

201224047A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業
(感覚器障害分野)

日本人常染色体劣性網膜色素変性症の
遺伝子診断法に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤誠志
平成25年(2013年)3月

目次

I. 総括研究報告	
日本人常染色体劣性網膜色素変性症の遺伝子診断法に関する研究 -----	1
加藤誠志	
II. 分担研究報告	
1. <i>EYS</i> 遺伝子診断におけるスクリーニング法に関する研究 -----	5
岩波将輝	
2. 変異 <i>EYS</i> を発現している変性視細胞モデルの作出に関する研究 -----	11
世古裕子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	
V. 参考資料	

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業 感覚器障害分野）
総括研究報告書

日本人常染色体劣性網膜色素変性症の遺伝子診断法に関する研究

研究代表者 加藤誠志

国立障害者リハビリテーションセンター研究所 研究所長

研究要旨

本研究の目的は、我々が最近明らかにした日本人の常染色体劣性網膜色素変性症（arRP）の主要原因遺伝子である *EYS* について、遺伝子診断法を確立し、予後予測や治療法の手がかりを得ることである。当センター病院眼科を受診した RP 患者 200 名並びに京都大学病院眼科から提供された arRP 患者 209 名のゲノム DNA を用いて、一次スクリーニングとして日本人に特異的な 3 つの創始者変異を調べたところ、うち 3 割において陽性の結果が得られ（感度 30%、特異度 98.5%）、*EYS* 遺伝子診断法における本法の有効性が示された。また、網膜色素変性症患者の体細胞を視細胞に分化誘導し、変性視細胞モデルを作出することを目的として、市販のヒト皮膚繊維芽細胞の直接リプログラミングによる網膜細胞への分化誘導法を検討した結果、視細胞特異的な *EYS* 遺伝子の発現を誘導することに成功した。

研究分担者

岩波将輝 国立障害者リハビリテーションセンター病院 眼科医師
世古裕子 国立障害者リハビリテーションセンター研究所 視覚機能障害研究室長

研究協力者

仲泊 聡 国立障害者リハビリテーションセンター病院 第二診療部部长
西田朋美 国立障害者リハビリテーションセンター病院 眼科医長
青井則之 国立障害者リハビリテーションセンター病院 非常勤医師
吉村長久 京都大学医学部医学研究科眼科学教授
大石明生 京都大学医学部医学研究科眼科学助教
荻野 颯 京都大学医学部医学研究科眼科学助教

A. 研究目的

国立障害者リハビリテーションセンター（国リハ）の病院と自立支援局を訪れる視覚障害者の約 1/3 が網膜色素変性症（RP）に罹患している。日本全国では約 3~4 万人の RP 患者がいると推定されている。RP は、夜盲に始まり、徐々に視野狭窄、視力低下が起こる進行性の遺伝子疾患であり、現在有効な治療法はない。中途失明により就労が困難となるケースが多く、RP 患者の社会生活を支援するためにも、予後の予測法や抜本的治療法が望まれている。

我々は、最近、国リハ病院眼科に来院した 68 名の RP 患者について *EYS* (染色体 6q12 に位置し、2Mb の領域に 43 個のエクソンが存在する) の変異探索を実施した結果、常染色体劣性網膜色素変性症（arRP）の 1/3 において日本人特有の変異を見いだした。また、独自の完全長 cDNA 合成技術を開発し、ヒト網膜細胞由来の 16 万個の完全長 cDNA クローンを取得した。さらに、ヒト虹彩細胞に複数の転写因子を導入し視細胞様細胞へ分化誘導することに成功した。これらの独自技術と材料を用いて、*EYS* 変異に起因する arRP の診断法を確立するための研究を計画した。

本研究の目的は、我々が最近明らかにした日本人の arRP の主要原因遺伝子である *EYS* について、遺伝子診断法を確立し、予後予測や治療法の手がかりを得ることである。

B. 研究方法

B-1 *EYS* 遺伝子の変異スクリーニング

B-1-1 RP 患者のゲノム DNA サンプル収集

当センター病院眼科を受診した RP 患者から網膜の臨床像と血液を収集し、血液から白血球ゲノム DNA を抽出した。また、京都大学病院眼科から、関西圏の arRP 患者のゲノム DNA の提供を受けた。

B-1-2 *EYS* 遺伝子の変異解析

日本人にのみ見いだされた 3 種類の創始者変異（*EYS*-JM1, *EYS*-JM2, *EYS*-JM3）について、各変異を含むエクソンを PCR 法により増幅後、直接塩基配列を決定した。片方のアレルにのみ創始者変異を有する場合は、全エクソンの塩基配列を決定した。もし、もう一方のアレルに変異が見つ

らない場合には、MLPA 法による欠失・重複変異解析を行った。

B-1-3 EYS 遺伝子の遺伝型-表現型関連解析

EYS 遺伝子変異が同定された患者について夜盲の自覚年齢、診断時年齢、視力、視野などの臨床所見に基づいた解析を行った。また、EYS-JM3 変異をもつ患者家系において、変異と表現型についての分離解析を行った。

B-2 ヒト皮膚繊維芽細胞の直接リプログラミング

分担研究者が開発したヒト虹彩細胞を視細胞に分化誘導する方法 (Seko et al., PLoS ONE, 2012) を応用し、より一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚細胞を視細胞に分化誘導する方法を検討した。

C. 研究結果と考察

C-1 EYS 遺伝子の変異スクリーニング

C-1-1 RP 患者のゲノム DNA サンプル収集

当センター病院眼科を受診した RP 患者 132 名から新たに血液の提供を受け、以前収集した 68 名分と合わせ、合計 200 名分のゲノム DNA を収集できた。200 名の家系解析の結果、7 名が常染色体優性、arRP は孤発例を含め 193 名という内訳であった。また京都大学病院眼科を受診した arRP 患者 209 名分のゲノム DNA の提供を受けた。

C-1-2 EYS 遺伝子の変異解析

当施設 RP 患者 200 名、健常者 168 名における EYS-JM1~JM3 の各変異の解析を行った結果、EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3 は、それぞれ RP 患者 37 名、14 名、27 名から同定された。各変異のアレル頻度は、それぞれ 11.5%、4.0%、7.7%であった。EYS-JM3 変異のみ、健常者より 0.9%の割合で同定された。EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3 の各変異は合わせて 60 名の RP 患者より同定され、その出現率は 30.0% (60/200) であった。以上から、本スクリーニング法の感度は 30.0% (60/200)、特異度は 98.2% (165/168) であった。

また、これら EYS 遺伝子変異を同定された 60 名の RP 患者のうち、両側アレルからの変異の検出された患者は 35 名 (58.3%) であり、これらについては arRP の原因診断が可能と考えられた。残る 25 名 (41.7%) については片側アレルからの変異の検出であった。

同様の解析を京都大学の arRP 患者 209 名 (西日本地域) について行ったところ、EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3 は、それぞれ RP 患者 37 名、14 名、27 名から同定された。各変異のアレル頻度は、それぞれ 8.1%、3.6%、6.4%であった。本スクリーニング法の感度は 29.1% (61/209) であった。

また、これら EYS 遺伝子変異を同定された 61 名の患者のうち、両側アレルからの変異の検出された患者は 15 名 (24.6%)、片側アレルからの患者は 46 名 (75.4%) であった。

片側のアレルにのみ変異が見つかった患者について、全エクソンの塩基配列並びに MLPA 法による欠失・重複変異解析を実施し、現在データを解析中である。

C-1-3 EYS 遺伝子の遺伝型-表現型関連解析

EYS 遺伝子変異が同定された 23 名 (平均年齢 52.0 歳、経過観察期間平均 7.3 年) について臨床所見に基づいた解析を行った結果、夜盲の自覚が 20 歳代に最も多く、診断時年齢は平均 39.0 歳と中年期に進行を認める典型的な遅発型 RP であることが示唆された。遺伝型-表現型における解析では、短縮型変異をホモまたは複合ヘテロ接合で 2 つ有する個体群と、短縮型変異を 1 つ有し他方にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異を複合ヘテロ接合でもつ個体群の比較において、前者で重症化する傾向が確認された。

EYS-JM3 変異をもつ患者家系 10 家系において変異と表現型についての分離解析を行った結果、いずれの家系においても、EYS-JM3 変異と RP 表現型は矛盾なく RP 患者のみに分離されることから、EYS-JM3 変異は arRP としての病原性をもつことが示唆された。

C-2 ヒト皮膚繊維芽細胞の直接リプログラミング

市販のヒト皮膚繊維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによる網膜細胞への分化誘導法を検討した結果、視細胞特異的な EYS 遺伝子の発現を誘導することに成功した。一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚細胞に複数の転写因子遺伝子を導入すると視細胞特異的な EYS 遺伝子の発現が早期に誘導されることは、我々が初めて見つけた新知見であり、低コストの迅速診断法の開発に貢献できる可能性がある。

また、3 名の正常ボランティアの皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結を実施した。皮膚採取にあたり、事前の準備、実際的な手技、皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結の全過程に問題がないことを確認し、次年度の患者由来細胞採取へ向けて十分な準備を整えた。

D. 結論

日本人に特異な 3 つの創始者変異を調べることで、RP 患者 200 名うち 3 割において陽性の結果を得た (感度 30%、特異度 98.5%)。これら陽性患者のうち、約 6 割については両側アレルからの

変異検出となり、診断が可能であった。残る4割の片側アレルでの検出にとどまる患者について、つづいての全エクソンの検索が必要であった。以上の結果から、EYS 遺伝子診断法における3種類ノ創始者変異検出を行う一次スクリーニングの有効性が示された。

京都大学眼科の協力を得て、東日本の arRP 患者 193 名、西日本の arRP 患者 209 名を対象に EYS 遺伝子診断のスクリーニング法による解析を行った結果から、両者の遺伝疫学における相違を示唆する結果が得られた。

市販のヒト皮膚繊維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによる網膜細胞への分化誘導法を検討した結果、視細胞特異的な EYS 遺伝子の発現を誘導することに成功した。さらに、倫理審査委員会の承認を得て、正常ボランティアの皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結を実施した。皮膚採取にあたり、事前の準備、実際的な手技、皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結の全過程に問題がないことを確認し、次年度の患者由来細胞採取へ向けに十分な準備を整えた。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岩波将輝, 西田朋美, 三輪まり枝, 山田明子, 西脇友紀, 小松真由美, 世古裕子, 加藤誠志, 仲泊聡. 日本人網膜色素変性症における EYS 遺伝子変異とその臨床像. 臨床眼科 67 (3), 2013, p. 275-279.

2. 学会発表

- 1) 岩波将輝, 西田朋美, 中嶋明子, 世古裕子, 仲泊聡, 加藤誠志. 日本人網膜色素変性症の EYS 遺伝子診断. 第 117 回日本眼科学会総会. 東京国際フォーラム, 東京, 2013-4-4/4-7.
- 2) 岩波将輝. EYS 遺伝子変異における遺伝子型表現型関連の検討. 第 17 回眼科分子生物学研究会. 焼津松風閣, 静岡, 2013-2-23.
- 3) 岩波将輝. 日本人網膜色素変性症における EYS 遺伝子変異とその臨床像. 第 5 回網膜・リサーチ・ミーティング (RRM). 国立病院機構東京医療センター, 東京, 2012-12-8.
- 4) 岩波将輝. 網膜色素変性症における遺伝子診断とその展望. 第 57 回日本人類遺伝学会総会. 京王プラザホテル, 東京, 2012-10-24/10-27.
- 5) 岩波将輝, 西田朋美, 三輪まり枝, 山田明子, 西脇友紀, 小松真由美, 世古裕子, 加藤誠志, 仲泊聡. 日本人網膜色素変性症における EYS

遺伝子変異とその臨床像. 第 66 回日本臨床眼科学会総会. 京都国際会館・グランドプリンスホテル京都, 京都, 2012-10-25/10-28.

II. 分担研究報告

EYS 遺伝子診断におけるスクリーニング法に関する研究

分担研究者 岩波将輝 国立障害者リハビリテーションセンター病院
第二診療部 眼科医師

研究要旨

[背景] *Eyes shut homolog* (以下, *EYS*) 遺伝子は、2008年に常染色体劣性 (以下, ar) の網膜色素変性症 (以下, RP) の原因遺伝子として同定された。我々は先行研究より日本人 arRP の約30%を占めることを報告した (Iwanami et al. IOVS, 2012)。海外に比べて日本人における頻度が高い理由として、複数家系における各変異の近傍遺伝子座に対するハプロタイプ解析より、日本人に特異な3つの創始者変異、①c.4957dupA, p.S1653Kfs*2 (以下, *EYS*-JM1)、②c.8805C>A, p.Y2935* (以下, *EYS*-JM2)、そして③c.2528G>A, p.G843E (以下, *EYS*-JM3) の存在を同定した。[目的] 本研究では、これらの高頻度に検出される3つの *EYS* 遺伝子変異に着目し、これら変異の検出を用いた一次スクリーニング法の有用性について検討を行った。[対象] 対象は当施設 arRP 患者193名 (東日本)、京都大学 arRP 患者209名 (西日本) であり、*EYS*-JM1、*EYS*-JM2、そして *EYS*-JM3 におけるそれぞれのエクソン26、エクソン43、エクソン16とそのエクソンイントロン部を含む領域の直接的塩基配列決定をサンガー法で行った。そして、これら変異の遺伝疫学について東日本と西日本における比較検討を行った。[結果と考察] ① 当施設 RP 患者193名のうち3割において陽性の結果を得た (感度30%、特異度98.5%)。これら陽性患者のうち、約6割については両側アレルからの変異検出となり、診断が可能であった。残る4割の片側アレルでの検出にとどまる患者について、つづいての全エクソン検索が必要とされた。② 東日本と西日本における遺伝疫学の比較において、アレル頻度に着目した場合、*EYS*-JM1 変異については、東日本に多く、西日本において少ない傾向が観察された。*EYS*-JM2 変異、*EYS*-JM3 変異については、大きなアレル頻度の差は観察されなかった。しかしながら、両側アレルからの変異検出頻度の割合について比較をすると、東日本では58.3%であるのに対して、西日本では24.6%と、*EYS*-JM1、*EYS*-JM2 および *EYS*-JM3 の構成内容には大きな違いが観察された。これらデータより西日本における *EYS* 遺伝子変異型の構成は、東日本の内容とは一部で異なる可能性が示唆された。[結論] *EYS* 遺伝子診断法における一次スクリーニング法の有効性が示されたと同時に、東日本と西日本地域での遺伝疫学における構成の異質性が示唆された。今後、この一次スクリーニング法の活用と *EYS* 遺伝子変異の診断率の向上を目的とする効率的な解析プロトコルの作成が必要と考えられた。

A. 研究目的

本研究は、日本人の網膜色素変性症 (以下, RP) の主要な原因である *EYS* 遺伝子における有用な遺伝子診断法を確立することを目的とする。最近我々が同定した日本人の *EYS* 遺伝子における3つの創始者変異に着目し、新たに収集した RP 患者のDNAを用いて、一次スクリーニング法の有用性

について検討を行う。

B. 研究背景

RPは、幼少から成人期における両眼の夜盲にはじまり、進行性の視野狭窄、視力低下を特徴とする遺伝性網膜変性疾患と考えられており、難病指定に含まれる。通常4,000人から5,000人に1人程度の発症と推定され、全体の約50%

を家族に発症を認めない孤発例が占める。家族歴を認める残りの約半数のうち、約35%が常染色体劣性（以下、ar）、約10%は常染色体優性（以下、ad）、約5%がX染色体連鎖性劣性遺伝（以下、X-linked）である（図1、難病情報センター、網膜色素変性症の記載にもとづく）。孤発例の多くは、arRPの原因遺伝子によるものと考えられ、家族歴のあるarRP(35%)に加えて、これら孤発例(50%)を含めた約80%程度がarRPの原因遺伝子によるものと推定されている。従って、日本全国におけるarRPの遺伝疫学を明らかにすることが急務と考えられる。

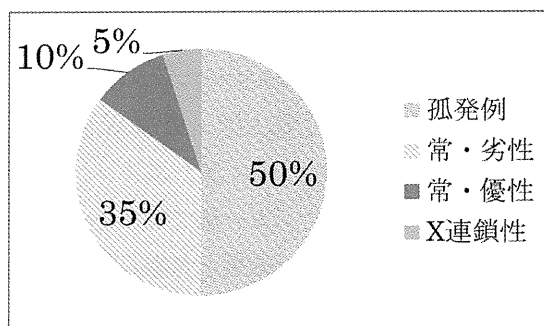


図1. 網膜色素変性症における遺伝形式の概略

EYS遺伝子は2008年にarRPの原因遺伝子として同定され、arRPの約5–15%を占めることが海外で報告された。我々は、先行研究として日本人RP患者68名における遺伝学的解析を行い、複数の新規変異を同定した。そして、これら変異を保有する患者はarRPの約30%を占める高い頻度であった(Iwanami et al. IOVS, 2012)。この結果は、日本人民族の抱える遺伝学的背景の特殊性を示唆しているものと推測された。

海外に比べて日本人における頻度が高い理由として、複数家系における各変異の近傍遺伝子座に対するハプロタイプ解析より、日本人に特異な3つの創始者変異、①c.4957dupA, p.S1653Kfs*2、②c.8805C>A, p.Y2935*、そして③c.2528G>A, p.G843Eの存在を同定した(Iwanami et al. IOVS, 2012)。これらを日本人EYS遺伝子における主要な変異(EYS-Japanese major mutation、以下、

EYS-JM)として、①~③を以下、それぞれEYS-JM1、EYS-JM2、そしてEYS-JM3と呼称する(表1)。これら3つの変異はそれぞれ独立した複数の家系から同定されたが、それぞれの変異に創始者となる個体が存在し、日本人民族のなかで脈々と世代を越えて拡散し、受け継がれてきたことが示唆された。したがって、これらEYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3の各変異は、日本人において比較的頻度の高いことが想定され、これらを用いてスクリーニング法の有用性を検討することは、EYS遺伝子診断の効率化を図る上で必須と考えられた。

表1. EYS遺伝子における日本人で同定された3つの創始者変異

変異	エクソン	塩基配列	アミノ酸変異	蛋白ドメイン	変異タイプ
JM1	26	c.4957dupA	p.Ser1653Lysfs*2	Close to coiled-coil	Frameshift
JM2	43	c.8805C>A	p.Tyr2935*	EGF	Nonsense
JM3	16	c.2528G>A	p.Gly843Glu	EGF	Missense

参考文献、Iwanami et al. IOVS, 2012

C. 対象と方法

1. 当院眼科を受診したRP患者200名および健常者168名を対象にEYS遺伝子の遺伝学的解析を行った。RP患者200名のうち家系解析から7名が常染色体優性、arRPは孤発例を含め193名という内訳であった。EYS遺伝子のスクリーニング検査法として、EYS-JM1、EYS-JM2、そしてEYS-JM3におけるそれぞれのエクソン26、エクソン43、エクソン16とそのエクソンイントロン部を含む領域の直接的塩基配列決定をサンガー法で行った。

2. 京都大学を受診したarRP患者209名について、上記と同様の解析を行った。国立障害者リハビリテーションセンター病院の患者を東日本地域の患者集団、京都大学病院の患者を西日本地域の患者集団とし、上記スクリーニング法の再現性を確認すると共に、両者の遺伝疫学について、比較検討を行った。研究協力者(京都大学; 荻野、大石、吉村)。

(倫理面への配慮)

すべての本研究計画は、当施設のヒトゲノム・遺

伝子解析研究倫理委員会の承認を得て、その指針を順守して行われた。京都大学との共同研究については、研究の施行と患者検体の移譲に際して京都大学の倫理委員会の承認を得た上で、当施設での解析を行った。

D. 研究結果

当施設 RP 患者 200 名 (arRP 患者 193 名を含む)、健常者 168 名における EYS-JM1~JM3 の各変異の遺伝学的な解析結果を表 2 にまとめた。EYS 遺伝子の EYS-JM1、EYS-JM2、そして EYS-JM3 変異は、それぞれ RP 患者 37 名、14 名、27 名から同定された。各変異のアレル頻度は、それぞれ 11.5%、4.0%、7.7%であった。EYS-JM3 変異のみ、健常者より 0.9%の割合で同定された。EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3 の各変異は合わせて 60 名の RP 患者より同定され、その出現率は 30.0% (60/200) であった。以上から、本スクリーニング法の感度は 30.0% (60/200)、特異度は 98.2% (165/168) であった (表 3)。

また、これら EYS 遺伝子変異を同定された 60 名の RP 患者のうち、両側アレルからの変異の検出された患者は 35 名 (58.3%) であり、これらについては arRP の原因診断が可能と考えられた。残る 25 名 (41.7%) については片側アレルからの変異の検出であった (図 2)。

同様の解析を京都大学の arRP 患者 209 名 (西日本地域) について行った。EYS-JM1、EYS-JM2、そして EYS-JM3 変異は、それぞれ RP 患者 37 名、14 名、27 名から同定された。各変異のアレル頻度は、それぞれ 8.1%、3.6%、6.4%であった (表 4)。本スクリーニング法の感度は 29.1% (61/209) であった。また、これら EYS 遺伝子変異を同定された 61 名の患者のうち、両側アレルからの変異の検出された患者は 15 名 (24.6%)、片側アレルからの患者は 46 名 (75.4%) であった。

表 2. EYS 遺伝子における各変異のアレル頻度

変異	RP 患者 †	健常者 ‡
JM1	46 (11.5%)	0
JM2	16 (4.0%)	0
JM3	31 (7.7%)	3 (0.9%)

† RP 患者 200 名の総染色体数 n=400 における変異アレルの観察数とその割合 (%)、‡ 健常者 168 名の総染色体数 n=336 における変異アレルの観察数とその割合 (%) を示す。

表 3. EYS 遺伝子スクリーニング診断法の結果 (人数)

	RP 患者 n=200	健常者 n=168
陽性	60	3
陰性	140	165

感度は 30.0% (60/200)、特異度は 98.2% (165/168)

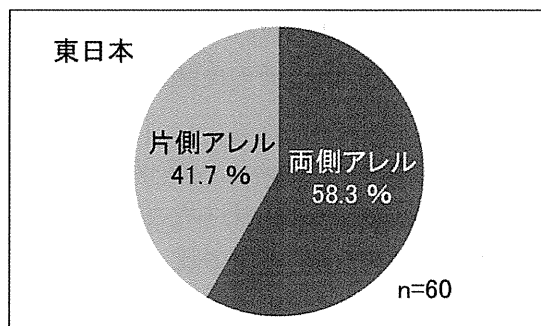


図 2. 東日本地域における両側、片側アレルからの変異診断の割合

表 4. 各地域における各変異のアレル頻度

変異	西日本 RP 患者 †	東日本 RP 患者 ‡
JM1	34 (8.1%)	46 (11.9%)
JM2	15 (3.6%)	16 (4.1%)
JM3	25 (6.0%)	31 (8.0%)

† 西日本 arRP 患者 209 名の総染色体数 n=418 における変異アレルの観察数とその割合 (%)、‡ 東日本 arRP 患者 193 名の総染色体数 n=386 における変異アレルの観察数とその割合 (%) を示す。

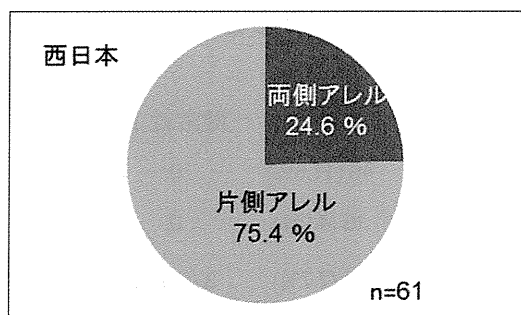


図 3. 西日本地域における両側、片側アレルからの変異診断の割合

E. 考察

1. EYS 遺伝子診断における一次スクリーニング法の有用性

当施設 RP 患者 200 名における解析結果より、高頻度に検出される 3 つの創始者変異、EYS-JM1、EYS-JM2、そして EYS-JM3 は、計 60 名 (30.0%) の患者で検出された。本検査法の感度は 30.0%、特異度は 98.2% であり、十分な有用性が示された。京都大学を受診した 209 名の arRP 患者においても、感度は 29.1% であり、その再現性についても確認された。

過去に報告された *rhodopsin*、*ABCA4* の各遺伝子で 2~3% 程度の推定頻度であったことから、日本人 RP 患者の原因を調べる上では、現在最も有効な方法であることが示された。そして、EYS 遺伝子のこれら 3 つの変異を用いた一次スクリーニング法は、RP 診断法として、簡便でかつ十分な実用性があるものと考えられた。

2. スクリーニング後の EYS 遺伝子診断法の検討

本スクリーニング検査の結果から、片側アレルからのみの変異の検出にとどまる個体については、続いての全エクソンの検索を行うことで、他の変異の有無がすみやかに確認できる。これら対象患者について、現在解析が進行中である。しかしながら、最終的に全エクソン領域の直接的塩基配列決定でも検出が困難である欠失・重複変異については、これらの検出に適した Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

法を用いた検索が必要となる。全エクソン解析結果より両側アレルからの変異が検出されない場合は、MLPA 法の解析を進めている。以下に、EYS 遺伝子診断を効率的に行うためのワークフローを示す。しかしながら、本研究の対象患者すべてについて、未知の変異の検出を見逃さないために、最終的には EYS 遺伝子の全エクソンの解析を遂行する予定である。

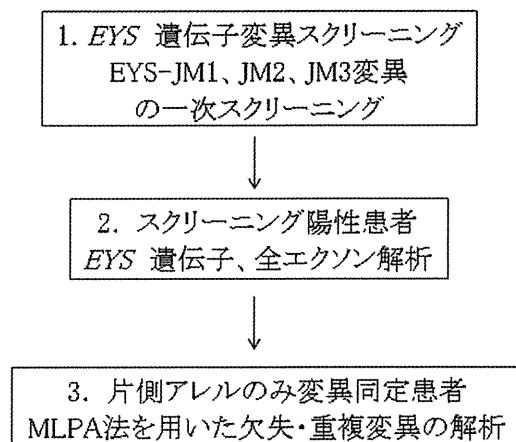


図 4. EYS 遺伝子診断のワークフロー

3. EYS 遺伝子変異の保因者に関する遺伝疫学

EYS 遺伝子において、日本人に特異な 3 つの創始者変異 (EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3) の同定は、海外における RP の遺伝疫学とはその内容が大きく異なることを示唆している。過去の海外報告において RP 原因遺伝子における創始者変異の報告はあるものの、その頻度と規模は日本人と比較すると小さい。一方、我々の EYS 遺伝子における解析結果から、日本人では RP 患者 200 名のうち 60 名と 3 割の出現率となり、明らかに頻度の高い結果であった。

これら遺伝学的背景には、常染色体劣性の遺伝疾患における保因者の存在が大きく関与していることが推測された。そして、特に 3 つの創始者変異それぞれの保因者の頻度の推定が、疾患の頻度を考える上で重要となる。我々の健常者 168 名における解析結果から、EYS-JM1 および EYS-JM2 変異の保因者は認められなかった。しかしながら、EYS-JM3 変異のみ 3 名から検出され、健常者の

1.8%の割合で保因者が同定された。以上、EYS-JM3 変異の頻度から推定した場合、100 人に1~2 人程度の保因者が推定され、1 万~4 万人に1 人程度の有病率が推定されたが、今後、その他のEYS-JM1 およびEYS-JM2 変異の保因者についても、その頻度の詳細を把握することが重要と考えられた。

EYS-JM3 変異は、他のEYS-JM1 およびEYS-JM2 変異の短縮変異とは異なるミスセンス変異であり、その病原性について、詳細な家系解析が報告されていない。このため、EYS-JM3 変異をもつ患者家系 10 家系において変異と表現型についての分離解析を行った。いずれの家系においても、EYS-JM3 変異と RP 表現型は矛盾なく RP 患者のみに分離されることから、EYS-JM3 変異は arRP としての病原性をもつことが示唆された。

3. *EYS* 遺伝子の全国における遺伝疫学

今回、当施設における東日本地域在住の RP 患者 200 名 (arRP193 名) について、*EYS* 遺伝子の遺伝学的解析を行った。本スクリーニング法の有効性を確かめるため、京都大学を受診した西日本における arRP 患者 209 名においても同様に解析を行った。アレル頻度に着目した場合 (表 4)、EYS-JM1 変異については、東日本に多く、西日本において少ない傾向が観察された。EYS-JM2 変異、EYS-JM3 変異については、大きなアレル頻度の差は観察されなかった。しかしながら、両側アレルからの変異検出頻度の割合について比較すると、東日本では 58.3%であるのに対して、西日本では 24.6%と、EYS-JM1、EYS-JM2 およびEYS-JM3 の構成内容には大きな違いが観察された (図 2、図 3)。現在、西日本における片側アレルから変異の検出された患者群の全エクソン解析を遂行中である。これらデータより西日本における *EYS* 遺伝子変異型の構成は、東日本の内容とは一部で異なる可能性が示唆された。

4. *EYS* 遺伝子における遺伝子型-表現型関連の解析

遺伝子型-表現型による病態の理解は、臨床で遭遇する個体間における病気の進行の差異を理

解する上での一助になることが期待される。また、遺伝子診断後の遺伝子カウンセリングにおいても必須の情報となる。*EYS* 遺伝子変異が同定された 23 名 (平均年齢 52.0 歳、経過観察期間平均 7.3 年) について夜盲の自覚年齢、診断時年齢、視力、視野などの臨床所見に基づいた解析を行った。*EYS* 遺伝子変異をもつ患者臨床像は、夜盲の自覚が 20 歳代に最も多く、診断時年齢は平均 39.0 歳と中年期に進行を認める典型的な遅発型 RP をもつであることが示唆された (岩波ら、2013 年、臨床眼科)。遺伝子型-表現型における解析では、短縮型変異をホモまたは複合ヘテロ接合で 2 つ有する個体群と、短縮型変異を 1 つ有し他方にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異を複合ヘテロ接合でもつ個体群の比較において、前者で重症化する傾向が確認された。引き続き、本研究において遺伝子型が明らかとなった対象患者についても、これら臨床データを蓄積し、詳細な遺伝子型-表現型の解析を行う予定である。

F. 結論

1. 網膜色素変性症における簡便かつ有効性の高い *EYS* 遺伝子診断法における一次スクリーニング法の検討を行った。日本人に特異な 3 つの創始者変異を調べることで、RP 患者 200 名うち 3 割において陽性の結果を得た (感度 30%、特異度 98.5%)。これら陽性患者のうち、約 6 割については両側アレルからの変異検出となり、診断が可能であった。残る 4 割の片側アレルでの検出にとどまる患者について、つづいての全エクソンの検索が必要であった。以上の結果から、*EYS* 遺伝子診断法における一次スクリーニング法の有効性が示された。

2. 全国規模の arRP 患者における解析を行った。東日本の arRP 患者 193 名、西日本 arRP 患者 209 名を対象に *EYS* 遺伝子診断のスクリーニング法による解析を行った結果から、両者の遺伝疫学における相違を示唆する結果が得られた。今後これらの詳細を解析する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 岩波将輝, 西田朋美, 三輪まり枝, 山田明子, 西脇友紀, 小松真由美, 世古裕子, 加藤誠志, 仲泊聡. 日本人網膜色素変性症における *EYS* 遺伝子変異とその臨床像. 臨床眼科 67 (3), 2013, p. 275-279.

2. 学会発表

1) 岩波将輝, 西田朋美, 中嶋明子, 世古裕子, 仲泊聡, 加藤誠志. 日本人網膜色素変性症の *EYS* 遺伝子診断. 第 117 回日本眼科学会総会. 東京国際フォーラム, 東京, 2013-4-4/4-7.

2) 岩波将輝. *EYS* 遺伝子変異における遺伝子型表現型関連の検討. 第 17 回眼科分子生物学研究会. 焼津松風閣, 静岡, 2013-2-23.

3) 岩波将輝. 日本人網膜色素変性症における *EYS* 遺伝子変異とその臨床像. 第 5 回網膜・リサーチ・ミーティング (RRM). 国立病院機構東京医療センター, 東京, 2012-12-8.

4) 岩波将輝. 網膜色素変性症における遺伝子診断とその展望. 第 57 回日本人類遺伝学会総会. 京王プラザホテル, 東京, 2012-10-24/10-27.

5) 岩波将輝, 西田朋美, 三輪まり枝, 山田明子, 西脇友紀, 小松真由美, 世古裕子, 加藤誠志, 仲泊聡. 日本人網膜色素変性症における *EYS* 遺伝子変異とその臨床像. 第 66 回日本臨床眼科学会総会. 京都国際会館・グランドプリンスホテル京都, 京都, 2012-10-25/10-28.

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業 感覚器障害分野）
分担研究報告書

変異 *EYS* を発現している変性視細胞モデルの作出に関する研究

研究分担者 世古裕子 国立障害者リハビリテーションセンター研究所
感覚機能系障害研究部 視覚機能障害研究室長

研究要旨

本研究の目的は、網膜色素変性症患者の体細胞を視細胞に分化誘導し、変性視細胞モデルを作出することである。初年度である24年度には、市販のヒト皮膚繊維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによる網膜細胞への分化誘導法を検討した結果、視細胞特異的な*EYS*遺伝子の発現を誘導することに成功した。さらに、倫理審査委員会の承認を得て、正常ボランティアの皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結を実施した。皮膚採取にあたり、事前の準備、実際的な手技、皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結の全過程に問題がないことを確認し、次年度の患者由来細胞採取へ向けて十分な準備を整えた。

A. 研究の目的

RPは、夜盲に始まり、徐々に視野狭窄、視力低下が起こる進行性の遺伝子疾患であり、現在有効な治療法はない。中途失明により就労が困難となるケースが多く、RP患者の社会生活を支援するためにも、予後の予測法や抜本的治療法が望まれている。一方で2008年には、非定型網膜色素変性症の一つであるLeber先天性黒内障において遺伝子治療による視機能の回復が報告され、将来的にRPの治療法として遺伝子治療を含めた個別化医療が行われることが期待されている。

RPの原因となる遺伝子変異は患者毎に様々であるが、いずれの場合も最終的には視細胞の変性を引き起こす。視力を失う前に視細胞の変性を抑え、病気の進行自体を止めることが望まれている。遺伝性疾患における個別化医療では、根本的な治療を行うためにはまず原因となる遺伝子の変異が判っていることが前提条件であり、さらにその変異によって発症へと至るメカニズムが明らかになっていることが必須となる。

EYS 遺伝子は2008年にarRPの原因遺伝子として同定され、arRPの約5–15%を占めることが海外で報告された。当研究所において、先行研究として日本人RP患者68名における遺伝学的解析を行い、複数の新規変異を同定した。そして、これら変異を保有する患者はarRPの約30%を占める高い頻度であった(Iwanami et al. IOVS, 2012)。

EYS 遺伝子を含めて、網膜色素変性症の原因候補遺伝子の多くは網膜に特異的に発現している。そのため、網膜に発現する遺伝子(mRNA)を解析できれば、全ゲノムを解析するよりも効率がよい。世古らは、ヒト体細胞(虹彩細胞)から直接リプログラミングによってヒト網膜細胞に分化誘導することに成功している(Seko et al., PLoS ONE,

2012)。この分化誘導の方法を応用し、患者から採取可能な皮膚や血液由来の細胞から網膜細胞へと分化誘導できれば、*EYS* 遺伝子を初めとした網膜のみに発現するRPの原因候補遺伝子のmRNAを解析することが可能となる。これまでの遺伝子解析の中心であったゲノム解析ではなく、より効率が高いと考えられているcDNAをもとにした解析が可能となる。

本研究では、患者由来の分化網膜を用い、日本人の常染色体劣性網膜色素変性症(arRP)の主要原因遺伝子であることが明らかとなった*EYS* 遺伝子について、遺伝子診断法を確立し、予後予測や治療法の手がかりを得ることが最終目的である。

B. 研究方法

分担研究者が開発したヒト虹彩細胞を視細胞に分化誘導する方法(Seko et al., PLoS ONE, 2012)を応用し、より一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚細胞を視細胞に分化誘導する方法を確立する。さらに、健常者並びにRP患者皮膚細胞を視細胞に分化誘導し、発現遺伝子の解析を行う。

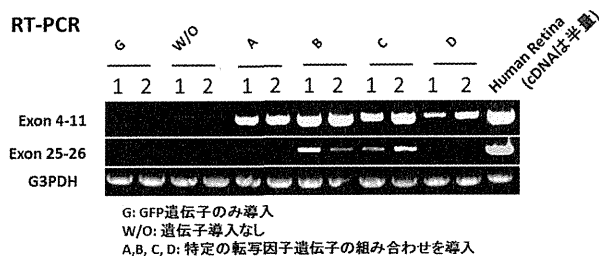
(倫理面への配慮)

網膜色素変性症患者のゲノム解析ならび網膜色素変性症患者の非眼球組織から網膜細胞を分化誘導する研究計画については、国立障害者リハビリテーションセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会においてすでに審査を受け承認を得ている。視覚障害者の方々に細胞試料(血液、皮膚)を提供してもらうにあたっては十分なインフォームド・コンセントを得る。すなわち、研究の目的、研究の内容、予想される協力者の不利益、個人情報管理方法、研究結果の取扱い、試料の取扱いについて文書及び口頭で十分な

説明を行なう。文書で同意が得られた場合には、眼科外来において採血や皮膚採取を行ない、サンプルは個人識別情報管理者（医事管理課長）によって連結可能匿名化を行なった後、研究に使用する。細胞試料と遺伝子試料は、同意書の中で同意を得た条件で使用し、途中で同意の撤回があった場合には、試料並びに結果の廃棄を行なう。研究結果について、試料提供者から希望がある場合には、本人に限り知らせる。そこで患者に不安などの問題が生じた場合にはカウンセリングにより対応する。結果を論文等で公開する場合には、個人を特定できるいかなる情報も含めない。今年度行った正常ボランティアの皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結についても、上記同様、倫理面へ十分配慮した。

C. 研究結果

①市販のヒト皮膚線維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによる網膜細胞への分化誘導法を検討した結果、視細胞特異的な *EYS* 遺伝子の発現を誘導することに成功した（下図）。



②誘導された *EYS* 遺伝子の配列は、データベースに登録されている配列と一致した。

③倫理審査委員会に、「患者由来分化誘導細胞を用いた網膜変性疾患の新規診断法の開発」と題し、上記研究について申請を行い承認された。これを受け、3名の正常ボランティアの皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結を実施した。皮膚採取にあたり、事前の準備、実際的な手技、皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結の全過程に問題がないことを確認し、次年度の患者由来細胞採取へ向けて十分な準備を整えた。

D. 考察

一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚細胞に複数の転写因子遺伝子を導入すると視細胞特異的な *EYS* 遺伝子の発現が早期に誘導されることは、我々が初めて見つけた新知見であり、低コストの迅速診断法の開発に貢献できる可能性がある。

E. 結論

変性視細胞解析へ向けての準備は着実に進んで

おり、平成25年度には、変性視細胞を用いた診断法の開発研究を本格的に開始することを目指している。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岩波将輝, 西田朋美, 三輪まり枝, 山田明子, 西脇友紀, 小松真由美, 世古裕子, 加藤誠志, 仲泊聡	日本人網膜色素変性症におけるEYS遺伝子変異とその臨床像	臨床眼科	67巻3号	pp.275-279	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

日本人網膜色素変性症における
EYS 遺伝子変異とその臨床像

岩波 将輝*¹ 西田 朋美 三輪まり枝 山田 明子
西脇 友紀 小松真由美 世古 裕子*² 加藤 誠志
仲泊 聡*¹

*¹ 国立障害者リハビリテーションセンター病院第二診療部眼科 *² 国立障害者リハビリテーションセンター研究所

要約 目的: *EYS* 遺伝子変異が同定された網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa: 以下, RP) 患者の臨床像の報告。**対象と方法:** 当科受診 140 例の RP 患者のうち変異が同定された 23 例 (平均年齢 52.5 歳) を対象に, 視力, 視野, 夜盲の自覚年齢, RP 診断時年齢, 白内障診断および手術時年齢, 網膜電図, 眼底所見の項目について検討した。**結果:** 夜盲の自覚年齢は 20 歳代に多く, 診断時年齢は平均 39.0 歳, 13 例に白内障手術の既往があり, 臨床像は定型例にみられる遅発型 RP 像を呈した。**結論:** *EYS* 遺伝子変異は定型 RP 像を呈する可能性があり, 併発白内障にも留意する必要がある。

Clinical features of retinitis pigmentosa with *EYS* gene mutation
in the Japanese

Masaki Iwanami*¹ Tomomi Nishida Marie Miwa Akiko Yamada
Yuki Nishiwaki Mayumi Komatsu Yuko Seko*² Seishi Kato
Satoshi Nakadomari*¹

*¹ Dept of Ophthalmol, Hosp, Natl Rehab Cent for Persons with Disabilities (NRCD)

*² Dept of Vis Sens Disorder, Res Inst, NRCD

Abstract. Purpose: To report clinical features of retinitis pigmentosa with *eyes shut homolog* (*EYS*) mutation in the Japanese. **Cases and Methods:** Out of 140 patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa, 23 cases were identified with probable *EYS* mutation by genetic tests. The series comprised 9 males and 14 females. The age averaged 53 years. They were evaluated regarding visual acuity, visual field, age of onset of night blindness, age diagnosed with retinitis pigmentosa, and age of cataract surgery. **Results:** The majority of patients noticed night blindness during third decade of life. Retinitis pigmentosa was diagnosed at the age averaging 39 years. Thirteen patients had received cataract surgery. The fundus showed typical features of late-onset retinitis pigmentosa. **Conclusion:** Patients with *EYS* mutation often manifest typical fundoscopic features of retinitis pigmentosa and complicated cataract.

Rinsho Ganka (Jpn J Clin Ophthalmol) 67(3): 275-279, 2013

二 緒言

Eyes shut homolog (以下, *EYS*) 遺伝子は 2008 年に常染色体劣性 (autosomal recessive: 以下, ar) 網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa: 以下, RP) の原因遺伝子として同定され, 疫学的に arRP の

約 5~15% を占めることが海外で報告された^{1,2)}。日本人 RP 患者における *EYS* 遺伝子の新規変異が 2012 年に報告され^{3,4)}, 孤発例を含めた arRP の約 3 割を占めることが推測されている。海外の報告とは異なり, 日本人で高頻度に検出される理由として, 日本人に特異な 2 つの創始者変異

別刷請求先: 岩波将輝 (いわなみ・まさき) 〒359-8555 所沢市並木 4-1 国立障害者リハビリテーションセンター病院第二診療部眼科

Reprint requests to: Masaki Iwanami Department of Ophthalmology, Hospital, National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities, 4-1 Namiki Tokorozawa 359-8555, JAPAN

E-mail: iwanami-masaki@rehab.go.jp

c.4957dupA (p.S1653Kfs*2) と c.8805C>A (p.Y2935*) が存在し、これら 2 つの変異は血縁のない複数の患者から同定された。また、筆者らの報告³⁾において EYS 遺伝子変異をもつ患者 15 例の長期経過における解析では、40 歳以降の中年期において顕著な視力低下の傾向が観察された。今回、EYS 遺伝子変異が同定された RP 患者 23 例の臨床像の詳細について解析を行ったので報告する。

二 対象と方法

当センターにおけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認のもと、当科を受診した 140 例の RP 患者に本研究の説明と同意を得て、末梢血よりゲノムを採取し、EYS 遺伝子における全 43 エクソンの直接的塩基配列決定を行った³⁾。EYS 遺伝子変異が両アレルともに同定された患者について、診療録の病歴・所見をもとに後ろ向き調査を行った。詳細な病歴と臨床所見が得られた 23 例の患者内訳を表 1 に示す。これら患者には、筆者ら既報告³⁾の患者のうち 13 例も含まれる。これら患者を対象に、①受診時 (ゲノム採取時) の年齢、性別、②遺伝形式、③夜盲の自覚年齢、④RP 診断時年齢、⑤白内障の診断と混濁部位、⑥白内障手術時年齢、⑦患者受診時のよいほう眼の矯正視力と視野 (Goldmann 視野計の V-4e, I-4e 指標の半径)、⑧網膜電図、⑨眼底所見の各項目について検討を行った。

二 結果

1. 患者年齢、遺伝形式、夜盲の自覚年齢、RP 診断時年齢

EYS 遺伝子変異をもつ患者 23 例において、①患者の平均年齢は 52.5±8.5 歳 (33~69 歳) であり、男性 9 例、女性 14 例であった。②遺伝形式は ar が 9 例、孤発例が 14 例であった。③夜盲の自覚年齢は 12 例で 20 歳代が最も多く、残る 11 例は 10 歳代 (一部に幼少との回答を含む) であった。1 例 (症例 21) では、夜盲よりまぶしさの自覚が強かったと報告があった。④視力低下または視野狭窄の進行に伴う 23 例の RP 診断時の平均年齢は 39.0±9.7 歳 (33~61 歳) であった。

2. 併発白内障の診断と混濁部位、手術時年齢

⑤対象患者 23 例の患者のうち 20 例 (86.9%) は白内障診断を受けており、これらの診断に基づいて白内障の混濁部位をまとめると、核白内障が 12 例と最も多く (60.0%)、つづいて後囊下白内障が 6 例 (30.0%)、前囊下白内障は 2 例 (10.0%) であった。いずれの症例においても併発白内障の原因となる他の全身疾患や明らかな眼合併症の既往を認めなかった。対象患者 23 例のうち 13 例には白内障手術既往があり (56.5%)、⑥手術時の平均年齢は 51.1±7.9 歳 (37~67 歳) であった。

3. 視力と視野、網膜電図、眼底所見

⑦患者 23 例のよいほう眼の視力と視野 (Goldmann 視野計 I-4e 指標) の分布を図 1 に示す。視力低下のない眼 (視力 0.8 以上) が 6 例 (26.0%)、このうち 2 例 (症例 5, 症例 8) については 30 歳代であったが、それ以外の 4 例の患者は 49~60 歳の範囲であった。視力 0.1 以下の眼は 9 例 (39.1%) で、いずれも 40 歳以降 (43~59 歳) の患者であった。また、症例 13, 症例 20 については、RP の進行のみならず、明らかな白内障の進行に伴う視力低下も観察された。

視野は 1 例 (症例 21) において輪状視野狭窄を認めたが、他の全例で RP に典型的な求心性視野狭窄を示し、V-4e, I-4e 指標ともに強い障害を認めた。I-4e 指標の半径に基づき、求心性視野狭窄 5° 以下は 19 例 (82.6%) であった。視力 0.1 以下の眼 (9 例) は、全例が求心性視野狭窄 3° 未満に含まれた。一方で、視力低下を認めない 6 例 (視力 0.8 以上) についても、1 例 (症例 21) を除いて求心性視野狭窄 10° 以内を認めた。⑧受診時の網膜電図は 1 例 (症例 21) を除いて全例で振幅消失を認めた。⑨眼底所見は、全例で網膜血管狭細、網膜色素上皮萎縮、および骨小体様色素沈着を認め、進行例では蠟様乳頭萎縮を認めた。各症例において年齢と病期の進行において程度の違いを認めたが、既報告³⁾と同様に定型 RP に代表される眼底所見が観察され、無色素性、区画性などの非定型例は観察されなかった。その他、網膜疾患の合併症として、症例 8 で黄斑浮腫、症例 9 では硝子体出血の既往を認めた。