

201135006A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等疾患分野の医療の実用化研究事業

(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

(H23-実用化(難病) - 一般-006)

平成23年度 総括研究報告書

平成24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)

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等疾患分野の医療の実用化研究事業

(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

(H23-実用化(難病) - 一般-006)

平成23年度 総括研究報告書

平成24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>

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

班員名簿（平成24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	古野正朗 池尾一穂 三宅養三 角田和繁 近藤峰生 篠田 啓 國吉一樹 林 孝彰 吉村長久	理化学研究所オミックス基盤研究領域 国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究センター 愛知医科大学 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 三重大学大学院医学系研究科神経感覚医学講座眼科学 帝京大学医学部眼科学教室 近畿大学医学部眼科学教室 東京慈恵会医科大学眼科学教室 京都大学医学部眼科学教室	上級研究員 准教授 理事長 室長 教授 准教授 講師 講師 教授
事務局	能見けいこ	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部 〒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: nomikeiko@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 i@ntmc. hosp. go. jp	事務員

# 目次

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

## I. 総括研究報告

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（感覚器センター）

## II. 分担研究報告

古野正朗 理化学研究所オミックス基盤研究領域

池尾一穂 国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究センター

角田和繁 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）

近藤峰生 三重大学大学院医学系研究科神経感覚医学講座眼科学

篠田 啓 帝京大学医学部眼科学教室

國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室

林 孝彰 東京慈恵会医科大学眼科学教室

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告

平成23年度 厚生省科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)  
総括研究報告書

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

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：ヒトは情報の約8割を視覚情報に頼っており、これが障害されると通常の生活に著しい影響を及ぼす。黄斑は網膜のほぼ中央に位置し、光を感じる視細胞が集中する視機能に最も重要な部位である。黄斑ジストロフィーはこの黄斑部が障害される難治性の眼疾患であり、日本には潜在的に約2万人の患者がいると考えられている。黄斑ジストロフィーは両眼性、進行性の機能障害を黄斑部にきたす疾患の総称であり、臨床診断にあたっては電気生理学的検査を含む機能検査を包括的に行う必要がある。現在黄斑ジストロフィーの治療法は無いが、将来の有効な治療法として、遺伝子治療が期待されている。また、再生医療や人工網膜などの研究も進行中であるが、治療できるレベルではない。特にスターガルト病は欧米では最も頻度の高い黄斑ジストロフィーであるが、原因遺伝子 ABCA4 の変異による臨床病態が極めて多彩で遺伝子検査なくして診断が難しくなっている。日本においてもスターガルト病の頻度は高いと思われながら現在そのジェノタイプングはほとんど行われておらず、疾患特有な病態は不明のままである。これまでに、錐体ジストロフィー、BEST 病等、他の黄斑ジストロフィーを含め、米国人を対象とした遺伝子解析によって優性型(11 遺伝子)、劣性型(2 遺伝子)、X 染色型(1 遺伝子)が解明されているが日本人患者での網羅的な解析は行われていない。これまでは遺伝子探索に大型家系の調査が行われ、マイクロサテライトマーカーによる連鎖解析法によって遺伝子座が絞り込まれ、この領域の数百の遺伝子をシーケンスする必要があった。しかし近年、次世代シーケンサーの登場によって、患者の全(エクソーム配列解析あるいは全ゲノム配列解析が可能になった。すでに眼科疾患において全エクソンを解読して、健常者と比較する方法によって遺伝子変異を発見した成功例が複数報告されている(Zuchner et al, Am J Hum Genet 2011)。我々は加齢黄斑変性の全ゲノム相関解析(Goto et al, JOBDI 2010)や黄斑ジストロフィーの一種であるオカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子 RP1L1 を発見した経験がある(Akahori et al, Am J Hum Genet 2010)。日本人眼科医(三宅養三)によって発見された眼疾患の原因解明を日本人研究者のみで成功した国内初めての例である。本研究は理化学研究所と国立遺伝学研究所との共同研究によって、黄斑疾患を含む10種類の遺伝性網膜疾患(レーバー先天性黒内障、網膜色素変性、黄斑ジストロフィー、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィー)を対象にエクソーム配列解析によって日本人患者における原因遺伝子を解明し、その発症機序と治療法を開発することを目的とする。

分担研究者：古野正朗・理化学研究所、池尾一穂・国立遺伝学研究所、三宅養三・愛知医科大学、角田和繁・国立病院機構東京医療センター、近藤峰生・三重大学、篠田啓・帝京大学、國吉一樹・近畿大学、林孝彰・東京慈恵会医科大学、吉村長久・京都大学

#### A. 研究目的

本研究はこれまで実現が困難であった、網羅的なエクソーム配列解析(Exome Sequence)を最新の次世代シーケンサーを利用して行い、

難病眼科疾患である黄斑ジストロフィーの日本人における原因を解明することを目的とする。

黄斑ジストロフィーは重篤な視力障害を引き起こす眼疾患である。米国においてはすでに原因遺伝子が複数解明され、我々も日本では初めて黄斑ジストロフィーの一種であるオカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子RP1L1の発見に日本で初めて成功した(Akahori et al, Am J Hum Genet 2010)。黄斑ジストロフィーの病態は個々に異なり、個々の患者に最適な治療を行うためには原因遺伝子の特定がきわめて重要となる。米国人患者とは異なり、日本人患者の多くについては未だ原因遺伝子が明らかにされていない状況が続いており、

本研究はこのような状況を改善するために行われるものである。

特にスターガルト病は若年発症であり、将来的な遺伝子治療の有力な候補と考えられている。現在国内ではスターガルト病やその他の黄斑ジストロフィーについて表現型と遺伝子型の相関がほとんど調べられておらず、これを網羅的に調べることは将来の遺伝子治療に向けての重要なステップとなる。日本人患者に関する遺伝情報は乏しく、網羅的な遺伝子変異の探索が求められている。種々の治療法が開発される中で、最適な方法を選別するためにも患者の発症原因遺伝子を診断する必要がある。

我々は5年前より網膜疾患の網羅的遺伝子診断システムを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）に構築し(<https://niso.kankakuki.go.jp/karte/Login.jsp>)、症例情報を国立病院機構や大学病院からオンライン（感覚器ネットワーク）で収集し、血液検体を受け取って遺伝子解析を行ってきた。現在日本ではこのような収集システムを稼働させていたのは国内で我々のみである。

本研究では多数の黄斑ジストロフィーの患者を診断してきた眼科医と国内最大規模の次世代シーケンスを運営する理化学研究所（横浜研究所）、さらに様々な遺伝子解析を専門とする国を代表する国立遺伝学研究所（生命情報・DDBJ研究センター）との共同研究によって、シーケンス費用を安価に抑え、高い成功率で難病の黄斑ジストロフィーの原因を解明できると期待される。

## B. 研究方法

（平成23年—24年）

### 1) 診断と血液検体の収集（三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林）

黄斑ジストロフィーの臨床診断にあたっては電気生理学的検査を含む機能検査を包括的に行う。参加施設はすでに倫理委員会の承認を得ており、患者の書面による同意を得て採血される。症例情報はすでに運営されている感覚器ネットワーク(<https://niso.kankakuki.go.jp/karte/Login.jsp>)を用いて暗号化された状態でオンラインによって東京医療センターに収集され、管理者のみがアクセスできる部屋とコンピュータに暗号化された状態で保存される。

### 2) エクソーム配列解析 (Exome Sequencing) (古野、岩田)

基本的には各家系において患者、患者の両親の3検体あるいは兄弟を加えた4検体のエクソ-

ーム配列解析で最低200家系解析を行う。検体からの全エクソンDNAの抽出は民間の会社（北海道システムサイエンス）に外注し、エクソンの塩基配列解読は国内最大規模の次世代シーケンサーを所有する理化学研究所横浜研究所 (<http://www.yokohama.riken.jp/>) において行う。各患者エクソンにおけるシーケンスは平均75リード（同エクソンを解読する回数）をめざす。

### 3) エクソーム配列のマッピングおよび配列の比較（池尾、岩田）

エクソン配列情報のテンプレート配列へのマッピングと患者—健常者間の比較は国立遺伝学研究所 (<http://www.nig.ac.jp/>) において行う。基本的にはアミノ酸配列の変化を対象に全エクソンを検索し、エクソンの欠損、挿入、反復によって報告されていないアミノ酸配列の変化が現れた場合にこれに着目する。候補として挙がってくる遺伝子変異について東京医療センターにおいて遺伝子についてのこれまでの報告や、患者や健常者での発生頻度をTaqmanアッセイなどによって確認し、疾患遺伝子変異を決定する。

（平成24—25年）

### 4) タンパク質の構造解析（岩田）

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、タンパク質の局在、分子モデリングによるタンパク質構造と変異による構造への影響を調べ、病態との関係を検討する。

### 5) 視細胞株および患者iPS細胞を用いた原因遺伝子の機能解析（岩田）

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、マウス視細胞株(661W, RGC5 cell line) および患者iPS細胞（リンパ球由来）から視細胞（錐体）を作製し(Jin, Iwata, Takahashi et al, PLoS One 2011)、変異体タンパク質の過剰発現、ノックダウンによる細胞機能への影響について解析する。

### 6) 発症機序の解明とモデル動物の作製と解析（岩田、三宅、近藤、篠田）

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、原因遺伝子をノックダウンしたゼブラフィッシュや遺伝子変異をノックインしたマウスを作製し、その病理学および視機能解析を行う。ここで作製されたモデル動物は将来の治療法の開発に利用される。

### 7) 日本人網膜色素変性の遺伝子変異と臨床情報のデータベース化、診断キットの開発（岩田、三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林）

本研究によって得られる新規遺伝子変異を将来の診断基準に役立てる目的で、個々の患者の遺伝子変異、眼底像、光干渉断層計像、網膜電図、視野検査等の情報をデータベース化して公開する。また診療の現場でも簡単に利用できる診断キットを民間会社と協力して作製する。

### 8) モデル動物を用いた新薬の開発 (三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林、岩田)

発症機序の研究結果によって得られた分子経路に基づいて、その経路を抑制あるいは促進する生体分子をモデル動物に投与することによって発症の予防・治療を試みる。特許取得後この分子を基本にして国内の民間会社による本格的な新薬開発を支援する。

## C. 研究結果

### 1) 診断と血液検体の収集 (三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林)

解析対象とする遺伝性網膜疾患を黄斑ジストロフィーを含む12疾患に拡大して、約150家系(約200検体)を収集した。この10疾患はレーバー先天性黒内障、網膜色素変性、黄斑ジストロフィー、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィーである。これらの遺伝子網膜疾患については日本人についての情報が乏しく、我が国の眼科診療についておいてきわめて重要と考えられる。これらの患者情報は電気生理学的検査を含む機能検査と網膜断層解析によって包括的に行われた。全参加施設において倫理委員会承認されており、血液検体は患者の書面による同意を得て採血された。また患者と親族の症例情報は東京医療センターで運営されている感覚器ネットワーク(<https://niso.kankakuki.go.jp/karte/Login.jsp>)を用いて暗号化(ベリサイン暗号化システム)された状態でオンラインアクセスによって収集され、管理者のみがアクセスできる部屋に暗号化された状態で保存される。

### 2) エクソーム配列解析 (Exome Sequencing) (古野、岩田)

平成23年度は200家系において代表患者1名についてエクソーム解析を行った。現在主流となっているエクソン抽出キット(Roche NimbleGen社のSeqCap、Illumina社のTruSeq、Agilent社のSureSelect)を6検体について行い、その比較を行った。その結果、SureSelectが最も効率的に高いカバー率でエクソンを抽出できることが明らかとなり、150検体についてエクソン抽出とIllumina社のHiSeq2000次世代シーケンサーを用いた塩基配列の解読を行った。各

検体についてはシーケンスのリード数を75以上と定め、より高いカバーレッジを得ることができた。

### 3) エクソーム配列のマッピングおよび配列の比較 (池尾、岩田)

エクソン配列情報のテンプレート配列へのマッピングと患者-健常者間の比較は国立遺伝学研究所と東京医療センターにおいて並行して行われた。dbSNPデータベースを用いてアミノ酸配列を変化させる遺伝子変異の検索中である。今回収集した遺伝性網膜疾患は劣性、優性に加え、一部孤発例も含まれている。それぞれの遺伝型式に準じて解析が行われている。

## D. 考察

エクソーム解析によって遺伝性網膜疾患の原因遺伝子を解明するには患者だけでなく健常者を含む家族構成員の情報とDNA検体が必要である。平成23年度は家系を単位とする家系図と症例情報を共同研究者の間で共有するために、東京医療センターにオンライン症例登録システム

(<https://niso.kankakuki.go.jp/karte/Login.jsp>)を構築し、2011年12月より運転を開始した。すでに8施設から約150家系の症例情報とDNA約200検体が収集され、エクソーム解析を行った。各家系の患者が既知遺伝子変異によって発症している可能性があるため、まずは各家系より代表の患者についてエクソーム解析を行い、公開されているレファレンス・ゲノム配列に対してマッピングを行い、dbSNPデータベースの遺伝子多型を除いて、優性遺伝についてはヘテロで、劣性遺伝についてはホモでアミノ酸置換を伴う遺伝子変異を抽出し、既知遺伝子変異が存在するか解析している。未知で遺伝子で確認された場合は平成24年度に残りの家族構成員の検体を収集し、エクソーム解析を行う予定である。

日本には遺伝子解析が進んでいない遺伝性網膜疾患が多数存在し、黄斑ジストロフィー以外の遺伝性網膜疾患も本事業の対象とすべきとの分担研究者からの意見にしたがって、対象疾患をレーバー先天性黒内障、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィーに拡大した。これらの疾患の遺伝子変異を明らかにすることによって日本人における遺伝性網膜疾患の診断や治療法



の開発に大きな前進が期待できる。平成24年度に期待される原因遺伝子解明によって、機能解析や動物モデルの開発が開始される予定である。また、東京医療センターでは各家族のiPS細胞の樹立をルーチンで行っており、各種網膜細胞への分化誘導によって、創薬の開発も期待される。

## E. 結論

黄斑ジストロフィーは網膜の中でも視機能を左右する最も重要な「黄斑」が障害される難治性眼疾患である。次世代シーケンサーを用いることによって、最少単位の家系DNA検体を集めることによって、全エクソンの塩基配列を明らかにし、健常者との比較によって効率良く遺伝子変異を発見し、迅速に診断が可能と期待される。

日本には遺伝子解析が進んでいない遺伝性網膜疾患が多数存在し、黄斑ジストロフィー以外の遺伝性網膜疾患も本事業の対象とすべきとの分担研究者からの意見にしたがって、対象疾患をレーバー先天性黒内障、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィーに拡大した。

各原因遺伝子の情報を疫学的な情報と組み合わせることによって、遺伝子別の発症頻度、遺伝子変異別の病態、患者数、患者の分布、患者の生活の質(QOL)、患者の介護の状況などがより正確に把握できることが期待される。また、原因遺伝子の機能解析、モデル動物の開発など、我々が緑内障や加齢黄斑変性などで養ってきた研究手法をそのまま利用することによって(Chi et al, Hum Mol Genet 2010)、発症機序の解明から新薬開発へと発展することが期待される。これらの情報はデータベース化して公開される予定である。さらに、遺伝子診断キットの開発やモデル動物を用いた新薬開発について、民間会社との共同開発も加速されると期待される。

本研究は次世代シーケンサーを用いた遺伝性網膜疾患の網羅的エクソーム解析によって、難病の遺伝子を特定し、発症機序および治療法の開発を目的とする、国内では初めての試みであり、すでに他の眼科疾患では成功例があることから大いに期待できる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

Shen X, Ying H, Qiu Y, Park J-S, Shyam R, Chi Z-L, Iwata T, Yue BYJT. Processing of optineurin in neuronal cells. J Biol Chem 2011;286:3618-29

Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y, Igarashi T, Akahori M, Kameya S, Iwata T, Mizota A, Yamaki K, Miyake Y, Takahashi H. A new mutation in the RP1L1 gene in a patient with occult macular dystrophy associated with a depolarizing pattern of focal macular electroretinograms. Mol Vis 2012;18:1031-9

Hara K, Akahori M, Tanito M, Kaidzu S, Ohira A, Iwata T. Analysis of LOXL1 gene variants in Japanese patients with branch retinal vein occlusion. Mol Vis 2011;17:3309-13

Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in a large family with mutation of RP1L1 gene. Retina 2012; Mar 29 epub

Fujinami K, Akahori M, Fukui M, Tsunoda K, Iwata T, Miyake Y. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. Acta Ophthalmol 2011;89(3):e297-8. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.01848.x

Jin ZB, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hirami Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. PLoS One 2011;6(2):e17084

書籍

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)

学会発表

第115回日本眼科学会 (東京、2011年5月) 小林宏明、岡本はる、池在龍、村上晶、岩田岳、黄斑変性カニクイザルにおける血漿プロテオーム解析

Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Okamoto H, Takada Y, and Iwata T. Dominant mutations in RP1L1 are responsible for occult macular dystrophy. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Chi Z, Katakai Y, Shimosawa N, Suzuki MT, Iwata T. Microarray analysis of RPE cells isolated from cynomolgus monkey with early-onset drusen formation. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Kobasyashi H, Okamoto H, Chi Z, Murakami A, Iwata T. Plasma proteome analysis on cynomolgus monkey pedigrees with early onset drusen formation. ARVO (Fort Lauderdale, USA, May 2011)

Iwata T, Chi Z, Yoshida T, Fujinami K, Miyake Y, Mizota A, Katakai Y, Suzuki MT, Shimosawa N, Yoshikawa Y, Lambris JD. Inhibition of drusen formation by Compstatin in cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. 5th International Complement Therapeutics Conference, Aegean Conferences (Rhodes, Greece, June 2011)

Iwata T, Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Fukuda Y, Ishiura H, Tsuji S, Usui T, Hatase T, Nakamura M, Ohde H. Dominant mutations in RP1L1 are responsible for occult macular dystrophy (Miyake's Disease). ASHG (Montreal, Canada, October 2011)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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. 分担研究報告

分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

「次世代シーケンサーを用いたエクソーム領域の塩基配列解析」

研究分担者 古野 正朗 理化学研究所 上級研究員

研究要旨：黄斑ジストロフィーおよび関連する眼疾患の原因となる遺伝子を見つけるため、東京医療センターを中心としたグループが臨床診断し患者より採取した検体について、理化学研究所において次世代シーケンサーによるエクソーム濃縮ライブラリーの塩基配列解析を実施、遺伝学研究所による原因遺伝子を解明するための変異探索解析に必要なデータを取得した。また、エクソーム濃縮およびライブラリー作製の効率的に行うための自動化システムを導入した。

A. 研究目的

ハイブリダイゼーション法による DNA 濃縮技術および次世代シーケンサーを用いた高速塩基配列技術を組み合わせることにより、全遺伝子のエクソン領域を対象とした網羅的な変異解析が効率的かつ低コストで行えるようになった。本研究では、黄斑ジストロフィーおよび関連する眼疾患について、東京医療センターを中心とする国立大学病院、関連病院が診断、採取した検体から、全遺伝子のエクソン領域の DNA を濃縮し、次世代シーケンサーによる高速解析を実施し、全エクソン領域についての原因遺伝子解析に必要な高品質かつ十分な量の塩基配列データを得ることを目的とする。

B. 研究方法

黄斑ジストロフィーおよび関連する眼疾患の家系の代表患者の採取された DNA 検体について断片化後、インデックス配列を含むアダプターを結合したライブラリーを調製、ヒトの全遺伝子をコードするゲノム領域の塩基配列をプローブとして、ハイブリダイゼーションにより同領域の濃縮を行った後、ライブラリーを混合する。混合したライブラリーをイルミナ社 HiSeq 2000 シーケンサーにより解析する。目的とする領域について 50 倍以上の重複率となるよう大量の塩基配列データを得る。インデックス配列を元に、それぞれの検体由来の塩基配列を分離する。得られた塩基配列データについて遺伝学研究所にて解析を行い、疾患の原因となる変異の候補を作成する。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に当たっては、理化学研究所の倫理委員会に申請し承認を得た。また、臨床診断および検体の採取を行う東京医療センターおよび関連病院についても倫理委員会の承認を得ており、倫理に対して十分な配慮の元に研究を行っている。

C. 研究結果

本年度は、黄斑ジストロフィーおよび関連する眼疾患の家系の代表患者の DNA 42 検体について、エクソームキャプチャーおよび次世代シーケンサーによる塩基配列解析を行った。エクソームキャプチャーおよびライブラリー作製については北海道システムサイエンスに委託した。約 3  $\mu$ g 分のゲノム DNA から、ヒト全エクソンコーディング領域を網羅的にカバーする SureSelect v4 kit (アジレント社)を用いて、プロトコールに基づきイルミナ社のシーケンサーに対応したシーケンスライブラリーを作製した。42 種類のライブラリーについて、6 検体分のライブラリーを等量ずつ混合し、合計 7 個の混合ライブラリーを調製した。作製したライブラリーについて、イルミナ社 HiSeq2000 シーケンサーにより塩基配列解析を行った。エクソン濃縮に用いた Agilent SureSelect v4 キットのターゲット領域の大きさは約 5.1 Mb であるため、目的とする領域につい

て50倍以上の重複率とするためには約2.5G塩基分のデータを得る必要がある。エクソン領域濃縮の効率およびゲノムへのマッピング効率を考慮して、対象とする領域の約100倍量の配列データが得られるよう、各々の混合ライブラリーにつき1レーンずつ、合計7レーン分の解析を実施した。各レーン12pMでシーケンス反応を行い、両端から100塩基ずつの配列データを得た。解読した配列は、平均84%以上の塩基においてQ30以上の品質を示した。CASAVA v1.8ソフトウェアによるベースコールおよびインデックス配列に基づき各検体由来の塩基配列の分離を実施した結果、1検体につき平均58Mリード数、平均5.8G塩基の配列を得た。今後、これらの塩基配列データを用いて遺伝学研究所において、疾患の原因を解明するための変異解析を行う。

東京医療センター岩田らのグループでは眼疾患に関する家系について多数の検体を収集している。これら多検体の解析に対応するため、理化学研究所においてエクソーム濃縮およびライブラリー作製の自動化システム（アジレント社）の導入を行った。また、エクソーム濃縮を行う市販のキット3種類（アジレント社、ロシュ社、イルミナ社）について比較検討するために同一サンプルからのライブラリー作製を行った。今後、自動化システムおよびエクソーム濃縮キットを用いて作製されたライブラリーについての塩基配列解析を行い、変異解析に必要なデータ量や品質の確認を行う。

#### E. 結論

本年度の研究においては、黄斑ジストロフィー

および関連する眼疾患の患者より採取した42検体について、全遺伝子のエクソーム領域を対象とした塩基配列のデータを得ることができた。今後、研究分担者の池田ら（国立遺伝学研究所）のグループにおいて、エクソン配列情報のテンプレート配列へのマッピングと患者・健常者間の比較解析を行い、原因となる遺伝子変異の候補を解析する予定である。エクソーム濃縮およびライブラリー作製の自動化を導入したことにより、今後、多数の検体について効率的かつ低コストでの解析を行うことが可能となる。

#### 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  
該当なし

2. 学会発表  
該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

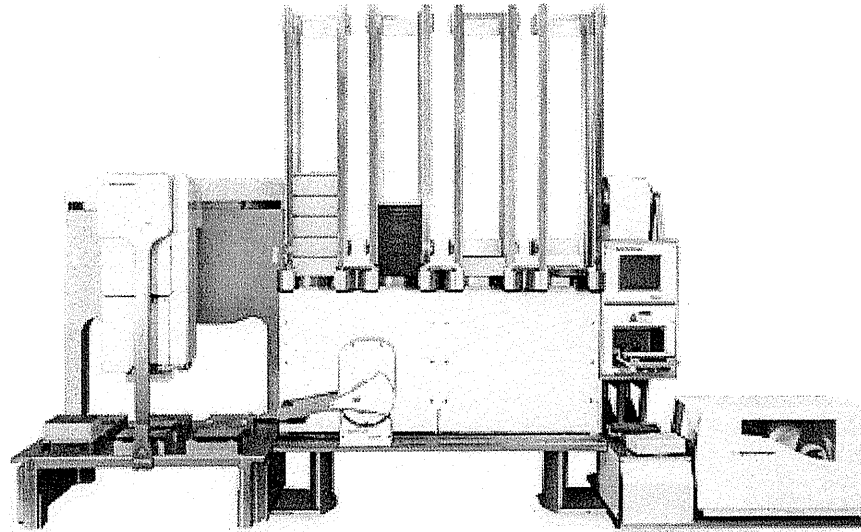
1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

# Agilent Bravo System

- ライブラリー作製のための自動化システムを導入した。
- SureSelect Exome library 作製に対応。
- 96検体を数日で処理可能。



分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

研究分担者 池尾 一穂 国立遺伝学研究所/生命情報・DDBJ 研究センター 准教授

研究要旨： リファレンス配列へのマッピング後、アミノ酸配列の変化を対象に全エクソンを検索し、エクソンの欠損、挿入、反復候補として遺伝子変異を決定する。

**A. 研究目的**

エクソン配列情報のテンプレート配列へのマッピングと患者-健常者間の比較を行う。基本的にはアミノ酸配列を変化させる変異を対象に全エクソンを検索し、エクソンの欠損、挿入、反復によって報告されていないアミノ酸配列の変化が現れた場合にこれに着目する。候補として挙がってくる遺伝子変異について、東京医療センターにおいて、遺伝子についてのこれまでの報告や、患者や健常者での発生頻度をTaqmanアッセイなどによって確認し、疾患遺伝子変異を決定する。

**B. 研究方法**

健常サンプルと罹患サンプルのExomeシーケンズデータを参照ゲノム配列にmappingし、その結果の比較から、網羅的に遺伝子変異を抽出した後、アミノ酸配列に影響を与えないものや、既知の変異を除外し、候補変異を絞り込む。更に、得られた候補を統計的、遺伝学的手法を用いて絞り込む事により候補変異を決定する。

**C. 研究結果**

本年度は、次世代シーケンサーによる大規模 Exome もしくはゲノムデータに対応できる変異抽出の為の方法の開発と評価を中心に行った。評価としては、ヒトサンプルの前にカニクイザルのデータを用いて評価を行った。その結果、1 個体あたり、約 3000 万リード、6 Gbase の配列が得られた。全長の 95%以上の配列が読まれた Exon の割合は、86~87%であった。

また、正常 5、罹患 7 の合計 12 個体を併せた場合、9,557,690 個所に変異が見られ、罹患個体のみが有している変異は 947,875 個所であり、罹

患した 7 個体全てで共通に保持している変異は 316 個所であった。さらにその中で、アミノ酸に置換が生じたもののみを抽出すると、合計 31 個の変異が抽出された。

**D. 考察**

本研究で絞り込まれた 31 個の変異は、15 個が第 7 染色体の 0-30 Mbase 付近に集中しており、本研究からは、この領域に疾患の原因となる変異が存在する確率が高いと考えられる。しかし、この領域は過去に連鎖解析で絞り込まれた領域とは異なっていた。連鎖解析では、診断時のエラーなどを盛り込んだ解析手法が確立しているが、Exome 解析はまだ歴史が浅く、今後サンプル数を増やした際に、変異抽出のエラー、診断時のエラーなどを考慮した、よりロバスト性の高い解析手法の確立が求められる。

**E. 結論**

本年度の取り組みの結果、次世代型大規模配列データを用いた疾患関連遺伝子探索の為の方法論の基礎が構築できた。今後、より簡便かつ精度の高い方法に改良していくとともに、東京医療センターと協力して本来の目的であるヒト疾患遺伝子の解明を進める。

**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

1) Kryukov K, Sumiyama K, Ikeo K, Gojobori T, Saitou N. A New Database (GCD) on Genome

Composition for Eukaryote and Prokaryote Genome Sequences and Their Initial Analyses.

Genome Biol Evol. 2012 Jan;4(4):501-12.

2. 学会発表

1) K. Ikeo "Genome wide data analysis by using NGS", Next Generation Sequencing Asia Congress, Singapore, 2011年10月4日

2) 池尾 一穂「次世代シーケンサーがもたらす大量データの世界」、日本人類遺伝学会第56回大会 超高速シーケンサー情報算出とバイオインフォーマティクス、幕張メッセ(千葉) 2011年11月10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

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

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

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。

本発明は、次世代シーケンサーを用いた大量のシーケンシングデータの解析方法に関する。本発明は、シーケンシングデータの解析に用いられるソフトウェアプログラム、ハードウェア装置、およびシステムに関する。



分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いたエクソーム配列解析による  
黄斑ジストロフィーの原因遺伝子と発症機序の解明

研究分担者 角田和繁 東京医療センター臨床研究センター視覚生理学研究室 室長

**研究要旨：**本研究において当研究室では、DNA解析に必要な患者の臨床診断を行い、表現系を明確するという作業を各種の遺伝性網膜疾患について行った。

対象は、オカルト黄斑ジストロフィー、スターガルト病、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性、コロイデレミア、BEST病、その他先天性停止性夜盲等、多岐にわたる。これらの症例のなかには、典型的な表現系を示すものから、これまでに報告のない特殊な表現系を持つものも含まれていた。

これらの患者から、視力、視野等の自覚的検査、および、蛍光眼底造影、網膜電図、網膜自発蛍光、光断層干渉計等の他覚的検査を行い、合わせて家族歴を詳細に調査した。

健常者の家族を含めて、合計60検体の採血を行い、このうち初年度には20検体が次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を施行されることとなった。

**A. 研究目的**

網膜ジストロフィーのなかにはいまだに臨床病態および病理学的・分子遺伝学的な原因が明らかにされていないものもあり、また、臨床的に診断名の確定している症例のなかにも、原因となる遺伝子系が確定できない症例が多い。

我々は、これらの疾患の表現型—遺伝子型の関連を明確にする目的で、エクソーム解析に必要な患者の臨床診断を行い、表現系を明確するという作業を行った。

**B. 研究方法**

当院眼科外来を受診した、オカルト黄斑ジストロフィー、スターガルト病、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性、コロイデレミア、BEST病、Usher症候群、KCNV2網膜症、先天性停止性夜盲、その他分類不能の黄斑ジストロフィーを対象とした。

各症例の発症の経過を詳しく調べる他に、健常者を含めた定期的な眼科ルーチン検査（視力、視野検査等）、電気生理学的検査（全視野網膜電図、局所網膜電図）、画像診断（蛍光眼底造影、光干渉断層計）などを行い、眼科検査の面から疾患の完全な病態把握を行った。

インフォームドコンセントの元に、患者およびその健常家族から全血採血を行い、東京医療センター分子細胞生物学研究部に検体を提出した。

**C. 研究結果**

罹患者およびその家族を含めて、オカルト黄斑ジストロフィー23例、スターガルト病5例、錐体杆体ジストロフィー12例、網膜色素変性10例、コロイデレミア1例、BEST病1例、Usher症候群2例、KCNV2網膜症6例、先天性停止性夜盲1例、その他分類不能の黄斑ジストロフィー2例について臨床的に診断し、採血を行った。

**E. 結論**

多数のジストロフィー患者について臨床検査を行い、DNA採血を行った。この中には優性遺伝および劣性遺伝家系が含まれており、今後のDNA解析およびさらなる家系調査により、新規の原因遺伝子が発見される可能性がある。

**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

1) Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Miyake Y. Fundus Autofluorescence in Autosomal Dominant Occult Macular Dystrophy. Arch Ophthalmol. 129(5): 579-602, 2011

2) Tsunoda K, Fujinami K, Miyake Y. Selective

abnormality of the cone outer segment tip line in acute zonal occult outer retinopathy as observed by Fourier domain optical coherence tomography. Arch Ophthalmol. 129(8): 1099-1101, 2011

3) Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura M, Oguchi Y, Miyake Y. Oguchi's Disease with Unusual Findings Associated with a Heterozygous Mutation in SAG Gene. Arch Ophthalmol. 129(10): 1375-1376, 2011

4) Chai Y, Yamazaki H, Fujinami K, Tsunoda K, Yamamoto S. Case of acute zonal occult outer retinopathy with abnormal pattern visual evoked potentials. Clin Ophthalmol. 5: 1235-1241, 2011

5) Tsunoda K, Watanabe K, Akiyama K, Usui T and Noda T. Highly reflective foveal region in optical coherence tomography in eyes with vitreomacular traction or epiretinal membrane. Ophthalmology. 119(3): March 2012, 581-587

6) Tsunoda K, Usui T, Hatase T, Yamai S, Fujinami K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Akahori M, Iwata T, and Miyake Y. Clinical characteristics of occult macular dystrophy in family with mutation of RP1L1 gene. Retina. 2012 Mar 29. Epub

## 2. 学会発表

1) Tsunoda K, Hatase T, Usui T, Fujinami K, Miyake Y. Optical Coherent Tomography (OCT) Findings In Occult Macular Dystrophy (OMD) With RP1L1 Mutation. ARVO annual meeting 2011. Fort Lauderdale, Florida. 2011.5.2

2) Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Tsuji S, Usui T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Iwata T. Dominant Mutations In RP1L1 Are Responsible For Occult Macular Dystrophy. ARVO annual meeting 2011. Fort Lauderdale, Florida. 2011.5.5

3) Shinoda K, Ozeki N, Ohde H, Matsumoto CS, Inoue M, Tsunoda K, Inomata K, Kimura I, Mizota A. Transcorneal electrical stimulation on eyes with no light perception. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 49th Symposium. Quebec City, Canada. 2011.9.19

4) Tsunoda K, Suzuki W, Hanazono G, Tanifuji M. Invited Lecture 「Photoreceptor Activities Detected by Functional Optical Coherence Tomography (fOCT) in

the Macaque Retina」. The First Asia and Pacific Rim Symposium on Optical Coherence Tomography. Taipei, Taiwan. 2011.11.12

5) Tsunoda K. Symposium 「Genetics and retinal dystrophy」 「RP1L1 gene mutations in Occult Macular Dystrophy (Miyake's Disease)」. The 2nd JSCEV-KSCEV Joint Meeting, Seoul, South Korea. 2011. 11.19

6) 赤堀正和, 角田和繁, 三宅養三, 福田陽子, 石浦浩之, 辻省次, 白井知聡, 畑瀬哲尚, 中村誠, 大出尚郎, 板橋剛, 岡本はる, 岩田岳. オカルト黄斑ジストロフィー (Occult Macular Dystrophy) の原因遺伝子解明. 第 115 回日本眼科学会総会. 東京. 2011.5.13

7) 角田和繁. シンポジウム「OCT は既存の検査機器を超えたか?」「OCT vs 網膜電図 (OCT による黄斑ジストロフィーの診断)」. 第 47 回日本眼光学学会総会. 東京. 2011.9.4

8) 中村奈津子, 角田和繁, 田中宏樹, 福島梨紗, 窪野裕久, 藤波芳, 篠田啓, 富田香, 三宅養三. 杆体反応の増強をとまなう錐体ジストロフィー姉弟例の OCT 所見. 第 65 回日本臨床眼科学会. 東京. 2011.10.7

9) 渡辺健, 角田和繁, 秋山邦彦, 白井知聡, 野田徹. 中心窩網膜牽引において光干渉断層計(OCT)で観察される視細胞層の円形高輝度領域. 第 65 回日本臨床眼科学会. 東京. 2011.10.9

10) 角田和繁. オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) -最新の知見-. 第 15 回近畿眼科先進医療研究会. 大阪. 2011.6.10

11) 角田和繁. オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) -最新の知見-. 第 9 回信濃町網膜研究会. 東京. 2011.7.1

## 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

平成23年度 厚生科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)  
分担研究報告書

遺伝性網膜変性疾患における錐体機能評価のための  
視細胞変性モデルにおける錐体 ERG の a 波の起源に関する研究

研究分担者 近藤 峰生 三重大学大学院医学系研究科神経感覚医学講座眼科学

研究要旨：遺伝性網膜変性疾患の錐体機能を他覚的に研究するには、錐体 ERG の a 波を解析することが必要になる。これまでに、サルを用いた実験において、錐体 ERG の a 波の中には錐体視細胞以外に OFF 型双極細胞由来の成分が含まれていると報告されている (Bush & Sieving, 1994; Robson et al. 2004)。しかしながら、これらの結果は全て正常なサルにおける結果であり、視細胞が徐々に変性していくジストロフィーの網膜において錐体 ERG の a 波中にどの程度錐体視細胞の関与があるのかは知られていない。これは、オカルト黄斑ジストロフィーの黄斑部局所 ERG を解析する際に重要な問題である。そこで今回我々は、ロドプシン P347L トランスジェニック (Tg) ウサギにシナプス遮断薬を作用させて、視細胞変性モデルの網膜における錐体 ERG の a 波の起源を研究した。その結果、錐体 ERG の a 波に占める視細胞成分の割合は、生後 4 か月の野生型では 50-70%あるのに対し、Tg ウサギでは 30-50%しかなかった。今回の結果から網膜ジストロフィーの錐体 ERG a 波の解釈には十分な注意が必要であると考えられた。

A. 研究目的

遺伝性網膜変性疾患における錐体機能を他覚的に研究するには、網膜全体を刺激して得られた錐体 ERG の a 波を解析することが必要になる。これまでの霊長類を用いた研究によって、錐体 ERG の a 波の中には錐体視細胞以外に OFF 型双極細胞由来の成分が含まれていることが報告されている (Bush & Sieving 1994; Robson et al. 2004)。しかしながら、視細胞が徐々に変性していく、いわゆるジストロフィーの網膜において、両者の関与がどのように変化するかは知られていない。そこで今回我々は、我々が作製した網膜変性ウサギであるロドプシン P347L トランスジェニック (Tg) ウサギを用いてこれを研究した。

B. 研究方法

4-5 か月齢の野生型と Tg の白色家兎合計 20 匹を対象とした。家兎の硝子体内に CNQX、続いて APB を注入することによって、OFF 型双極細胞と ON 型双極細胞の活動をそれぞれ遮断し、その後で錐体 ERG の a 波の振幅を計測した。

ERG は、10 分間の明順応後に Ganzfeld ドーム内で全視野刺激で記録を行った。最強刺激を  $2.2 \log \text{cd-s/m}^2$  として、neutral density filter で 0.5 log 単位で刺激を変化させて ERG を記録した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。動物実験においては ARVO の動物実験規約に基づいて動物の苦痛が最小限と

なるように気をつけた。

C. 研究結果

図 1 に、生後 4 か月と 1 年の正常ウサギ (WT) と Tg ウサギから記録した錐体 ERG の代表波形を示す。WT と比較すると、Tg では錐体 ERG の a 波振幅は明らかに小さく、また 1 年ではさらに小さくなった。これは、Tg ウサギがロドプシン遺伝子に異常を有していることにより、視細胞が進行性に変性していることによると考えられた。

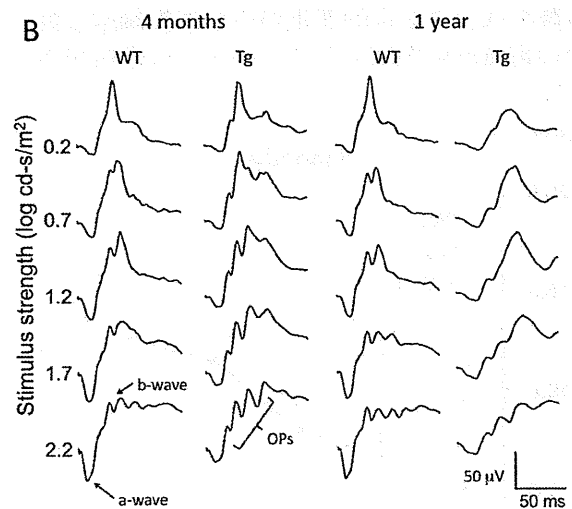


図 1. 生後 4 か月と 1 年の正常ウサギ (WT) と Tg ウサギから記録した錐体 ERG の代表波形

次に、WT と Tg における a 波の振幅に占める視細胞成分の割合 (%) を図 2 にプロットした。WT では、錐体 ERG の a 波に占める錐体視細胞成分の

割合は 50-70%程度であったが、Tg ウサギではこれが 30-50%と低くなっていることがわかった。WTとTgにおけるこの%の違いは統計学的に有意であった。

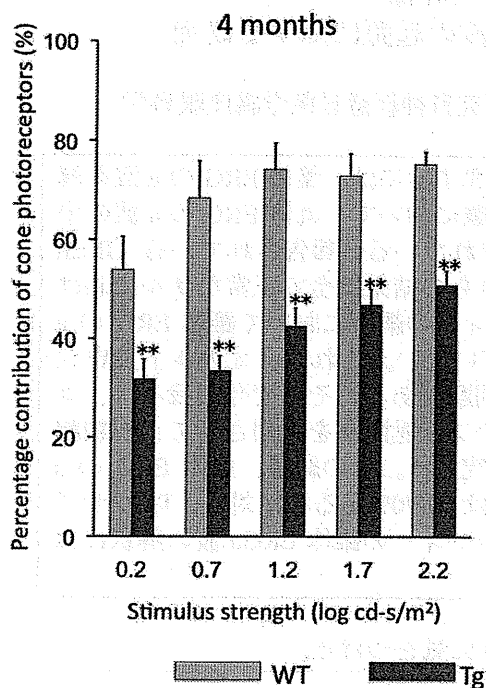


図 2. 野生型 (WT) と RP ウサギ (Tg) の錐体 ERG a 波に占める錐体視細胞成分の割合

これまでの結果により、Tg では a 波に含まれる視細胞以降の成分の割合が高くなっていることがわかったが、この理由として、(1) 錐体視細胞が変性しているにもかかわらず網膜内層の細胞は保たれている、(2) 視細胞の変性に伴って視細胞以降の成分に 2 次的変化が生じて視細胞以降の成分の電気反応が増大した、の 2 つの理由が考えられた。

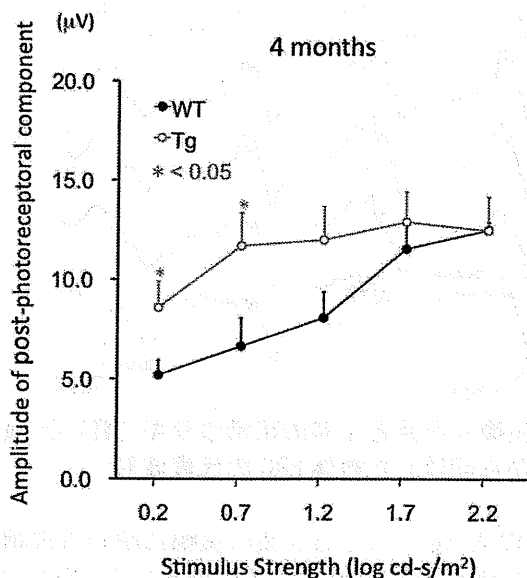


図 3. 野生型 (WT) と RP ウサギ (Tg) 視細胞以降の成分の振幅の絶対値をプロットした

このうち 2 つめの可能性がないかを検討する目的で、視細胞以降の成分の振幅の絶対値をプロットした (図 3)。その結果、特に弱い光刺激に対しては、WT よりも Tg の方が視細胞以降の成分の振幅が大きくなっていることがわかった。以上の結果により、(1)と(2)の両方の理由により、Tg ウサギの錐体 ERG の a 波では視細胞以降の成分の割合が増えていることがわかった。

#### D. 考察

正常サルを用いたこれまでの研究では、強い光刺激を用いれば、錐体 ERG の a 波に占める錐体視細胞成分の割合は 70-80%に達すると考えられていた。しかし、今回の結果から RP モデルウサギでは最強の刺激を用いても、錐体 ERG の a 波に占める錐体視細胞成分の割合は 50%以下であることがわかった。さらに、刺激の強さが中等度であると、錐体 ERG の a 波に占める視細胞の割合は 30%であり、70%近くは視細胞以降の成分であることがわかった。これにより、錐体視細胞が徐々に変性する疾患では、錐体 ERG の a 波の解釈に注意が必要であることがわかった。つまり、黄斑部局所 ERG の a 波振幅がわずかに認められたとしても、その大部分は視細胞以降の成分 (OFF 型双極細胞あるいは水平細胞) であって、視細胞機能が十分に保たれていることを示していないということになる。

#### E. 結論

視細胞が徐々に変性していく網膜 (例えば網膜色素変性) においては、錐体 ERG の a 波は錐体視細胞よりも OFF 型双極細胞の関与が大きくなる。これまで錐体 ERG の a 波を残存錐体視細胞の機能評価として使ってきた研究では、結果が過大評価されていた可能性がある。

#### 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

- 1) Terui T, Kondo M, et al. Changes in areas of capillary nonperfusion after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with branch retinal vein occlusion. *Retina*. 2011;31:1068-1074.
- 2) Yasuda S, Kondo M, et al. Rebound of macular edema after intravitreal bevacizumab therapy in eyes with macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Retina*. 2011;31:1075-1082.