

201009005A

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発

平成22年度 総括研究報告書

平成23年5月

主任研究者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発

(H21-創薬-一般-002)

平成22年度 総括研究報告書

平成23年5月

主任研究者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター

臨床研究センター（感覚器センター）

<http://www.kankakuki.go.jp>

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発

班員名簿（平成23年5月現在）

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
主任研究者	岩田 岳	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター	部長
分担研究者	岡田 秀親 吉川 泰弘 村上 晶 溝田 淳 安川 力 臼倉 治朗	株式会社蛋白科学研究所 東京大学大学院農学生命科学研究科 (H22.5.31迄) 北里大学獣医畜産学研究科 (H22.6.1より) 順天堂大学医学部眼科 帝京大学医学部眼科 名古屋市立大学医学部眼科 名古屋大学エコトピア科学研究所	医長 教授 教授 教授 准教授
事務局	涌井 笑子	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター（感覚器センター） 分子細胞生物学研究室 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL：03(3411)0111（内8659） FAX：03(3411)1026 E-Mail：wakuishoko@kankakuki.go.jp	秘書
経理事務担当	薄根 芳彦	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 事務部 企画課 〒152-8902 東京都目黒区東が丘2-5-1 TEL：03-3411-0111（内2122） FAX：03-3411-0366 E-Mail：yusune @ntmc.hosp.go.jp	業務班長

# 目 次

## I. 総括研究報告

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発

岩田 岳	国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
岡田 秀親	愛知淑徳大学医学福祉部視覚科学専攻
吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科 (H22. 5. 31 迄) 北里大学獣医畜産学研究科 (H22. 6. 1 より)
村上 晶	順天堂大学医学部眼科
溝田 淳	順天堂大学医学部浦安病院眼科
安川 力	名古屋市立大学大学院医科学研究所
臼倉 治朗	名古屋大学エコトピア科学研究所

## II. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告

平成22年度 厚生省科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

黄斑変性カニクイザルを用いた補体抑制による加齢黄斑変性の予防薬の開発に関する研究

研究代表者 岩田 岳 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 部長

研究要旨：加齢黄斑変性は加齢、感受性遺伝子、環境因子によって発症する多因子性疾患と考えられている。その直接的な原因として網膜色素上皮細胞周辺における補体の活性化がある。補体の活性化の原因はまだ解明されていない。本研究は加齢黄斑変性の新規予防法の開発を目的として、若年性の黄斑変性カニクイザルを用いた補体 C5a, C3a の抑制薬、Compstatin および AcPepA によるドルーゼン抑制試験を目的とする。静注、硝子体投与から徐放剤を用いた長期的連続投与へと開発を進展させている。

分担研究者：溝田淳・帝京大学医学部眼科・教授、木村至・順天堂大学眼科・准教授、谷戸正樹・島根大学医学部眼科・講師、渡辺すみ子・東京大学医科学研究所再生基礎医科学寄付研究部門・特任教授、原英彰・岐阜薬科大学薬効解析室・教授

#### A. 研究目的

本研究は独立行政法人国立医薬基盤研究所霊長類医学研究センターで発見された世界で唯一の若年性（遺伝性）黄斑変性カニクイザルの病理学的及び分子生物学的解析結果に基づいて、補体活性抑制による加齢黄斑変性の予防法の開発を目的とする。これまでの研究から疾患サルはヒト加齢黄斑変性の初期に（50歳以上）観察される網膜下の蓄積物（ドルーゼン）が生後2年で観察され、その組成に補体活性因子が含まれていることを発見した(Umeda, Iwata et al, IOVS 2005, FASEB J 2005)。さらに疾患個体は局所網膜電図（ERG）の分析によって黄斑部での光に対する反応が消失していることから、ヒトの萎縮型加齢黄斑変性に類似することが明らかになっている。神経網膜と血管豊富な脈絡膜の境に存在する1層の網膜色素細胞はバリアー機能や視細胞の食作用があり、加齢黄斑変性の発症と密接に関係している。疾患個体の網膜色素上皮細胞で抗原提示分子の大きな発現変動が観察され、タイトジャンクションタンパク質 ZO-1 が消失していることからバリアー機能が破綻し、脈絡膜側から血漿が漏れて網膜下で補体活性が生じていると考えられる(Chi, Iwata et al, 投稿準備中)。

補体活性化による網膜下の局所的な炎症反応が加齢黄斑変性の主要原因とするならば、これを抑制することによる予防が期待される。補体活性経路である古典経路、2次経路、レクチン経路が合流する補体因子 C3a (C3a)を特異的に抑制するコンプスタチン（開発 Pennsylvania 大学 John Lambris 教授）の改良型を疾患個体8頭に硝子体投与し、ドルーゼンの消失が観察された(Chi, Iwata et al, Adv Exp Med Biol 2010)。この研究ではコンプスタチンを毎週硝子体投与したが、ヒトの患者の場合にはこの治療法は感染の危険性がともなう。

そこで補体活性経路の C3a の下流に位置し、生体内に存在する分子数も C3a の 1/100 の C5a を抑制する方法が考えられ、岡田秀親（名古屋市立大学名誉教授、(株)蛋白質科学研究所所長）が開発した C5 抑制薬 AcPepA を今年度から静注によって投与を開始した。薬効評価は眼底観察、自発蛍光観察、黄斑部の視機能を評価するための局所網膜電図を毎月行っている。さらに、生体内での AcPepA の分解速度を考慮して、生体分解性素材に埋め込む叙放剤の開発を開始した。

#### B. 研究方法

(1) C5a 補体抑制薬 AcPepA の合成と徐放剤の開発：cGMP 規格の AcPepA を依頼合成し、前臨床安全性試験で安全確認を行う。株式会社蛋白質研究所によって開発された補体因子 C5a 抑制薬は半減期が短いために硝子体内での適正濃度が維持されるように叙放剤の開発が進められている。叙放剤の材質には生体分



解性（中期叙放）と非生体分解性叙法剤（長期叙放）が検討されている。

（2）薬効試験に用いる黄斑変性カニクイザルの選別：これまで行ってきた C3a 抑制薬コンプスタチンの薬効試験の経験から、利用する疾患個体は黄斑部にドルーゼンが数十個ほど集中する 5-10 歳の疾患個体を性別の割合を均等にして利用することが望ましいと考えられる。評価の指標はドルーゼンの形状変化、数、体積とし、細胞あるいは分子レベルでの評価は安楽死後、網膜切片、網膜色素上皮細胞の初期培養、質量分析計を用いた網膜及び血漿の網羅的なプロテオーム解析を行い、同年齢、同性別の健常個体と比較する。

（3）C5a 補体抑制薬 AcPepA の黄斑変性カニクイザルへの硝子体投与：平成 21 年度は AcPepA の静注を 2mg/Kg/週の条件で 2 頭、200 µg/month の条件で硝子体投与を 3 頭について開始する。硝子体投与の方法は全身麻酔の状態ヒトと同様な眼球表面の消毒プロトコルに従って行う。投与前と投与後（1 日、7 日、14 日）の房水・及び血漿のサンプリングを行い、生体内の AcPepA 量が補体抑制に十分量か検討しながら実験を進める。世界眼科研究会議の共通した倫理的認識及び規則から硝子体投与は片眼のみとし、もう片眼については何ら処置を行わない。

（4）C5a 補体抑制薬 AcPepA の黄斑変性カニクイザルに対する薬効評価：硝子体投与の期間は C3a 抑制薬コンプスタチンの経験から 12-24 ヶ月かかると予想される。この期間中主に眼底カメラによる撮影に加え、ハイデルベルグスペクトラリス HRA+OCT によってドルーゼンの数、形状、大きさについて情報を収集し、網膜断層像から網膜の 3 次元構造を各タイムポイントで記録し、継時的な変化を比較検討する。また、PET による神経網膜の形態についても解析する。

（5）C5a 補体抑制薬 AcPepA の黄斑変性カニクイザルの網膜細胞への影響について解析する：投与前に比べて顕著な薬効が確認された場合、あるいは最大試験期間の 30 ヶ月に達した場合に、薬効試験の疾患個体は全て安楽死させ、眼球の解析を行う。解析内容としては、1) 硝子体成分の分析、2) 網膜切片の作成と光学顕微鏡用、電子顕微鏡用による細胞内外の観察、3) 網膜色素上皮細胞の AcPepA

による影響を 2 次元電気泳動による網羅的プロテオーム解析及び DNA マイクロアレー（カニクイザル用、FILGEN）による遺伝子発現解析によって行う。免疫関連遺伝子の変動やタイトジャンクションタンパク質 ZO-1 の局在が正常化しているか検証する。4) 網膜と網膜色素上皮細胞+脈絡膜のタンパク質及び RNA の抽出によって網膜色素上皮細胞と同様な解析を行い、同年齢の健常個体のデータと比較する。

（6）予防・治療法の条件設定を支援するためのデータベース構築：研究期間中に収集するデータはドルーゼンの数、形状、体積、網膜像、蛍光造影像、網膜断層像、網膜血管走行、細胞の機能解析（プロテオーム、遺伝子発現）、PET など様々なデータを収集することになる。これらの形式の異なるデータを関連付けるデータベースを構築し、補体抑制効果が最大限に得られる条件を推測する。

### C. 研究結果

（1）黄斑変性カニクイザルの病理学的、分子細胞生物学的解析：疾患カニクイザルのドルーゼンについて継時的な観測を行った結果、早い個体では 1 歳後半から黄斑を中心にドルーゼンが現れ、生後 2-5 歳の間に急激にその数が増加する。黄斑部の局所 ERG を測定した結果、黄斑を中心として 5°、10°、15° の範囲で光に対する網膜の反応が消失していることが明らかになった。この結果、疾患サルは萎縮型黄斑変性を発症しており、ヒトの 20 倍の進行速度でドルーゼンが蓄積し、視機能が障害されることが確認された。

（2）疾患個体から分離培養された網膜色素上皮細胞のマイクロアレーを用いた遺伝子発現解析及びプロテオーム解析による蛋白発現解析：網膜色素上皮細胞は神経網膜と脈絡膜層を分離する重要なバリアの役目を果たしており、視細胞外節のどん食作用や各種成長因子の放出など、網膜の恒常性維持には不可欠である。この細胞の機能低下によってドルーゼンの蓄積が起こると予測されている。今回我々は重症、軽症、健常個体の網膜色素上皮細胞（RPE 細胞）を分離培養し、その増殖やタイトジャンクションタンパク質について観察した結果、重症個体の RPE 細胞は他個体に比較して増殖能が顕著に低下していることが明らかになった。また、タイトジャンクションタンパク質の ZO-1 の発現が健常 RPE 細胞と

比較して重症個体では細胞周辺に局在が観察されず、バリア機能が破綻していることが明らかにされた。ドルーゼンが早期に蓄積する根拠となる。また、これらの RPE 細胞について、カニクイザル専用の遺伝子発現解析用 DNA マイクロアレーを用いて発現遺伝子の比較を行った結果、MHCI 遺伝子ファミリーに 20-30 倍の差で発現が上下していることが明らかになった。MHCI 遺伝子は獲得免疫に関与するだけでなく、細胞の食食作用にも関与しており、これら一連の機能が破綻していることによって、早期ドルーゼンの蓄積から視機能低下へと進行すると考えられる。世界的には萎縮型加齢黄斑変性の患者数が最も多いことから、本研究事業によって得られた情報の応用が期待される。

(3) 補体抑制薬による動物実験：補体抑制薬として補体因子 C5a と C3b をそれぞれ抑制する AcPepA と Compstatin20 について静注、硝子体投与を実施したが、静注による効果は一週間間隔でも確認できなかった。硝子体投与については一週間の間隔でのみ有効であることが明らかとなった。1 回の投与量は 100  $\mu$ l である。

(4) 若年性加齢黄斑変性カニクイザルの原因遺伝子の解明：2006 年に発表されたマカカ属の連鎖解析マーカーを用いて生存する個体から抽出された DNA 検体についてフラグメント解析に続き、連鎖解析が行われた。また、2007 年にはマカカ属のアカゲザルのゲノム配列が論文として報告され、その後徐々にアノテーションが終了した遺伝子配列、遺伝子多型、新たな連鎖解析マーカーがデータベース上で整備されてきた。これらの情報を利用しながら詳しく解析した結果、15p 領域に強く相関することが明らかになった。この領域は免疫関連分子がクラスターを形成して存在する場所であり、遺伝子解析と RPE 細胞の解析によって加齢黄斑変性における獲得免疫と自然免疫の関与を強く示唆する結果となった。さらに平成 23 年度は次世代シーケンサーによるエクソーム配列解析によって原因遺伝子を解明する予定である。

(5) 加齢黄斑変性リスク遺伝子の探索：国立病院機構の付属病院と順天堂大学医学部浦安病院眼科を中心として滲出型加齢黄斑変性の DNA 250 検体が集められた。このうち 200 の DNA 検体とコントロールとなる加齢性

白内障対象 200 DNA 検体について Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array Set を用いて全ゲノム相関解析を行った。その結果、染色体 1 番-22 番の中でボンフェローニ補正をクリアした 3 つの SNP が p 値  $10^{-14}$  の確からしさで検出された。これらの SNP は全て染色体 10 番の同じローカスに存在し、仮想遺伝子の LOC387715 と HTRA1 遺伝子が存在する。LOC387715 はウエスタンブロットによって内在タンパク質が確認されており、non-coding RNA としての機能について解析中である。HTRA1 についてはノックアウトマウスを作製したが、生後 12 ヶ月でも網膜の異常が観察されなかった。そこで HTRA1 を高発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、脈絡膜層が薄くなり、一部 RPE 細胞の萎縮が観察され、滲出型加齢黄斑変性を発症する土台が作られたと考えられる。このマウスはきわめて衛生的な環境で適正な食事で飼育されており、強い青色光（環境因子）や喫煙（習慣因子）を加えることによって加齢黄斑変性に類似する異常を発症できる可能性がある。米国での同様な解析では染色体 10 番に加え、1 番の補対 H 因子も相関するが、この領域については日本人の滲出型加齢黄斑変性は相関していない。欧米に比較して日本での加齢黄斑変性の患者数が少ないことや、滲出型の加齢黄斑変性が多いことはこれまで謎であったが、本研究によって遺伝的な回答が得られたと考えられる。これらの情報は早期診断法の確立だけでなく、発症機序の解明にもきわめて重要な発見であり、特許も出願された。

(6) 加齢黄斑変性血漿バイオマーカーの探索：血漿成分によって疾患の早期発見が可能か検討した。東レ株式会社及び参天製薬株式会社と共同開発した低分子量蛋白分画装置を用いてアルブミンやグロブリンなどの主蛋白が除かれ、その残りの分画について逆相クロマトグラフィーを行った結果、加齢黄斑変性と白内障のクロマトグラムには大きな違いが観察された。これからフラクションについてトリプシン処理を行い、2次元クロマトグラフィーでさらに分画した後にイオントラップ型質量分析計によってプロテオーム解析が行われた。この結果、ユビキチンを含む複数のタンパク質が患者血漿で優位に検出された。これらのタンパク質は加齢黄斑変性の生体内で特異的にユビキチン化され、分解されて血漿中に漏出されると予測され、早期診断マーカー



一として利用に加えて、発症機序との関係で分解機構について研究中である。これらの結果は特許として出願された。

(7) 予防・治療法の条件設定を支援するための支援情報システムの構築：症例情報に加え、患者遺伝子情報、患者血漿蛋白情報をデータベース化し、検索できるシステムを構築中である。

#### D. 考察

本研究は霊長類医科学研究センターの加齢黄斑変性カニクイザルの病理学的、分子細胞生物学的解析と補体抑制による加齢黄斑変性の予防法の開発を中心にヒト加齢黄斑変性の感受性遺伝子の解明や機能解析による萎縮型と滲出型の違いについて研究を行った。当初予定されていた研究内容については全て実行あるいは実行準備に着手したが、一部の実験については必要性の低下、あるいは研究期間内の実行が難しくなった。本研究によって加齢黄斑変性の基礎的情報から創薬について多くのことが明らかになり、引き続きこの研究を継続する予定である。

本研究の解析対象である黄斑変性カニクイザルは国内外の多数の研究者に注目されている。その原因として、生後2年でドルーゼンが観察され、ドルーゼンが過度に蓄積することによって黄斑の視機能が顕著に低下するような霊長類モデルが世界的に存在しないからである。優性遺伝によって疾患サルから生まれる半数が疾患個体であり、その確認に2年間しか要しないことから多数の疾患個体が確保されている。これまでに国内外の複数の企業から加齢黄斑変性の予防薬について薬効試験の依頼が寄せられている。

本研究が実施されている期間中に米国を中心に10社ほどが他の病気で開発された補体抑制薬を加齢黄斑変性に転用することを発表しており、2008年のアメリカ眼科アカデミーでも可能性が示された。しかし、多くの会社は補体活性経路（古典経路、2次経路、レクチン経路）の始点をターゲットにしており、2社のみがC3、C5をターゲットにしている。本研究は世界に先駆けて補体抑制の効果を示すことができた。

また、疫学調査が進んでいる先進国において、日本人に占める加齢黄斑変性の有病率や種類が異なっていることがこれまで指摘されてきたが、その理由に遺伝的な特徴が存在することを発見できたことは、日本人に適した

今後の予防・治療法の開発に方向性を示すことができたと考える。中国、韓国、台湾などでの同様な解析が注目される。

黄斑変性カニクイザルの連鎖解析やRPE細胞の遺伝子、プロテオーム解析から獲得免疫と自然免疫の双方が疾患の発症と強く関与していると考えられる。RPE細胞は視細胞の食食を一生継続するが、食食された細胞はオートファージ機構を使って分解され、そのペプチド断片がMHCI分子によって認識・制御されている可能性がある。ドルーゼンの生成を解明する基礎的な研究として今後の進展が期待される。血漿プロテオーム解析においてユビキチン化されたタンパク質断片が加齢黄斑変性の患者血漿から検出されている。これらのタンパク質がどこに由来しているのか不明であるが、加齢黄斑変性の進行を組織中のタンパク質分解量で診断できる可能性が示唆された結果である。本研究で得られた遺伝子多型情報や血漿タンパク質情報は今後開発される予防薬の対象となる患者を分類するために必要な情報としり利用され、テーラーメイド医療へと応用されることを期待する。

本研究は霊長類を疾患動物モデルとし、硝子体投与による薬効試験を行ったことにより、予想よりも実験に時間を要した。高い純度の補体抑制薬が調製され、毎週の硝子体投与にもかかわらず、炎症反応も観察されず1年間の薬効試験を無事に終わらせることができた。

#### E. 結論

本研究は加齢黄斑変性の原因解明と予防法の開発を目的として1) 世界で唯一の若年性黄斑変性カニクイザルの病理学的解析、2) 疾患サルを用いた補体抑制による予防法の開発、3) ヒト加齢黄斑変性のバイオマーカーの探索を目的とした感受性遺伝子の探索と機能解析、4) 血漿プロテオーム解析を行った。補体因子C4およびC3の活性化を抑えることにより、一部の疾患個体において、約半年でドルーゼンの拡散あるいは消失が確認された。また、日本人の滲出型加齢黄斑変性患者を対象とした感受性遺伝子の探索では染色体10番のLOC387715とHTRA1遺伝子領域にp値 $1.0 \times 10^{-14}$ のSNPが3つ検出された。HTRA1のノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを作製したところ、後者で脈絡膜の異常が観察された。血漿プロテオーム解析ではユビキチン化によって分解されたタンパク質が複数検出された。本研究で得られた補体抑制による予

防法、感受性遺伝子、血漿タンパク質に関する情報は加齢黄斑変性の今後研究に応用されると期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Fujikawa K, Iwata T, Inoue K, Akahori M, Kadotani H, Fukaya M, Watanabe M, Chang Q, Barnett EM, and Swat W. Vav2 and Vav3 as candidate disease gene for spontaneous glaucoma in mice and human. PLOS One 5:e9050 (2010)

Fujinami K, Akahori M, Fukui M, Tsunoda K, Iwata T, and Miyake Y. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. Acta Ophthalmologica (2010)

Okamoto H, Umeda S, Nozawa T, Suzuki MT, Yoshikawa Y, Matsuura ET, and Iwata T. Comparative proteomic analyses of macular versus peripheral retina in Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Experimental Animal (2010)

Chi Z, Akahori, A, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Takada Y, and Iwata T. Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice. Human Molecular Genetics (2010)

Chi Z, Yasumoto F, Sergeev Y, Minami M, Obazawa M, Kimura I, Takada Y, and Iwata T. Mutant WDR36 directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice. Human Molecular Genetics (2010)

Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Hatase T, Nakamura M,

Ohde H, Itabashi T, Okamoto H, Takada Y, and Iwata T. Dominant mutations in RP1L1 gene are responsible for occult macular dystrophy. The American Journal of Human Genetics (2010)

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. The Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem(2011)

Zi-Bing Jin, S. Okamoto, F. Osakada, K. Homma, J. Assawachananont, Y. Hirami, T. Iwata, M. Takahashi. Modelong Retinal Degeneration Using Patient-Specific induced Pluripotent Stem Cells. PLOS One e17084(2011)

##### 学会発表

感覚器シンポジウム (東京、2010, 3) 赤堀正和、加齢黄斑変性症およびポリープ状脈絡膜血管症における全ゲノム関連解析

第49回日本網膜硝子体学会 (大阪、2010, 11) 岩田岳、黄斑変性と黄斑ジスロトフィーの基礎研究

池 在龍、赤堀正和、安本史恵、Yuri Segreev、皆見政好、尾羽澤実、野田徹、Naoki Nakaya、Stanislav Tomarev、川瀬和秀、山本哲也、野田節子、笹岡正顕、島崎敦、木村至、高田雄一郎、岩田 岳、緑内障遺伝子 OPTN、WDR36 トランスジェニックマウスの作製とその解析

3rd Retina Research Meeting (東京、2010, 12) 赤堀正和、オカルト黄斑変性症原因遺伝子の解明

I. Kimura, H. Okamoto, Z.-L. Chi, M. Akahori, M. T. Suzuki, T. Iwata. Analysis of Colocalization of Rab8 and ERM Family in the Ocular Body. ARVO2010ANNUALMEETING (FortLauderdale, USA, 2010)

T. Iwata. Z.-L. Chi, M. Akahori, Y. Takada, N. Nakaya, S. Tomarev, Y. Sergeev. CHARACTERIZATION OF GLIA CELLS IN OPTN AND WDR36 TRANSGENIC MICE 19th International Congress for Eye

Research. (Montreal.CANADA.2010)

H. Okamoto, Z.-L. Chi, M. Minami, N. Terauchi, Y. Haruhata, M. Obazawa, T. Noda, M. Honda, A. Mizota, M. Tanaka, K. Matsuno, K. Tanahashi, J. Utsumi, T. Iwata.  
ENRICHMENT AND ISOLATION OF LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEIN IN PLASMA FROM PATIENTS WITH OCULAR DISEASES USING A PROTEIN SEPARATOR. 19th International Congress for Eye Research. (Montreal.CANADA.2010)

Chi ZL. T. Toshida, K. Fujinami, Y. Miyake, A. Mizota, M. Suzuki, K. Terao, Y. Yoshikawa, J.D.Lambris, P. Olson, T. Iwata.  
SUPPRESSION OF DRUSEN FORMATION BY COMPSTATIN (POT-4), A PEPTIDE INHIBITOR OF C3 ACTIVATION, ON CYNOMOLGUS MONKEY WITH EARLY-ONSET MACULAR DEGENERATION. 19th International Congress for Eye Research. (Montreal.CANADA.2010)

Chi ZL. Akahori M, Obazawa M, Minami M, Noda T, Nakaya N, Tomarev S, Kawase K, Yamamoto T, Noda S, Sasaoka M, Shimazaki A, Sergeev Y, Takada Y, Iwata T. Overexpression of mutant OPTN and WDR36 leads to a progressive retinal degeneration in mice. 50th American Society for Cell Biology. (Philadelphia.USA.2010)

## 書籍

Chi Z.Yoshida T, Lambris JD, and Iwata T. Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on Cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. Inflammation and retinal disease: complement biology and pathology. John D.Lambris Anthony P. Adamis. 127-135. Springer. (2010)

岩田岳、「眼科と補体」、『補体への招待』木下タロウ編、189-193、メディカルビュー社 (2011)

岩田 岳、「視力・資格を司る黄斑の生理機能と黄斑変性の分子メカニズム」、『実験医学』、加我君孝編、526-532、羊土社(2011)

## 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（平成20-21年度）  
なし
3. その他  
なし

## II. 研究成果の刊行物・別刷

## Dominant Mutations in *RP1L1* Are Responsible for Occult Macular Dystrophy

Masakazu Akahori,<sup>1</sup> Kazushige Tsunoda,<sup>1</sup> Yozo Miyake,<sup>1,2</sup> Yoko Fukuda,<sup>3</sup> Hiroyuki Ishiura,<sup>3</sup> Shoji Tsuji,<sup>3</sup> Tomoaki Usui,<sup>4</sup> Tetsuhisa Hatase,<sup>4</sup> Makoto Nakamura,<sup>5</sup> Hisao Ohde,<sup>6</sup> Takeshi Itabashi,<sup>1</sup> Haru Okamoto,<sup>1</sup> Yuichiro Takada,<sup>1</sup> and Takeshi Iwata<sup>1,\*</sup>

Occult macular dystrophy (OMD) is an inherited macular dystrophy characterized by progressive loss of macular function but normal ophthalmoscopic appearance. Typical OMD is characterized by a central cone dysfunction leading to a loss of vision despite normal ophthalmoscopic appearance, normal fluorescein angiography, and normal full-field electroretinogram (ERGs), but the amplitudes of the focal macular ERGs and multifocal ERGs are significantly reduced at the central retina. Linkage analysis of two OMD families was performed by the SNP High Throughput Linkage analysis system (SNP HiTLink), localizing the disease locus to chromosome 8p22-p23. Among the 128 genes in the linkage region, 22 genes were expressed in the retina, and four candidate genes were selected. No mutations were found in the first three candidate genes, methionine sulfoxide reductase A (*MSRA*), GATA binding 4 (*GATA4*), and pericentriolar material 1 (*PCMI*). However, amino acid substitution of p.Arg45Trp in retinitis pigmentosa 1-like 1 (*RP1L1*) was found in three OMD families and p.Trp960Arg in a remaining OMD family. These two mutations were detected in all affected individuals but in none of the 876 controls. Immunohistochemistry of *RP1L1* in the retina section of cynomolgus monkey revealed expression in the rod and cone photoreceptor, supporting a role of *RP1L1* in the photoreceptors that, when disrupted by mutation, leads to OMD. Identification of *RP1L1* mutations as causative for OMD has potentially broader implications for understanding the differential cone photoreceptor functions in the fovea and the peripheral retina.

Occult macular dystrophy (OMD) is an autosomal-dominant form of inherited macular dystrophy characterized by progressive decrease of visual acuity due to macular dysfunction, which was first reported by Y.M. et al. in 1989.<sup>1-3</sup> The disorder was called "occult" because of the fact that the macular dysfunction of this disease is hidden by a normal fundus appearance. Typical OMD, as described by Y.M. et al., is characterized by central cone dysfunction and in some cases rod dysfunction, leading to a loss of vision despite normal ophthalmoscopic appearance, normal fluorescein angiography, and normal full-field electroretinograms (ERGs). However, the amplitudes of the focal macular ERGs and multifocal ERGs are significantly reduced, indicating dysfunction of the central retina.<sup>1,2,4</sup> OMD is known for its broad range of age at disease onset, from 6 to 81 yrs. Brockhurst et al. have reported age at onset of four out of eight OMD patients at over 65 yrs<sup>5</sup> and similar findings have also been observed in earlier cases.<sup>1,2</sup> The patient III-3 in family 1 did not notice any visual disturbance in her right eye even at the age of 81 yrs.

The four families shown in Figure 1 demonstrate dominant inheritance of the OMD phenotype. None of the patients had ocular diseases other than OMD, except senile cataract or diabetic retinopathy. Control family members were confirmed to be normal via a complete ophthalmic examination including focal macular ERGs or multifocal

ERGs. For this study, the ethics review committees of the National Hospital Organization Tokyo Medical Center, the Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, and the Nagoya University Medical School approved the study, and written informed consent was obtained from both affected and unaffected subjects.

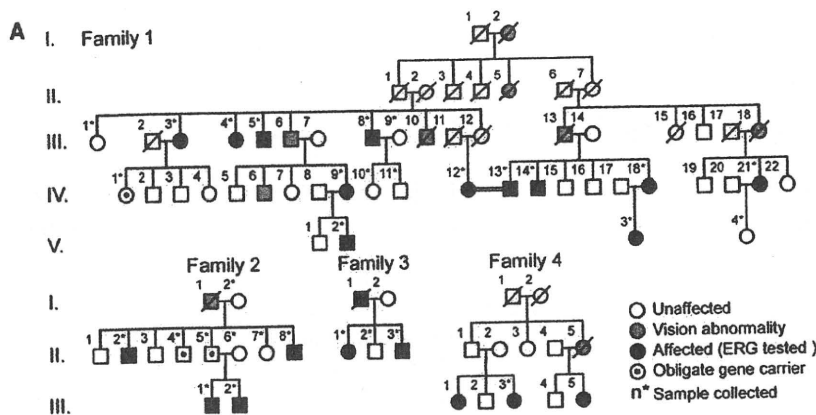
Linkage analysis of OMD families 1 and 2 was performed. Eighteen individuals from family 1 and eleven individuals from family 2 were genotyped by Affymetrix's Genome-Wide Human SNP array 6.0 in accordance with the manufacturer's instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). DNA samples from family 2 were subjected to whole-genome amplification with the use of REPLI-g (QIAGEN, Tokyo, Japan) prior to SNP genotyping. With SNP HiTLink<sup>6</sup> used as a pipeline, SNPs with a Hardy-Weinberg  $p$  value  $> 0.001$ , a call rate of 1, and a maximum confidence score  $> 0.02$  were used for the analysis. SNPs with the minor allele frequency of 0 in controls were eliminated from the analysis. Parametric multipoint linkage analysis (autosomal-dominant model with a setting of liability classes; age-dependent penetrance of 0.19, 0.55, and 0.91 for 0–20, 21–40, and  $> 41$  yrs old, respectively, and disease frequency of 0.000001) was performed with Allegro version 2,<sup>7</sup> intermarker distance from 80 kb to 120 kb with the use of SNP HiTLink. Because of the limitation of computational capacity, family 1 was divided into two branches (branch 1-1: descendants of II-1; branch

<sup>1</sup>National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, 2-5-1 Higashigaoka, Meguro-ku, Tokyo 152-8902 Japan;

<sup>2</sup>Aichi Medical University, 21 Yazakokarimata, Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi-ken, 489-1195 Japan; <sup>3</sup>Department of Neurology, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655 Japan; <sup>4</sup>Division of Ophthalmology and Visual Science, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University, Niigata, 757, Ichibancho, Asahimachidori, Niigata, 951-8510 Japan; <sup>5</sup>Nakamura Eye Clinic, 107-10, Kisei-cho, Nishi-ku, Nagoya, 452-0816 Japan; <sup>6</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

\*Correspondence: iwataakeshi@kankakuki.go.jp

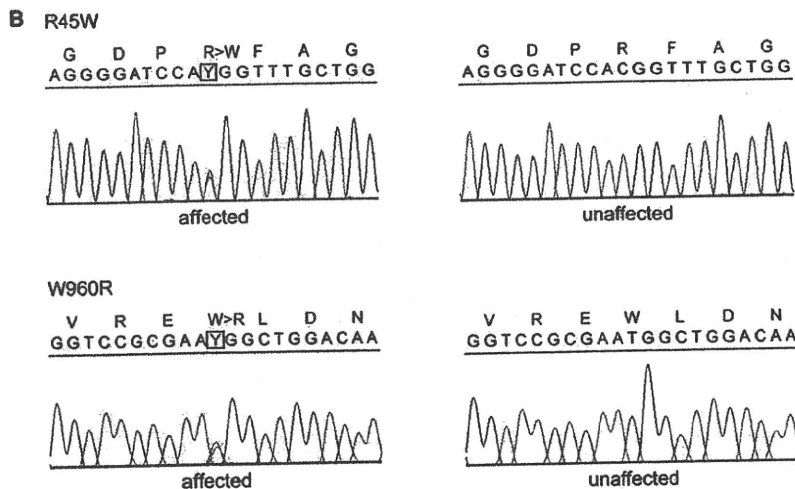
DOI 10.1016/j.ajhg.2010.08.009. ©2010 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.



**Figure 1. Autosomal OMD Families and DNA Sequencing of *RP1L1***

(A) The four families shown demonstrate dominant inheritance of the OMD phenotype. In all presented families, none of the patients had ocular diseases other than OMD, except senile cataract and diabetic retinopathy. Control family members were confirmed to be normal via a complete ophthalmic examination including focal macular ERGs or multifocal ERGs.

(B) DNA sequencing of both p.Arg45Trp and p.Trp960Arg mutations found in four independent families.



a c.3107T>C (p.Trp960Arg) mutation in family 3 (Table 2). Additionally, known and unknown natural variants were found in *RP1L1*, as shown in Table S2. Unknown SNPs were submitted to the dbSNP database.

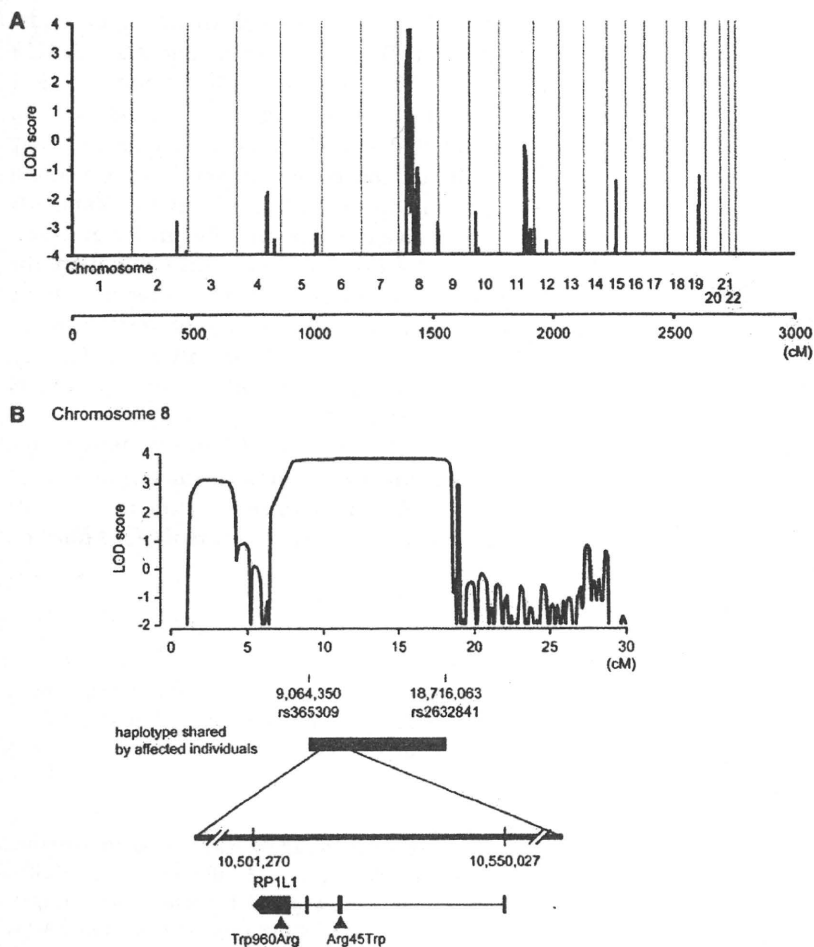
In these four families, all of the affected individuals carried one of the two mutations identified in this study, c.362C>T or c.3107T>C. We identified three apparently unaffected individuals carrying the p.Arg45Trp mutation, which suggest a reduced penetrance of the mutation or possibility a later onset of the disease for these individuals. Both mutations were absent in 1752 Japanese control chromosomes.

1-2: descendants of II-7) for multipoint linkage analysis. Haplotypes were reconstructed by Allegro.

The parametric linkage study of family 1 using SNP microarrays and SNP HiTLink mapped the disease locus to an approximately 10 Mb region of chromosome 8p22-p23 with a maximum LOD score of 3.77 (Figure 2). Parametric linkage analysis of affected individuals only produced similar results (Figure 3 and Figure S2 available online). A common haplotype between rs365309 and rs2632841 was shared by all of the affected individuals (Table 1). With the additional linkage study of family 2, the cumulative parametric multipoint LOD score rose to over 4 (Figure S1). A total of 128 known genes were found within the approximately 10 Mb linkage-associated region, containing 22 retina-expressed genes as candidates for mutational analyses. No mutations were found in the first three candidate genes, methionine sulfoxide reductase A (*MSRA*), GATA binding 4 (*GATA4*), and pericentriolar material 1 (*PCMI*). However, a c.362C>T (p.Arg45Trp) substitution in retinitis pigmentosa 1-like 1 (*RP1L1* [MIM 608581]) was found in all affected individuals in family 1. We further extended the mutational analysis of *RP1L1* to three other families with autosomal OMD, and we identified the p.Arg45Trp alteration in families 2 and 4 and

Immunohistochemistry of *RP1L1* in the macula section of primate *Cynomolgus* monkeys (*Macaca fascicularis*) was performed. The eyes from a 6-yr-old normal male cynomolgus monkey were obtained from Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Japan. All experimental procedures were approved by the Animal Welfare and Animal Care Committee of the National Institute of Biomedical Innovation, in compliance with guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. *Cynomolgus* eyes were removed and immediately fixed overnight with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. After washing in PBS, eyes were cryoprotected in the gradient sucrose dissolved in PBS and embedded into optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue Tek, Miles, IL, USA). Frozen retinal sections cut at 8  $\mu$ m thickness with cryostat were incubated at 4°C with a 1:500 dilution of human *RP1L1* polyclonal antibody raised against the N terminus of human *RP1L1* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Immunofluorescence was visualized with Alexa 568 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Alexa 488 PNA (Invitrogen) for detection of cone photoreceptor, and DAPI (Invitrogen) for nuclear staining. Fluorescence images were analyzed with a confocal laser





**Figure 2. Linkage Analysis and Haplotype Analysis of Family 1**

(A) Parametric multipoint linkage analysis of family 1. Horizontal axis indicates cumulative position (cM) from the short arm of chromosome 1. As a result of computational capacity, family 1 was divided into two branches for calculation of LOD scores. No other chromosomes except chromosome 8 yielded a positive LOD score.

(B) Parametric multipoint linkage analysis of family 1 and mutations in *RP1L1*. A maximum LOD score of 3.77 was obtained at 8p32.1-8p22. A haplotype bounded by rs365309 (physical position: 9,064,350 in the hg18 assembly of the UCSC Genome Browser) and rs2632841 (18,716,063) was shared by all affected individuals. Horizontal axis indicates the position (cM) on the short arm of chromosome 8. Vertical axis indicates the parametric multipoint LOD score. Mutations (p.Arg45Trp and p.Trp960Arg) are demonstrated.

microscope (Radiance 2000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

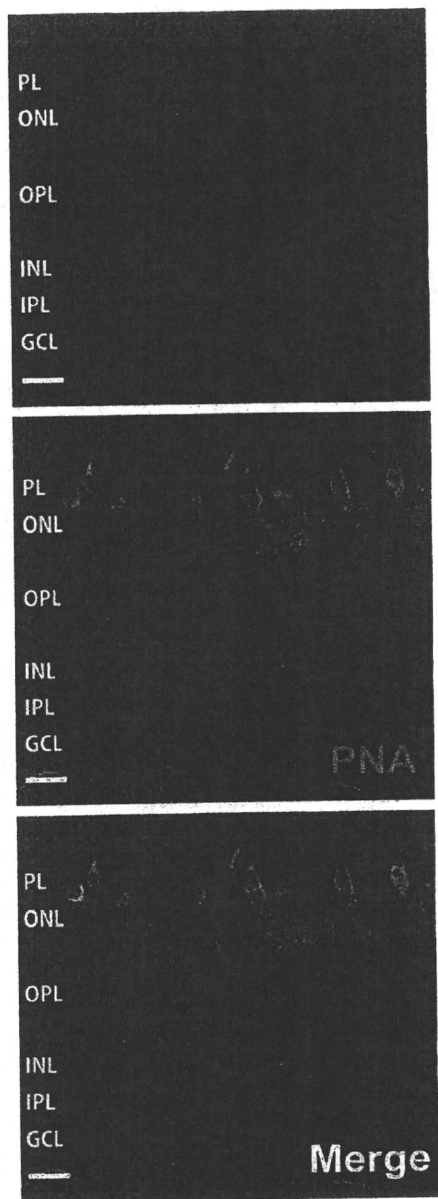
To our surprise, the immunohistochemistry of *RP1L1* in the macula section of *Cynomolgus* monkeys revealed expression in retinal rod and cone photoreceptors by human *RP1L1* antibody (Figure 3). This expression pattern is significantly different from the previous study of mouse *RP1L1*, in which *RP1L1* was localized exclusively in axoneme of rods.<sup>8</sup> Furthermore, the human amino acid sequence is only 39% identical to that of the mouse, due to a lack of both polymorphic 16 amino acid repeats or a lack of the highly repetitive Glu-rich region, making mouse *RP1L1* protein considerably shorter than the human protein, which may lead to different functional roles in the primate retina. Recent investigation of photoreceptor structure in OMD patients using advanced optical coherence tomography suggests that the predominant defect involves the cone photoreceptor.<sup>9,10</sup> Our optical coherence tomography observations also show loss of the cone outer segment tip and irregularity of the inner segment/outer segment junction in the center of the macula of all examined case individuals in family 1 (data not shown). Y.M. et al. have observed that not only cone but also rod sensitivity in the macula was abnormal in some of the older

patients.<sup>1,2</sup> It is likely that the initial event may be macular cone specific but may later extend to rod abnormality. Further investigation of *RP1L1* function is required in order to answer these clinical observations.

*RP1L1* was originally cloned as a gene derived from common ancestor as retinitis pigmentosa 1 (*RP1* [MIM 180100]) on the same chromosome 8.<sup>11,12</sup> *RP1L1* shares 35% amino acid

identity with *RP1*, a gene responsible for 5%–10% of autosomal-dominant retinitis pigmentosa (RP [MIM 268000]) worldwide.<sup>13–15</sup> When *RP1L1* was first identified, a number of attempts were made to identify mutations in *RP1L1* in various RP patients, with no success. The present study demonstrates that *RP1L1* mutation is responsible for OMD, but not for RP. Patients with RP carrying the most common RP1 alteration, p.Arg677X, exhibit night and peripheral vision disturbance beginning in the third decade of life. RP1 is found exclusively in the retina and is localized to both rods and cones. Rod-cone functional comparison in RP patients has indicated that rod sensitivity loss is at least 2 log units greater than cone sensitivity loss.<sup>13</sup> Thus phenotypic characteristics of RP caused by *RP1* mutations and those of OMD caused by *RP1L1* mutations perfectly agree with the different localizations of *RP1* and *RP1L1* in retina.

The outer segments of rod and cone photoreceptors are highly specialized cilia containing hundreds of disc membranes stacked in an orderly array along the photoreceptor axoneme. Previous studies have shown that *RP1* is part of the axoneme and is required for this correct orientation and higher-order stacking of outer segment discs.<sup>16</sup> This is achieved by the interaction of *RP1* with the



**Figure 3. Immunohistochemistry of RP1L1 in the Cynomolgus Monkey Retina**

Localization of RP1L1 in the rod and cone photoreceptors in the Cynomolgus monkey (*Mucaca fascicularis*). Retina labeled with anti-human RP1L1 (red, top); same section labeled with retinal cone specific marker, peanut agglutinin lectin (PNA, green, middle); merged image (bottom). Yellow signal present in cone photoreceptor resulted from combination of the red signal of RP1L1 and the green signal of PNA. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). PL, photoreceptor layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars represent 20  $\mu$ m.

microtubule in the connecting cilia.<sup>17</sup> RP1 contains microtubule-binding domains (amino acids 28–228) of neuronal microtubule-associated protein (MAP) doublecortin (DCX), which is required to maintain axoneme length

and stability.<sup>18</sup> The RP1L1 p.Arg45Trp alteration resides in one of the two DCX domains (amino acids 33–113 and 147–228), which is required for interaction with RP1 to assemble and stabilize axonemal microtubules.<sup>8</sup> In primates, both RP1L1 and RP1 proteins may cooperatively function in the rod and cone photoreceptors to perform this task. The mutation in *RP1L1* is likely to dominantly affect the cooperative function with RP1 in rod and cone photoreceptors, given that in a previous publication, the *RP1L1* heterozygous knockout mice were reported to be normal whereas homozygous knockout mice were reported to develop subtle retinal degeneration. Our findings in OMD may shed light for further investigation of patients with cone dystrophy.

In conclusion, we identified *RP1L1* mutations that cause autosomal-dominant OMD, and furthermore, our findings revealed that *RP1L1* plays essential roles in the cone functions in human and that disruption of *RP1L1* function leads to OMD.

#### Supplemental Data

Supplemental Data include three figures and one table can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG/>.

#### Acknowledgments

This research was supported in part by grants to Takeshi Iwata and Kazushige Tsunoda by the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. This work was also supported in part to Shoji Tsuji by KAKENHI (Grant-in-Aid for Scientific Research) on Priority Areas, Applied Genomics, the Global COE Program, and Scientific Research (A) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Received: June 29, 2010

Revised: August 10, 2010

Accepted: August 12, 2010

Published online: September 9, 2010

#### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)

SNP HiTLink software, <http://www.dynacom.co.jp/u-tokyo.ac.jp/snphitlink/>

#### Accession Numbers

The dbSNP accession numbers for the SNPs reported in this paper are ss252841181 and ss252841182.

#### References

- Miyake, Y., Ichikawa, K., Shiose, Y., and Kawase, Y. (1989). Hereditary macular dystrophy without visible fundus abnormality. *Am. J. Ophthalmol.* 108, 292–299.

**Table 1. Disease-Linked Haplotypes in Families 1 and 2**

Probe Set ID	dbSNP rs ID	Position	Family 1					Family 2	
			Branch 1-1		Branch 1-2			II-2	III-2
			III-8	IV-9	IV-13	IV-18	IV-21		
SNP_A-8338925	rs365309	9,064,350	(A)	(A)	A	A	B	A	A
SNP_A-8281994	rs1530483	9,065,671	B	B	B	B	B	B	B
SNP_A-8360926	rs10086673	10,342,727	B	B	(B)	B	B	(A)	A
SNP_A-2082488	rs9329223	10,369,164	A	A	A	A	A	(B)	B
SNP_A-2013182	rs6601491	10,453,427	B	B	B	B	B	(A)	A
<i>RP1L1</i> p.Arg45Trp	c.133C>T	10,517,989	T	T	T	T	T	T	T
SNP_A-8345504	rs10097570	10,586,268	A	A	A	A	(A)	(B)	B
SNP_A-1790165	rs10111051	10,590,882	A	A	A	A	(A)	(B)	B
SNP_A-8587750	rs2163379	10,769,460	A	A	A	(A)	A	(B)	B
SNP_A-8500791	rs7460507	11,006,485	B	B	B	B	B	A	A
SNP_A-8525908	rs9772321	12,536,010	A	A	A	A	A	A	A
SNP_A-8283296	rs1021087	13,500,502	A	(A)	(A)	A	A	B	B
SNP_A-8441723	rs6987209	14,501,302	B	B	B	B	B	B	B
SNP_A-2044287	rs7818067	15,580,087	A	A	A	A	A	A	A
SNP_A-4273924	rs6992112	16,689,526	A	A	A	A	A	A	(A)
SNP_A-8447659	rs471041	17,707,836	B	B	B	B	B	B	B
SNP_A-8399664	rs2638658	18,713,620	A	(A)	(A)	A	A	(B)	B
SNP_A-4233785	rs2632841	18,716,063	B	B	(B)	B	A	B	B

Disease-linked haplotypes of the two patients (IV-9 and III-8) who are descendants from II-1 (branch 1-1 of family 1), the three patients (IV-13, IV-18, and IV-21) who are descendants from II-7 (branch 1-2 of family 1), and the two patients (II-2 and III-2) from family 2 are shown. Haplotypes are unequivocally determined, except those with brackets that are inferred to minimize the number of recombination events. Disease-linked haplotypes of the two branches of family 1 are the same, confirming that all affected individuals in family 1 share the same haplotype. Recombination events in the family was observed at rs365309 (telomeric boundary) and at rs2632841 (centromeric boundary). When disease haplotypes are compared between families 1 and 2, who share the p.Arg45Trp mutation in *RP1L1* in common, disease-linked haplotypes flanking the *RP1L1* locus are different between these families, suggesting that the p.Arg45Trp mutation originated independently.

- Miyake, Y., Horiguchi, M., Tomita, N., Kondo, M., Tanikawa, A., Takahashi, H., Suzuki, S., and Terasaki, H. (1996). Occult macular dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.* 122, 644–653.
- Wildberger, H., Niemeyer, G., and Junghardt, A. (2003). Multifocal electroretinogram (mfERG) in a family with occult macular dystrophy (OMD). *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 220, 111–115.
- Piao, C.H., Kondo, M., Tanikawa, A., Terasaki, H., and Miyake, Y. (2000). Multifocal electroretinogram in occult macular dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 513–517.
- Brockhurst, R.J., and Sandberg, M.A. (2007). Optical coherence tomography findings in occult macular dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.* 143, 516–518.
- Fukuda, Y., Nakahara, Y., Date, H., Takahashi, Y., Goto, J., Miyashita, A., Kuwano, R., Adachi, H., Nakamura, E., and Tsuji, S. (2009). SNP HiTLink: a high-throughput linkage analysis system employing dense SNP data. *BMC Bioinformatics* 10, 121.
- Gudbjartsson, D.F., Thorvaldsson, T., Kong, A., Gunnarsson, G., and Ingolfsdottir, A. (2005). Allegro version 2. *Nat. Genet.* 37, 1015–1016.
- Yamashita, T., Liu, J., Gao, J., LeNoue, S., Wang, C., Kaminoh, J., Bowne, S.J., Sullivan, L.S., Daiger, S.P., Zhang, K., et al. (2009). Essential and synergistic roles of RP1 and RP1L1 in rod photoreceptor axoneme and retinitis pigmentosa. *J. Neurosci.* 29, 9748–9760.
- Park, S.J., Woo, S.J., Park, K.H., Hwang, J.M., and Chung, H. (2010). Morphologic photoreceptor abnormality in occult macular dystrophy on spectral-domain optical coherence tomography. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 3673–3679.
- Sisk, R.A., Berrocal, A.M., and Lam, B.L. (2010). Loss of foveal cone photoreceptor outer segments in occult macular dystrophy. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 41, 1–3.
- Conte, I., Lestingi, M., den Hollander, A., Alfano, G., Ziviello, C., Pugliese, M., Circolo, D., Caccioppoli, C., Ciccociola, A., and Banfi, S. (2003). Identification and characterization of the retinitis pigmentosa 1-like1 gene (RP1L1): a novel candidate for retinal degenerations. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 155–162.
- Bowne, S.J., Daiger, S.P., Malone, K.A., Heckenlively, J.R., Kennan, A., Humphries, P., Hughbanks-Wheaton, D., Birch, D.G., Liu, Q., Pierce, E.A., et al. (2003). Characterization of

**Table 2. Summary of RP1L1 Mutations in Families with OMD**

ID in Pedigree	Clinical Stage	Sex	Age at Diagnosis	Age at Onset in Estimation	Mutation	Best Corrected Visual Acuity (Right / Left)
1 III3	affected	F	81	50	c.362C>T	1.2 / 0.1
1 III4	affected	F	71	25	c.362C>T	0.4 / 0.5
1 III5	affected	M	74	30	c.362C>T	0.2 / 0.3
1 III8	affected	M	82	20	c.362C>T	0.2 / 0.2
1 IV1	unaffected	F	60	-	c.362C>T	1.2 / 1.2
1 IV9	affected	F	49	unknown	c.362C>T	1.2 / 1.2
1 IV12	affected	F	69	50	c.362C>T	0.1 / 0.07
1 IV13	affected	M	70	20	c.362C>T	0.1 / 0.1
1 IV14	affected	M	66	30	c.362C>T	0.2 / 0.3
1 IV18	affected	F	58	12	c.362C>T	0.1 / 0.1
1 IV21	affected	F	58	47	c.362C>T	0.1 / 0.4
1 V2	affected	M	20	13	c.362C>T	0.3 / 0.3
1 V3	affected	F	19	6	c.362C>T	0.2 / 0.15
2 II2	affected	M	69	unknown	c.362C>T	0.2 / 0.2
2 II4	unaffected	M	58	-	c.362C>T	1.0 / 1.0
2 II5	unaffected	M	55	-	c.362C>T	1.0 / 1.0
2 II8	affected	M	52	unknown	c.362C>T	0.2 / 0.3
2 III1	affected	M	23	23	c.362C>T	0.2 / 0.3
2 III2	affected	M	20	20	c.362C>T	0.3 / 0.3
3 II1	affected	F	29	12	c.3107T>C	0.2 / 0.2
3 II3	affected	M	19	13	c.3107T>C	0.2 / 0.3
4 III3	affected	F	52	30	c.362C>T	0.15 / 0.15

Summary of individuals from autosomal OMD families 1–4, in whom p.Arg45Trp or p.Trp960Arg mutations of *RP1L1* were found. Three unaffected individuals at the age of 55–60 were found with the mutation. These individuals suggest a reduced penetrance of the mutation or a possible onset at a later age.

RP1L1, a highly polymorphic paralog of the retinitis pigmentosa 1 (RP1) gene. *Mol. Vis.* 9, 129–137.

13. Pierce, E.A., Quinn, T., Meehan, T., McGee, T.L., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1999). Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 22, 248–254.
14. Sullivan, L.S., Heckenlively, J.R., Bowne, S.J., Zuo, J., Hide, W.A., Gal, A., Denton, M., Inglehearn, C.E., Blanton, S.H., and Daiger, S.P. (1999). Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 22, 255–259.
15. Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Iannaccone, A., Weleber, R.G., Fishman, G.A., Maguire, A.M., Affatigato, L.M., Bennett, J., Pierce, E.A., Danciger, M., et al. (2000). Disease expression of

RP1 mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1898–1908.

16. Liu, Q., Lyubarsky, A., Skalet, J.H., Pugh, E.N., Jr., and Pierce, E.A. (2003). RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4171–4183.
17. Liu, Q., Zuo, J., and Pierce, E.A. (2004). The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J. Neurosci.* 24, 6427–6436.
18. Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E., and Walsh, C.A. (1998). Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92, 63–72.

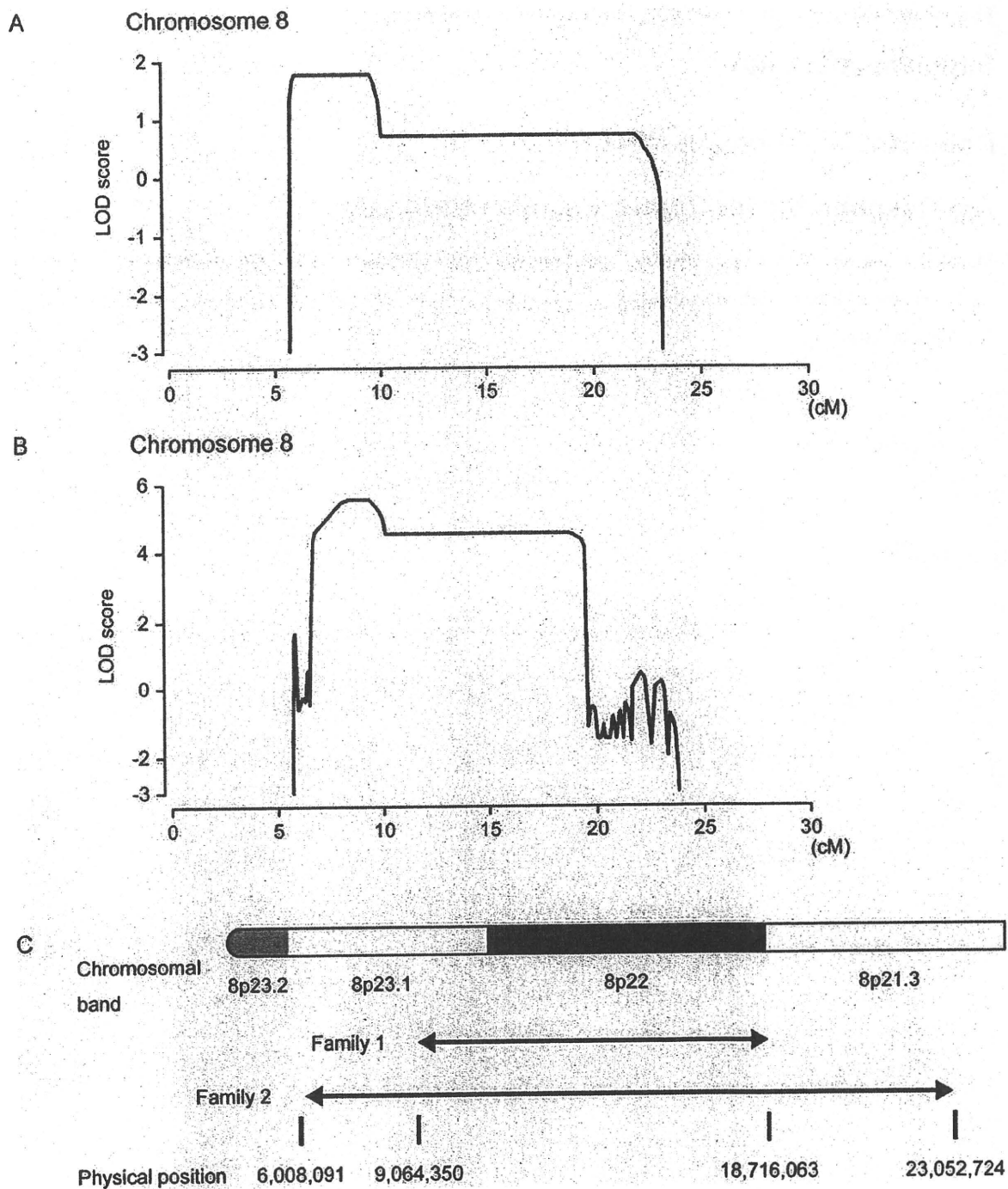
The American Journal of Human Genetics, Volume 87

**Supplemental Data**

**Dominant Mutations in *RP1L1***

**Are Responsible for Occult Macular Dystrophy**

Masakazu Akahori, Kazushige Tsunoda, Yozo Miyake, Yoko Fukuda, Hiroyuki Ishiura, Shoji Tsuji, Tomoaki Usui, Tetsuhisa Hatase, Makoto Nakamura, Hisao Ohde, Takeshi Itabashi, Haru Okamoto, Yuichiro Takada, and Takeshi Iwata



**Figure S1. Linkage Analysis and Haplotype Analysis of Family 2**

(A) Result of parametric multipoint analysis of Family 2. (B) Cumulative parametric multipoint LOD scores of Families 1 and 2. (C) Candidate regions based on the parametric analysis of Families 1 and 2.