えられる。眼底白点症症例では、調べた限りでは *RDH5* 遺伝子に変異が同定されなかった。同遺伝子の未解析領域の変異が存在するか、他の遺伝子の変異によるかの検討は今後行う必要がある。

眼白子、先天無虹彩、眼底白点症の遺伝子解析を行い、前二者については遺伝子変異を同定することができた。また、全例について、B リンパ芽球様細胞株を樹立できた。

特に、眼白子における *GPR143* 遺伝子異常を同定し、報告するのは、本研究が我が国で最初の例である。患児の母親の眼底はモザイク様を呈し、ランダムな X 染色体不活化を反映しているものと考えられた。

収集した生体試料に関する遺伝子変異等の情報は、国立成育医療センターでの方針にならってバンクへ登録し、他の研究機関より要請があった場合に提供できる体制を構築する。

## 3. 生体試料の培養条件の確立および遺伝子解析

### 1) 生体試料収集と由来遺伝子・組織由来細胞の調整

国立成育医療センター眼科患者由来組織から細胞の単離・精製を行った。

### 2) 細胞樹立とプロファイリング

1) の手順にて得られた細胞を培養し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

### 3) 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料 (細胞) に関してバンク登録と寄託を行っていく。これらのバンク登録情報として、1) 2) で得られた詳細なデータを添付することで、国内の研究者が利用する際の有益な生体試料バンクとして機能することが可能となる。

患者情報を公的バンクに登録する際には、倫理的に極めて慎重な取り扱いが求められる。将来的



には、希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害に由来するヒト iPS 細胞も必要と考えている。希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害に由来する細胞を提供することは極めて有用であることは間違いなく、医薬基盤研究所等での議論を注視し、その議論で得られた枠組みに沿い、登録及び寄託を進めて参りたい。

#### 4. 難病研究資源バンクにおける疾患患者試料収集におけるシステム化に関する研究

本年度事業としては、患者試料収集の具体的な見通しを立てることを目的として平成 21 年 9 月から 11 月に全収集研究班 (53 班) を対象にアンケート調査を行い 34 班より回答を得 (回答率 64.1%) た。集計の概略としては、1) 目的とする収集試料の種類は様々だが DNA の割合は高い、2) 半数が臨床検査時に試料収集を考えている、3) 既存収集試料の IC 取得の状況は半数でとられている、4) 3分の1弱がゲノム解析を収集の目的としている、5) 試料の利用に関しては半数が研究班内での試料利用と共同研究利用に限定する、といった内容であった。

寄託された試料の基本操作方法や自動システム、分離された細胞・血漿・DNA などの分離試料の分注凍結保存を確実にする電子システム構築については、難病資源バンク内でのみ接続可能な室内 LAN によって管理し担当者がログインしたうえで記録入力を行い、2D チューブ保管管理システムと連動してヒューマンエラーをできる限り回避するシステム構築を行った。

本研究事業においては、難治性疾患という機微に触れる疾患を対象とする事業であること、また試料提供者 (患者) の権利保護や試料を利用した公平な研究機会確保を行うための倫理的・法的・権利調整問題、また診断を行う臨床医の権利保障など、多岐にわたる課題の克服が重要な課題として位置づけられる。

難治性疾患のうち頻度の低い疾患については、臨床現場において患者を経験することはまれであり、患者試料等の集中化がなされなければ、多数の症例試料を必要とする疾患克服研究の実現は困難である。このような希少疾患試料を経年蓄積収集し集中保存管理し、研究者に提供することで統計的に有意な研究が可能となり、この困難性を乗り越えることができる。

本分担研究の目的は難治性疾患試料の研究資源バンクである「難病研究資源バンク」を設立するための問題点を明らかにし、難病研究資源バンクの具体的なシステム構築を検討することによって、難治性疾患克服研究の推進に貢献することにある。

これまで20年以上にわたり継続されてきた難治性疾患克服研究班の協力を得て試料等を「難病

研究資源バンク」に集中化し、厳しく品質管理された患者試料を一定の規模で集積し統一的な研究試料の提供を行うことにより、班内の共同研究を支援すると同時に班外の研究者への公平かつ効率的な研究利用促進を図り、難病研究資源のワンストップを創生することは疾患克服研究推進に大いに貢献することが考えられる。

試料提供の公平性に関しても、これまでの公的バンク運営の経験やノウハウ等を活かすとともに、第三者機関として研究資源利用審査委員会 (仮称) を設置して偏りのない資源提供システムを構築することによって担保することが可能になる。疾患患者の権利保護や研究利用の倫理問題、また診断臨床医の権利など、法的倫理的及び権利調整の問題克服が重要課題でありこの課題での具体的な対応策についても検討した。

基盤研においては、これまでも生物資源研究事業の中でヒト細胞の受け入れや分譲などについて組織内部および外部の研究倫理審査委員会においてヒト試料の研究利用に対応してきた実績と理論的研究の経験を有している。基盤研において難病研究資源バンク専任の医学研究倫理審査委員会を組織し患者試料受け入れにかかわる倫理申請に特化して審査する体制を構築した。

本分担研究では「難治性疾患対策研究、生体試料等の収集に関する研究」により収集された患者試料を集中化して品質管理を行う「難病研究資源バンク」を創設し、統合的管理・支援体制を整備して、品質管理された試料を基礎研究機関に提供し、難治性疾患克服研究のより一層の効率的推進を図ることを目的としている。当初の事業予定では、疾患患者資料の収集が直ちに開始されることを想定していたが、収集研究班へのアンケート調査、また昨年9月に行われた事業説明会で各収集研究班の担当者との直接の話し合い、および直接、収集研究班担当者への訪問調査討議などを行い、患者試料収集に係る単純ではない問題点が明確となった。収集研究班の目的試料の種類も異なっており、個々の収集研究班に対して倫理申請上の必要事項など個別の対応を取りながら事業を進めた。

また、基盤研究所内部での難病研究資源バンク専属の医学研究倫理審査委員会の組織化のため基盤研医学研究倫理委員会の承認を受け、設立することができた。システム整備に関しては、患者試料を処理・検査・保管管理のための施設・機器の整備を行うとともに、コード管理システムの構築を行った。

#### D. 結論

国立成育医療センターにおいて、先天性視神経形成異常および網膜変性に伴う視神経障害症例

を集積し、視経時的な臨床データを把握した。先天視神経形成異常と無虹彩の遺伝子解析を行い、PAX6 遺伝子の新たな変異を発見した。Leber 先天黒内障のゲノムを集積し、遺伝子変異の検索を開始した。手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、iPS 細胞作製を準備している。

浜松医科大学眼科を受診した遺伝性眼疾患患者（眼白子、先天無虹彩、眼底白点症）の遺伝子解析を行い、前二者について、それぞれ、GPR143 と PAX6 の遺伝子変異を同定した。また全例について B リンパ芽球様細胞株樹立に成功した。

国立成育医療センター眼科患者由来組織から細胞の単離・精製を行った。得られた細胞を培養し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

これらの得られた生体試料に関してバンク登録と寄託を行っていく。

本研究事業の目的は「難治性疾患対策研究、生体試料等の収集に関する研究」により収集された患者試料を集中化して品質管理を行う「難病研究資源バンク」を創設し、統合的管理・支援体制を整備して、品質管理された試料を公平に基礎研究機関に提供し、難治性疾患克服研究のより一層の効率的推進を図ることにある。収集研究班へのアンケート調査および収集研究班担当者との討議により患者試料収集に係る単純ではない問題点を明確にすることができた。また基盤研究所内部での難病研究資源バンク専属の医学研究倫理審査委員会を設立することができた。システム整備に関しては、患者試料を処理・検査・保管管理のための施設・機器の整備を行うとともに、コード管理システムの構築を行った。

## E. 健康危険情報

該当する危険あり（詳細）/なし

## F. 研究発表

### 論文発表

#### 原著論文

1. Kobayashi Y, Yamada K, Ohba S, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Ocular manifestations and prognosis of shaken baby syndrome in two Japanese children's hospitals. *Jpn J Ophthalmol*. 2009; 53: 384-388.
2. Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Evaluation of scleral buckling for stage 4A retinopathy of prematurity by fluorescein angiography. *Am J Ophthalmol*. 2009;148:544-550.
3. Yokoi T, Hiraoka M, Miyamoto M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Vascular abnormalities in aggressive posterior retinopathy of prematurity detected by fluorescein angiography. *Ophthalmology* 2009; 116: 1377-1382.
4. Nishina S, Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Azuma N. Effect of early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity detected by fluorescein angiography. *Ophthalmology* 2009; 116:2442-2447.
5. Suzuki Y, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Congenital rotated macula with good vision and binocularity. *Jpn J Ophthalmol* 2009; 53:452-454.
6. Yokoi T, Nakagawa A, Matsuoka K, Koide R, Azuma N. Analysis of pathology in type I Stickler syndrome. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009 247:715-718.
7. Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Wu J, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull* 2009 32:999-1003.
8. Saito R, Yamasaki T, Nagai Y, Wu J, Kajihō H, Yokoi T, Noda E, Nishina S, Niwa H, Azuma N, Katada T, Nishina H. CrxOS maintains self-renewal of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1129-1135.
9. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Fukami M, Ogata T. Heterozygous OTX2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:756-764.
10. Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk Factors for Recurrent Fibrovascular Proliferation in Aggressive Posterior Retinopathy of Prematurity after Early Vitreous Surgery. *Am J. Ophthalmol* 2010, in press.
11. 伊藤-清水里美・赤池祥子・越後貫滋子・東 範行：液晶視力表システムチャート SC-2000 によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果。 *眼臨紀* 2010 ; 3:70-73.
12. 伊藤-清水里美・赤池祥子・越後貫滋子・東 範行：国立成育医療センターにおける小児ロービジョンケアの特徴。 *眼臨紀* 2010 ; 3: in press.
13. Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Identification of 11 novel mutations in *USH2A* among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin Genet*, 76(4) 383-91, 2009
14. Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells*.

- 14(12):1395-1404, 2009.
15. Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res*. 315(16):2727-2740, 2009.
16. Osada N, Hirata M, Tanuma R, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Kameoka Y, Hashimoto K, Takahashi I. Collection of *Macaca fascicularis* cDNAs derived from bone marrow, kidney, liver, pancreas, spleen, and thymus. *BMC Res Notes*. 2009 Sep 29;2:199.
17. Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N. IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3417-24. Epub 2009 Aug 12.
18. Higashino A, Osada N, Suto Y, Hirata M, Kameoka Y, Takahashi I, Terao K. Development of an integrative database with 499 novel microsatellite markers for *Macaca fascicularis*. *BMC Genet*. 2009 Jun 5;10:24.

- なし  
2. 実用新案登録  
なし  
4. その他

#### 総説

1. 東 範行：未熟児網膜症の最新の医療. 医療 2010;62: In press
2. 東 範行：黄斑を形成する遺伝子システムと再生医療への応用. 医学のあゆみ 2008;226:965-972.
3. 東 範行：未熟児網膜症の診断と治療. 日本眼科医会 2010; In press.
4. 平岡美依奈・東 範行：未熟児網膜症. *Current Therapy* 2009;27:902-906.
5. 東 範行：未熟児網膜症診療—最近の考え方. あたらしい眼科 2009; 26: 433.
6. 東 範行：II型/Aggressive Posterior ROPに対する硝子体手術の適応と時期. あたらしい眼科 2009; 26: 473-480.

#### 著書

1. 東 範行・平岡美依奈：未熟児網膜症眼底アトラス. エルゼヴィア 2009.
2. 東 範行：未熟児網膜症. 視能訓練士用語解説辞典 *メディカル葵* 2010; In press.
3. 東 範行：網膜裂孔. 視能訓練士用語解説辞典 *メディカル葵* 2010; In press.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

## 遺伝性網膜・視神経形成異常の遺伝子解析

分担研究者 東 範行 国立成育医療センター 眼科医長

研究要旨：先天性難治性網膜・視神経障害の多くは、網膜及び視神経を構築する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の障害によって、出生時あるいは成長時に発病し、両眼に重篤な視覚障害をもたらす。いくつかの原因遺伝子は判明しているものの、多くは不明である。本研究では、国立成育医療センターにおいて、先天性視神経形成異常および網膜変性に伴う視神経障害症例を集積し、視経時的な臨床データを把握した。先天視神経形成異常と無虹彩の遺伝子解析を行い、PAX6 遺伝子の新たな変異を発見した。Leber 先天黒内障のゲノムを集積し、遺伝子変異の検索を開始した。手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、iPS 細胞作製を準備している。得られた生体試料に関してバンク登録と寄託を行っていく。

### A. 研究目的

先天性難治性網膜・視神経形成異常の多くは、網膜視神経を構成する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の変異によって起こる。大部分は出生時に発症しているが、成長時に発病するものもある。視神経形成に関わる遺伝子としては、PAX2、HESX が知られていたが、我々は PAX6 で初めて多くの変異を発見した。また、レーベル先天黒内障は、網膜・視神経の形成異常によって、出生後まもなくから重篤な視覚障害を起こす疾患であるが、これまでに網膜に関わる原因遺伝子がいくつか判明している。ことに、RP65 遺伝子の変異においては、遺伝子治療によって視力が改善した臨床報告があり、治療の可能が示されている。本研究では、これらの希少な眼疾患について、国立成育医療センターの特徴を生かした生体試料の収集を行うとともに由来組織からの iPS 細胞の樹立を試みる。生体資料、ゲノム遺伝子および樹立した iPS 細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所に登録し、他の研究施設より要請があった場合に、疾患の原因解明や再生医療の研究に資する提供を行える体制を構築する。当該年度は、先天性視神経形成異常および、網膜変性に伴う視神経障害症例のゲノムおよび株化リンパ球を集積し、併せて遺伝子変異の検索を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 経時的な臨床データの把握

国立成育医療センターにおいては、通常の視力や眼底検査のみならず、眼底の撮影、光断層干渉計を用いた病理レベルでの視神経の生体観察、電気生理学的検査による視神経の機能な

ど、最新の形態ならびに機能測定を乳幼児から全身麻酔で行えるシステムが確立されている。これらを用いて、疾患の発症時より経時的に病態の変化を微細構造および機能について計測し、経時的にそのデータを集積した。

#### 2) ゲノムおよび株化リンパ球の集積

先天性視神経形成異常および、網膜変性に伴う視神経障害症例で、末梢血白血球よりゲノムを抽出し、株化リンパ球を作成した。

#### 3) 先天視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

遺伝性視神経形成異常、無虹彩に伴う視神経形成異常のゲノムを集積し、眼形成遺伝子 PAX6 の変異解析を行った。また、培養細胞において、みつけた PAX6 変異の機能的意義も検討した。

#### 4) 先天性網膜形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

Leber 先天黒内障のゲノムを集積し、今後の CRX、RP65 遺伝子等の変異解析を準備した。

#### 5) 眼由来細胞からの iPS 細胞作成の準備

手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、iPS 細胞作成を開始した。

#### 4) 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料に関してバンク登録と寄託を行っていく。

#### (倫理面への配慮)

#### 1) 診療および生体試料の収集に関する倫理

本研究における検査・手術はいずれも健康保険法上で承認された医療行為であり、実施に際しては、患者もしくは保護者に対するインフォームドコンセントを行い、同意を得ている。生体資料の収集に際しては、以下に述べる倫理

委員会の承認のもとに、患者もしくは保護者に対するインフォームドコンセントを行い、同意を得ている。

## 2) ヒト遺伝子および細胞に対する倫理

当センターにおいては、先大奇形症候群の遺伝子解析に関して（国立成育医療センター研究所、受付番号 39、平成 15 年承認）、ヒト細胞の培養研究に関して（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26、27、平成 15 年承認、受付番号 49、平成 15 年承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91 平成 16 年承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月承認、受付番号 146、平成 17 年承認、受付番号 156、平成 17 年承認、受付番号 197、201、平成 18 年承認、受付番号 237、238、平成 19 年承認）、既に倫理審査を受け、承認を受けている。これらのうち、樹立細胞は、公的細胞バンクへの寄託についても審査され承認を得ている。今後はさらに、研究分担者を含めて、本研究に所属するすべての施設で得られた生体資料、ゲノムおよび樹立細胞を、独立行政法人医薬基盤研究所に登録し、他の研究施設の要請があれば提供できる、包括的な倫理審査を準備中である。

## C. 研究結果

### 1) 経時的な臨床データの把握

先天性視神経形成異常約 150 例および、網膜変性に伴う視神経障害約 60 例の症例を集積し、視力、広角度眼底撮影を行って、臨床データを集積した。さらに、当該年度後半は、約 20 例で、光干渉断層計による網膜視神経の構築に関する生体観察と、局所網膜電図による機能検査を開始した。これによって、網膜の層や細胞種別の障害状況が、新たに判るようになった。ことに、先天性の視神経および網膜神経節細胞の形成異常において、神経線維が障害されていても、視細胞レベルは機能が保たれていることが判明したのは、大きな成果である。将来の再生医療に役立つ知見と思われる。

### 2) ゲノムおよび株化リンパ球の集積

先天性視神経形成異常 15 例、先天無虹彩 20 例、網膜変性に伴う視神経障害 20 例で、末梢血白血球よりゲノムを抽出し、株化リンパ球を作成した。

### 3) 先天視神経形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

視神経疾患では初めて、7 例の PAX6 変異 (P68S、Q205X、F258S、S292I、Q378R、M381V、T391A) を見出した。表現型はコロボーマ、視神経低形成/無形成、朝顔症候群であり、生化学的検討では、PAX6 遺伝子と PAX2 遺伝子が相互に抑制しあい、今回みつかった変異ではこの働きが障害されていることが判明した。したがって、PAX6 は視神経の形成に関与し、その過程では PAX2 と相互に

影響あるいは役割分担していることが示唆された。

先天無虹彩では、新たに 3 例のナンセンス変異と、4 例のミスセンス変異を見出した。ミスセンス変異の生化学的解析によって、無虹彩の発症には PAX6 の paired domain の障害が関わっていることが示唆された。

これらの知見は、疾患の発生機転や病態の理解だけでなく、再生医学の応用でも有用である。

### 4) 先天性網膜形成異常の遺伝子解析と疾患の原因解明に関する研究

Leber 先天黒内障 20 例で、ゲノムを集積した。現在、CRX 遺伝子や RP65 遺伝子の変異解析を開始したところである。

### 5) 眼由来細胞からの iPS 細胞作成の準備

手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、遺伝子導入によって、網膜様細胞になることを確認した。これは、網膜再生医療において、大きな成果であるが、今後は安定した iPS 細胞からの網膜細胞の作成が課題である。これまでの我々の研究では、幼若な細胞の方が iPS 細胞作成効率が高いことが判明している。現在、網膜に分化しやすい虹彩由来幹細胞をさらに iPS 細胞にして再生医療に資するべく、準備中である。

### 6) 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料に関してバンク登録と寄託を行っていく。これらのバンク登録情報として、1)~5) で得られたデータを添付することで、国内の研究者が利用する際の有益な生体試料バンクとして機能することが可能となる。

## D. 考察

既に、国立成育医療センターでは、臨床において膨大な疾患症例を集め、生体観察などの最先端の機器を揃えていたため、十分な臨床データを得ることができたとともに、ある程度数のゲノム、株化リンパ球を集積することができた。また、幾つかの疾患で遺伝子変異を見出し、疾患の原因や病態の機転を一部明らかにすることができた。これらは、疾患の原因や病態、治療の研究に大いに役立つと思われる。

今後は iPS 細胞の樹立と、これら生体資料の公的バンクへの登録、そのための包括的な倫理審査を進める予定である。公的バンクに登録に際しては、極めて慎重な倫理的手続きを行う希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害に由来する細胞や遺伝子を提供することは、病態解明や遺伝子・細胞治療の研究に有用であるので、医薬基盤研究所等で議論された枠組みに沿って、登録を進めたい。

## E. 結論



国立成育医療センターにおいて、先天性視神経形成異常および網膜変性に伴う視神経障害症例を集積し、視経時的な臨床データを把握した。先天視神経形成異常と無虹彩の遺伝子解析を行い、PAX6 遺伝子の新たな変異を発見した。Leber 先天黒内障のゲノムを集積し、遺伝子変異の検索を開始した。手術によって得られた虹彩組織から、神経幹細胞を分離し、iPS 細胞作製を準備している。得られた生体試料に関してバンク登録と寄託を行っていく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 原著論文

1. Kobayashi Y, Yamada K, Ohba S, Nishina S, Okuyama M, Azuma N. Ocular manifestations and prognosis of shaken baby syndrome in two Japanese children's hospitals. *Jpn J Ophthalmol*. 2009; 53: 384-388.
2. Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Evaluation of scleral buckling for stage 4A retinopathy of prematurity by fluorescein angiography. *Am J Ophthalmol*. 2009;148:544-550.
3. Yokoi T, Hiraoka M, Miyamoto M, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Vascular abnormalities in aggressive posterior retinopathy of prematurity detected by fluorescein angiography. *Ophthalmology* 2009; 116: 1377-1382.
4. Nishina S, Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Hiraoka M, Azuma N. Effect of early vitreous surgery for aggressive posterior retinopathy of prematurity detected by fluorescein angiography. *Ophthalmology* 2009; 116:2442-2447.
5. Suzuki Y, Yokoi T, Hiraoka M, Nishina S, Azuma N. Congenital rotated macula with good vision and binocularity. *Jpn J Ophthalmol* 2009; 53:452-454.
6. Yokoi T, Nakagawa A, Matsuoka K, Koide R, Azuma N. Analysis of pathology in type I Stickler syndrome. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009 247:715-718.
7. Shimizu N, Watanabe H, Kubota J, Wu J, Saito R, Yokoi T, Era T, Iwatsubo T, Watanabe T, Nishina S, Azuma N, Katada T, Nishina H. Pax6-5a promotes neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Biol Pharm Bull* 2009 32:999-1003.
8. Saito R, Yamasaki T, Nagai Y, Wu J, Kajihō H, Yokoi T, Noda E, Nishina S, Niwa H, Azuma N, Katada T, Nishina H. CrxOS maintains self-renewal of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1129-1135.
9. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoyama S, Muroya K, Adachi M,

Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Fukami M, Ogata T. Heterozygous OTX2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95:756-764.

10. Yokoi T, Yokoi T, Kobayashi Y, Nishina S, Azuma N. Risk Factors for Recurrent Fibrovascular Proliferation in Aggressive Posterior Retinopathy of Prematurity after Early Vitreous Surgery. *Am J. Ophthalmol* 2010, in press.
11. 伊藤-清水里美・赤池祥子・越後貫滋子・東 範行：液晶視力表システムチャート SC-2000 によるロービジョン児のコントラスト視力測定と遮光レンズの効果. *眼臨紀* 2010 ; 3:70-73.
12. 伊藤-清水里美・赤池祥子・越後貫滋子・東 範行：国立成育医療センターにおける小児ロービジョンケアの特徴. *眼臨紀* 2010 ; 3: in press.

#### 総説

1. 東 範行：未熟児網膜症の最新の医療. *医療* 2010;62: In press
2. 東 範行：黄斑を形成する遺伝子システムと再生医療への応用. *医学のあゆみ* 2008;226:965-972.
3. 東 範行：未熟児網膜症の診断と治療. *日本眼科医会* 2010; In press.
4. 平岡美依奈・東 範行：未熟児網膜症. *Current Therapy* 2009;27:902-906.
5. 東 範行：未熟児網膜症診療－最近の考え方. *あたらしい眼科* 2009; 26: 433.
6. 東 範行：II型/Aggressive Posterior ROPに対する硝子体手術の適応と時期. *あたらしい眼科* 2009; 26: 473-480.

#### 著書

1. 東 範行・平岡美依奈：未熟児網膜症眼底アトラス. *エルゼヴィア* 2009.
2. 東 範行：未熟児網膜症. *視能訓練士用語解説辞典 メディカル葵* 2010; In press.
3. 東 範行：網膜裂孔. *視能訓練士用語解説辞典 メディカル葵* 2010; In press.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
4. その他

## 先天性網膜・視神経障害の遺伝子解析

研究分担者 堀田 喜裕 浜松医科大学 眼科学講座 教授

研究要旨：先天性難治性網膜・視神経障害の多くは、網膜及び視神経の細胞に発現する形態形成遺伝子、酵素遺伝子等の障害により、出生時または小児期に発病し、重篤な視覚障害をもたらす。現在までにいくつかの原因遺伝子が明らかにされているが、不明のものも多い。希少疾患が多いので、今後の研究、医療行政を考えるために、症例の収集とバンクへの登録の価値は大きい。本研究では、遺伝性・先天性眼疾患患者検体を収集し、遺伝子解析を行うとともに、培養細胞株の確立も試みることを目的とする。本年度は、眼白子、先天無虹彩、眼底白点症の遺伝子解析を行い、前二者について、それぞれ、*GPR143*と*PAX6*の遺伝子変異を同定した。また全例についてBリンパ芽球様細胞株樹立に成功した。今回解析した3症例の遺伝子変異、Bリンパ芽球様細胞株、臨床症状等に関する情報を、バンク登録する方針である。

### A. 研究目的

先天性難治性網膜・視神経障害の多くは、網膜及び視神経を構築する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の障害により出生時または小児期に発病し、両眼に重篤な視覚障害をもたらす。現在までにいくつかの原因遺伝子が判明しているが、不明のものも多い。そこで、本研究では浜松医科大学眼科を受診した網膜色素変性症、錐体(杆体)ジストロフィー、眼底白点症、先天白内障などの遺伝性・先天性眼疾患の患者を収集し、生体試料（主に血液）の提供を受け、試料より抽出したDNAから疾患原因遺伝子の変異解析を行う。さらに、全症例について、可能な限り培養細胞株の樹立も行う。収集した生体試料に関する遺伝子変異等の情報は、国立成育医療センターの方針にならってバンクへ登録し、他の研究機関より要請があった場合に提供できる体制を構築する。稀少疾患に由来する生体試料は入手方法も限られており、これらの疾患の分子基盤研究のための体制を生体試料の観点から構築することは、厚生科学研究として重要な位置を占めると考える。

### B. 研究方法

本学眼科を受診した3名の遺伝性眼疾患の患者（眼白子症、先天無虹彩、眼底白点症）より末梢血を収集し、各疾患原因遺伝子の変異解析を行った。また同患者の末梢血よりBリンパ芽球様細胞株の樹立も行った。実験方法を下記に示す。

#### 1. 疾患原因遺伝子の変異解析

患者の末梢血よりDNAを抽出し、疾患原因遺伝子の全エクソンと周囲のイントロン配列をPCR法

により増幅する。PCR産物を精製後、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定する。

#### 2. Bリンパ芽球様細胞株の樹立

患者の末梢血よりリンパ球を抽出し、EBウイルス(Epstein-Barr virus)に感染させる。その後、活発に増殖するBリンパ芽球様細胞が得られるまで培養と継代を続ける。

症例の詳細は下記に示すとおりである。

#### a. 眼白子

症例は4カ月男児、生後3カ月で眼と皮膚の色と、眼球振盪が気になり、近くの病院の小児科を受診し、典型的ではないが白子症による黄斑低形成と言われた。眼所見が強いので、5カ月時に当院眼科を受診した。母親の眼底はモザイク様のキャリアーの眼底であり、臨床所見から眼白子と診断した。遺伝相談では両親が、皮膚、頭髪の色が淡く、眼皮膚白子症にはいろいろな種類があり、紫外線暴露に対する不安を訴え、確定診断できるなら遺伝子診断を強く希望した。

#### b. 先天無虹彩

症例は生後9日の男児、産科医により左眼の混濁を指摘され本学眼科を受診した。両眼の虹彩は欠損し、左眼の水晶体は前房側へ移行し角膜に付着していた。生後2ヶ月の眼底検査より両眼に黄斑低形成と眼振が見られた。遺伝相談では両親が遺伝子診断を強く希望した。

#### c. 眼底白点症

症例は30歳女性、2歳ごろから薄暗い時間になると見えにくいと訴えていた。症状が持続するた

め、6歳9カ月時に近くの眼科初診。精査目的に別病院眼科紹介受診となり、眼底白点症が疑われ、精査加療目的に本学眼科紹介受診となった。初診時の眼底では両眼黄斑周囲から周辺部にかけて白点の散在が見られた。20歳頃より視力低下を起し、眼底検査、網膜電図では典型例と異なっており、確定診断のため遺伝子診断を行った。

#### 【倫理面への配慮】

当該研究に関する遺伝子及び組織の収集にあたり、浜松医科大学の倫理委員会（ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会承認番号19-18：平成19年11月。医の倫理委員会承認番号19-118：平成19年11月）の承認を受けた。生体試料（血液）は、同意を得た患者または保護者より提供を受けた。採血前に本研究の研究内容、協力の任意性と撤回の自由、研究計画書等の開示、個人情報保護、提供者の利益および不利益、解析結果の通知、研究成果の公表、研究終了後の試料等の取扱いの方針、知的財産権、費用、遺伝カウンセリング等について詳しく説明し、インフォームドコンセントを書面で得られたもののみを対象とした。提供された検体は、適切な状態で保存し、将来の遺伝子解析を含む医学研究に応用されることを本人が承諾した場合のみバンク登録の対象とする。本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）及び、「疫学研究に関する倫理指針」（文部科学省、厚生労働省）を遵守して行う。

### C. 研究結果

#### C-1. 変異解析

##### a. 眼白子

我が国で見られる眼白子はほとんどが X 連鎖性の Nettleship-Falls 型であり、それらの症例は *GPR143* (G protein-coupled receptor 143) 遺伝子異常によることが知られている。*GPR143* は Xp22.3 に位置し、9 個のエキソンから構成されている。患児について、*GPR143* 遺伝子の各エキソンとその周辺の塩基配列解析を行ったところ、エキソン 5 の直後のイントロン 5 先頭に塩基配列異常 (c.658+1G>A) を認めた。父親は正常、母親は同変異と正常アレルのヘテロ接合体であった。同変異は、スプライシング異常を起し、それが本症例の発症原因であると考えられる。また、同患児には他に 2 つの塩基変化 (c.251-135T>C 及び c.767+10C>G) も認めたが、これらは既に疾患原因とならない多型であることが報告されている。

##### b. 先天無虹彩

先天無虹彩は、虹彩の形成不全のみならず白内障、水晶体偏位、緑内障、黄斑低形成などの異常

を伴うことが少なくない。多くの先天無虹彩症例は常染色体優性遺伝を示し、原因遺伝子として *PAX6* (Paired box 6) が知られている。*PAX6* は 11p13 に位置し、13 個のエキソンから構成されている。

患児について、*PAX6* 遺伝子の塩基配列解析を行ったところ、一方のアレルのエキソン 11 に塩基配列異常 (c.949C>T) を認めた。他方のアレルは正常であった。また、両親は共に両アレルとも正常であった。同変異は、アミノ酸レベルでは、ナンセンス変異 p.Arg317X を生じ、既に論文報告がなされていて、本症例の発症原因であると考えられる。

#### c. 眼底白点症

眼底白点症は眼底に無数の白点を有する夜盲性疾患である。常染色体劣性遺伝を示し、原因遺伝子として *RDH5* (Retinol dehydrogenase 5) が知られている。*RDH5* は 12q13-q14 に位置し、5 個のエキソンから構成されている。

患者について、*RDH5* 遺伝子の塩基配列解析を行ったが、エキソン及びその周辺領域および、同遺伝子の上流約 1kb (プロモーター領域) に変異は認められなかった。

#### C-2. 培養細胞株樹立

上述の a~c の 3 症例から収集した末梢血より B リンパ芽球様細胞株の樹立を試みた。3 例とも、約 1 か月の培養で株化に成功した。

### D. 考察

眼白子、先天無虹彩、眼底白点症の遺伝子解析を行い、前二者については遺伝子変異を同定することができた。また、全例について、B リンパ芽球様細胞株を樹立できた。

特に、眼白子における *GPR143* 遺伝子異常を同定し、報告するのは、本研究が我が国で最初の例である。患児の母親の眼底はモザイク様を呈し、ランダムな X 染色体不活化を反映しているものと考えられた。

先天無虹彩症例では、患児に既報告の変異 (c.949C>T, p.Arg317X) がヘテロ接合体として見られたが、両親は両アレルとも正常であった。すなわち、同患児の変異は、*de novo* で生じたと考えられる。眼底白点症症例では、調べた限りでは *RDH5* 遺伝子に変異が同定されなかった。同遺伝子の未解析領域の変異が存在するか、他の遺伝子の変異によるものかの検討は今後行う必要がある。

### E. 結論

浜松医科大学眼科を受診した 3 名の遺伝性眼疾

患患者（眼白子、先天無虹彩、眼底白点症）の遺伝子解析を行い、前二者について、それぞれ、*GPR143* と *PAX6* の遺伝子変異を同定した。また全例についてBリンパ芽球様細胞株樹立に成功した。今回解析した3症例の遺伝子変異、Bリンパ芽球様細胞株、臨床症状等に関する情報を、バンク登録する方針である。

## F. 健康危険情報

該当する危険なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Identification of 11 novel mutations in *USH2A* among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin Genet*, 76(4) 383-91, 2009

### 2. 学会発表

Wang C-X, Hosono K, Ohtsubo M, Ohishi K, Nakanishi N, Hikoya A, Sato M, Hotta Y, Minoshima S: Interaction between optineurin and bZIP transcription factor NRL. ARVO Fort Lauderdale (平成21年5月3日)

中西啓、堀田喜裕、大坪正史、岩崎聡、峯田周幸、蓑島伸生：本邦におけるアッシュャー症候群の遺伝子解析。第113回日本眼科学会総会 東京 (平成21年4月16日)

大坪正史、中西伸夫、Ismail Thanseem、堀田喜裕、蓑島伸生：緑内障原因遺伝子ミオシリンの相互作用蛋白の同定：発症を修飾する因子としての可能性。第113回日本眼科学会総会東京 (平成21年4月16日)

蓑島伸生、細野克博、大石健太郎、山口良考、工藤純、清水信義、堀田喜裕：錐体特異的遺伝子を発現するマウス培養細胞株の樹立。第113回日本眼科学会総会 東京 (平成21年4月17日)

堀田喜裕：遺伝性眼疾患の考え方。特別講演 第3回鳥取県眼科フォーラム 米子 (平成21年7月18日)

蓑島伸生、細野克博、大石健太郎、山口良考、工藤純、清水信義、堀田喜裕：視細胞特異的遺伝子を発現するマウス培養細胞株の樹立。日本遺伝子診療学会大会 札幌 (平成21年7月31日)

堀田喜裕、王春霞、蓑島伸生：bZIP転写因子NRLはオプチニューリンと結合する。第11回Macula Club 蒲郡 (平成21年8月22日)

中西啓、堀田喜裕、大坪正史、岩崎聡、峯田周幸、蓑島伸生：本邦におけるアッシュャー症候群の遺伝子解析。第54回日本人類遺伝学会 東京 (平成21年9月26日)

澤田麻友、佐藤美保、彦谷明子、王春霞、蓑島伸生、東範行、堀田喜裕：片眼の水晶体位置異常を伴った無虹彩の1例。第63回日本臨床眼科学会 福岡 (平成21年10月11日)

堀田喜裕：遺伝性眼疾患アップデート 特別講演 長崎大学眼科学教室セミナー 長崎 (平成21年10月29日)

大坪正史、Thanseem Ismail、細野克博、堀田喜裕、蓑島伸生：緑内障原因遺伝子産物オプチニューリンと相互作用するタンパクの同定。第32回日本分子生物学会年会 横浜 (平成21年12月12日)

細野克博、大石健太郎、山口良考、工藤純、清水信義、堀田喜裕、蓑島伸生：視細胞特異的遺伝子プロモーターとSV40LargeT抗原遺伝子によるマウス培養細胞株の樹立と性状解析。第32回日本分子生物学会年会 横浜 (平成21年12月12日)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし

## 生体試料の培養条件の確立および遺伝子解析

研究分担者 梅澤 明弘 国立成育医療センター 研究所生殖・細胞医療研究部長

研究要旨：先天性難治性網膜・視神経障害の多くは、網膜及び視神経を構築する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の障害によって、出生時あるいは成長時に発病し、両眼に重篤な視覚障害をもたらす。いくつかの原因遺伝子は判明しているものの、多くは不明である。しかし、最近重篤な網膜障害であるレーベル黒内障において欠損遺伝子を補充することにより、視力が改善した臨床報告が行われ、従来は治療不能であると思われていた疾病の治療可能が開けた。そこで本研究では希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害について国立成育医療センターの特徴を生かした生体試料の収集を行うとともに由来組織からの iPS 細胞の樹立を試みる。

### A. 研究目的

先天性難治性網膜・視神経障害の多くは、網膜及び視神経を構築する細胞に発現する形態形成遺伝子あるいは酵素遺伝子等の障害によって、出生時あるいは成長時に発病し、両眼に重篤な視覚障害をもたらす。いくつかの原因遺伝子は判明しているものの、多くは不明である。しかし、最近重篤な網膜障害であるレーベル黒内障において欠損遺伝子を補充することにより、視力が改善した臨床報告が行われ、従来は治療不能であると思われていた疾病の治療可能が開けた。そこで本研究では希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害について国立成育医療センターの特徴を生かした生体試料の収集を行うとともに由来組織からの iPS 細胞の樹立を試みる。

### B. 研究方法

#### 1. 生体試料収集と由来遺伝子・組織由来細胞の調整とプロファイリング

既に国立成育医療センター・倫理委員会にて承認を受けた、先天性難治性網膜・視神経障害患者由来組織から細胞の単離・精製を行う。これらの組織の遺伝子発現を網羅的に解析する。

#### 2. 細胞樹立の試み

希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害患者に由来する細胞の樹立を行う。国立成育医療センター研究所生殖医療研究部では細胞研究を常時行っており、細胞取扱いのノウハウが蓄積されている。生体試料の入手と同時に細胞樹立研究を行うことで、より実践的な病態解明が可能となる。

### 3. 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料（細胞）に関してバンク登録と寄託を行っていく。

#### （倫理面への配慮）

当研究所においては、ヒト間葉系細胞の樹立と基礎研究応用に関し、既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療センター研究所、受付番号 25、26 及び 27、平成 15 年 1 月承認、受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 15 年 11 月承認、受付番号 88、89、90、91、平成 16 年 7 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、201、平成 18 年 6 月承認、受付番号 237、238、平成 19 年 11 月承認、受付番号 293、315、平成 20 年 10 月承認、受付番号 319、平成 20 年 12 月承認、承認番号 350、平成 22 年 1 月）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う。

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002,2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等



の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. Exp Cell Res. 315(16):2727-2740, 2009.

#### C. 研究結果

##### 1. 生体試料収集と由来遺伝子・組織由来細胞の調整

成育医療センター眼科患者由来組織から細胞の単離・精製を行った。

##### 2. 細胞樹立とプロファイリング

1 の手順にて得られた細胞を培養し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

##### 3. 公的生体試料バンクへの登録

得られた生体試料（細胞）に関してバンク登録と寄託を行っていく。これらのバンク登録情報として、1, 2 で得られた詳細なデータを添付することで、国内の研究者が利用する際の有益な生体試料バンクとして機能することが可能となる。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

#### D. 考察

患者情報を公的バンクに登録する際には、倫理的に極めて慎重な取り扱いが求められる。将来的には、希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害に由来するヒト iPS 細胞も必要と考えている。希少な眼科疾患である先天性難治性網膜・視神経障害に由来する細胞を提供することは極めて有用であることは間違いなく、医薬基盤研究所等での議論を注視し、その議論で得られた枠組みに沿い、登録及び寄託を進めて参りたい。

#### E. 結論

成育医療センター眼科患者由来組織から細胞の単離・精製を行った。得られた細胞を培養し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Nakagawa M, Yamanaka S, Akutsu H, Umezawa A, Tada T. Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. Genes Cells. 14(12):1395-1404, 2009.

Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A. Mesenchymal to embryonic incomplete transition

厚生労働科学研究費（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

難病研究資源バンクにおける疾患患者試料収集における  
システム化に関する研究

研究分担者 亀岡洋祐 独立行政法人医薬基盤研究所 主任研究員

研究要旨：本分担研究では「難治性疾患対策研究、生体試料等の収集に関する研究」により収集された患者試料を集中化して品質管理を行う「難病研究資源バンク」を創設に伴う問題点を検討し、統合的管理・支援体制を整備し、品質管理された試料を公平に基礎研究機関に提供するシステム構築を目指している。収集研究班へのアンケート調査および収集研究班担当者との討議により患者試料収集に係る単純ではない問題点を明確にすることができた。また基盤研究所内部での難病研究資源バンク専属の医学研究倫理審査委員会を設立することができた。システム整備に関しては、患者試料を処理・検査・保管管理のための施設・機器の整備を行うとともに、コード管理システムの構築を行った。

A. 研究目的

難治性疾患のうち頻度の低い疾患については、臨床現場において患者を経験することはまれであり、患者試料等の集中化がなされなければ、多数の症例試料を必要とする疾患克服研究の実現は困難である。このような希少疾患試料を経年蓄積収集し集中保存管理し、研究者に提供することで統計的に有意な研究が可能となり、この困難性を乗り越えることができる。

本分担研究の目的は難治性疾患試料の研究資源バンクである「難病研究資源バンク」を設立するための問題点を明らかにし、難病研究資源バンクの具体的なシステム構築を検討することによって、難治性疾患克服研究の推進に貢献することにある。

これまで20年以上にわたり継続されてきた難治性疾患克服研究班の協力を得て試料

等を「難病研究資源バンク」に集中化し、厳しく品質管理された患者試料を一定の規模で集積し統一的研究試料の提供を行うことにより、班内の共同研究を支援すると同時に班外の研究者への公平かつ効率的な研究利用促進を図り、難病研究資源のワンストップを創生することは疾患克服研究推進に大いに貢献することが考えられる。

試料提供の公平性に関しても、これまでの公的バンク運営の経験やノウハウ等を活かすとともに、第三者機関として研究資源利用審査委員会（仮称）を設置して偏りのない資源提供システムを構築することによって担保することが可能になる。疾患患者の権利保護や研究利用の倫理問題、また診断臨床医の権利など、法的倫理的及び権利調整の問題克服が重要課題でありこの課題での具体的対応策についても検討する。