

201238006A

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24年度 総括研究報告書

平成25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24年度 総括研究報告書

平成25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25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 上野真治 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 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学 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 助教 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	小林正昭	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 : masaakikobayashi@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臨床医学系講座眼科学

林 孝彰 東京慈恵会医科大学眼科学教室

國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室

篠田 啓 帝京大学医学部眼科学教室

上野 真治 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学

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24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およぼす。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で進行性の機能障害を黄斑部にもたら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視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は遺伝子治療や再生医療、そして人工網膜などが検討されている。これまでにスターガルト病、錐体ジストロフィー、BEST病等、その他の黄斑ジストロフィーを含めて米国人を対象とした遺伝子解析によって優性型、劣性型、X染色体型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におけるマイクロサテライトマーカーによる連鎖解析法に続いてこの領域の数百の遺伝子をサンガー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、患者の全エクソンを対象としたエクソーム解析や全ゲノム解析が可能になり、眼科疾患においてもこの手法を利用した遺伝子解析が報告されている(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り(Akahori et al, Am J Hum Genet 2010)、本研究では理化学研究所と国立遺伝学研究所にも DNA シーケンスと遺伝子解析に参加していただき、黄斑疾患を含む10種類の遺伝性網脈絡膜疾患(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、網羅的な全エクソーム解析を最新の次世代シーケンサーを利用して行い、希少難病眼科疾患である黄斑ジストロフィーとその他の網脈絡膜疾患について、日本人患者の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。

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疾患ごとに異なり、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、黄斑ジストロフィーを含む網脈絡膜疾患について、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。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。

特に劣性遺伝による希少難病眼疾患は将来的な遺伝子治療の有力な候補と考えられており、これらの原因遺伝子を一つでも多く明らかにすることは、治療への重要なステップと考えられる。

当研究部では6年前より網脈絡膜疾患の遺

伝子診断に向けた症例登録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（感覚器ネットワーク）に構築した。

(<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暗号化されたオンライン通信によって収集し、臨床医と研究者が情報を共有するシステムである。それぞれの権限にしたがって情報を書き込み、家系図や眼底像、網膜電図のアップロードも可能である。

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、シーケンズ費用を安価に抑え、高い確率で希少難病眼疾患の原因解明が進行している。

B. 研究方法

1) 診断と血液検体の収集（三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林、上野）

黄斑ジストロフィーを含む網脈絡膜疾患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。参加施設は倫理委員会の承認済み。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) エクソーム解析（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ズは平均100リードで行った。

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）

エクソン配列のレファレンス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/>) において行った。基本的には各塩基配列の精度を検証し、

これを決定したのちにアミノ酸配列の変化を全エクソンについて検索し、エクソンとその周辺の欠損、挿入、反復を1,000人ゲノムプロジェクトの配列との比較で明らかにする。特に低い頻度で検出されるアミノ酸置換やタンパク質への影響の大きいアミノ酸配列の変化に着目した。候補遺伝子については眼疾患を発症する290遺伝子を優先的に検索し、既知遺伝子による発症か、未知遺伝子による発症か判断する。

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。結晶構造が明らかなタンパク質の場合は遺伝子変異によるタンパク質の構造への影響をシュミレーションして判断材料とする。

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、近藤）

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、原因遺伝子のノックアウトマウス、ノックインマウスを作製し、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) 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。

8) 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、上野）

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。この公開は京都大学医学研究科付属ゲノム医学センターの松田文彦教授が主任研究者の遺伝性希少難病疾患データベースプロジェクトに分担研究者として参加しており、平成25年度には我々が検出した遺伝子変異が登録される予定である。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。

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2000家系(約300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で承認されており、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) エクソーム解析 (古野、池尾、岩田)

平成24年度は200家系において代表患者1名あるいは親子3名以上についてエクソーム解析を行った。エクソン抽出キットにはAgilent社のSureSelect v4あるいはSureSelect V4+UTRを用い、Illumina社のHiSeq2000次世代シーケンサーを用いて平均100リード数のシーケンシングを行った。このファイルは国立遺伝研へと送られ、配列の決定、配列のレファレンス配列へのマッピング、1,000ゲノム配列との比較、アミノ酸配列の変異、タンパク質への影響、眼での発現、など複数のフィルターを経て候補遺伝子変異が抽出した。予測される複数の遺伝形式に基づいて候補遺伝子を絞り込み、原因遺伝子変異を決定した。

D. 考察

8施設から約200家系の症例情報とDNA約300検体が収集され、その一部についてエクソーム解析を行った。エクソーム解析によって遺伝性網脈絡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年度は家系の代表患者をエクソームシーケンシングしたが、原因遺伝子を決定できた既知遺伝子変異はきわめて少ない割合でしか存在しないことが明らかとなった。既知遺伝子における未知変異を証明するためにも親子のエクソーム解析が必要であり、平成24年度は親子3名から4名を単位としてエクソームシーケンシングを行った。既知遺伝子変異を検出することは稀であり、多くの家系は既知遺伝子における未知遺伝子変異による発症が観察された。また一部の家系については新規遺伝子の変異が発見され、これらについて優先的に網膜での発現やタンパク質構造への影響について解析を行っている。ノックアウトマウスがすでに存在する場合は積極的にこれを利用することを考えている。

日本では遺伝性網脈絡膜疾患の遺伝子解析が行われてきたが、90遺伝子以上既知遺伝子が存在し、これを網羅的に解析することは困難であった。本研究では全エクソーム解析によって、黄斑ジストロフィー、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ついて研究予算が許す限り、エクソームシーケンシングを行い、一家系でも多くの原因遺伝子を解明したい。

解析結果は京都大学松田教授の厚労省難治性疾患のデータベースに掲載されることになっており、日本の眼科としては初めて公表となる。このデータベースを多くの眼科医が閲覧すると予想されることから、データの精度について、十分な検証を行いたいと思う。

平成25年度は新規遺伝子について機能解析を進めており、発症機序の解明と動物モデルの開発、iPS細胞の樹立と創薬の開発が期待される。

E. 結論

日本では網羅的解析が進んでいない遺伝性網脈絡膜疾患(黄斑ジストロフィー、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)についてエクソーム解析を行った。

その結果、既知遺伝子変異が検出されることは稀で、多くは既知遺伝子における未知遺伝子変異であることが明らかとなった。また一部の家系については未知遺伝子による発症が確認され、これらについて機能解析を行っている。本研究は次世代シーケンサーを用いた遺伝性網脈絡疾患の網羅的エクソーム解析によって希少難治性眼疾患の原因遺伝子を解明し、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る。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

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

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

Thakkinstian A, McEvoy M, McKay GJ, Chakravarthy U, Chakrabati S, Kaur I, Silvetri G, Francis P, Iwata T, Akahori M, Farwick A, Euijung R, Edward A, Seddon JM, Attia J. The association between complement component 2/complement factor B polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 2012;10.1093/aje/kws03

Minegishi Y, Iejima D, Kobayashi H, Chi Z-L, Kawase K, Yamamoto T, Seki T, Yuasa S, Fukuda K, Iwata T. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein

insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. *Human Molecular Genetics* 2013; Advance online publication

書籍

岩田岳、古野正朗、池尾一穂、全エクソーム解析による遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝子探索、エクソーム解析 - 成果と将来 - (企画:松本直道)、医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社 2013;245:401-407

岩田岳、眼疾患をきたす遺伝子変化、第117 回日眼評議員会指名講演:「眼疾患と遺伝子」をより理解するために、日本の眼科、公益社団法人日本眼科医会 2013;84:265-269

岩田岳、Optineurin と正常眼圧緑内障、Digest シリーズ (企画:本庶佑)、Medical Science Digest、ニューサイエンス社 2013;39:2-4

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

学会発表

岩田岳、次世代シーケンサーを用いた眼疾患の原因遺伝子の探索、116回日本眼科学会、2012年4月、東京

岩田岳、補体抑制による加齢黄斑変性発症抑制の試み、第49回補体シンポジウム、2012年8月、大阪

Takeshi Iwata, Disease and Biology of the Macula, 第1回銀川国際眼科フォーラム、2012年8月、中国銀川市

峯岸ゆり子、小林宏明、家島大輔、岩田岳、オプチニューリン E50K 変異体による正常眼圧緑内障の病態機序の解明、2012年12月、東京

Yuriko Minegishi, Hiroaki Kobayashi, Takeshi Iwata. Comparative functional analysis of optineurin and its glaucoma-related mutant E50K by mammalian cell-based LC-MS/MS proteomics. 2012 Biennial Meeting International Society for

Eye Research. August 2012, Berlin, Germany

中山真央、亀井淳三、溝田淳、岩田岳、加齢黄斑変性感受性遺伝子HtrA1のトランスジェニックマウスモデルを用いた習慣危険因子（喫煙）の影響に関する研究、喫煙科学研究所財団平成23年度助成研究発表会。2012年7月、東京

田邊和彦、木村至、岡本はる、村上晶、海老原伸行、岩田岳、毛様体におけるRab8およびERM familyの発現変化の検討、第23回日本緑内障学会、2012年9月、奈良

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24年度）
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

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）
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

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、眼関連疾患罹患者および健常者より採取したDNA検体について、エクソーム濃縮ライブラリーの作製および次世代シーケンサーによる塩基配列解析を実施した。

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用いて罹患者および健常者のDNA検体を比較することにより、疾患原因となる遺伝子変異を効率良く発見することが可能となる。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および関連病院が診断・採取した検体より全遺伝子のエクソン領域に対応するDNAを濃縮、次世代シーケンサーによる高速解析を実施することにより、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より採取された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。目的とするエクソン領域の大きさに対して約 100 倍以上の塩基配列データを得る。得られた配列について

インデックス配列を区別することにより、それぞれの検体に由来する塩基配列を分離する。本研究により得られた塩基配列データは、疾患の原因となる変異解析を行うために、東京医療センターおよび遺伝学研究所に供する。

（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

黄斑ジストロフィーおよび関連する眼疾患の家系の患者および健常者のDNA検体について、エクソームシーケンス解析を行った（図参照）。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、理化学研究所において昨年度導入したアジレント社の自動ライブラリー作製システムを用い、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+UTR kitのプロトコルに従って行った。本年度は東京医療センターにて収集された96種類のDNA検体について、研究の進行に応じて3回に分けて解析を実施した。1回目の解析では7種類の検体よりシーケンス用ライブ

ライブラリーを作製し混合した。2回目は72種類の検体より作製したシーケンス用ライブラリーを4検体分ずつ等量混合し、合計8個の混合ライブラリーを調整した。3回目は17種類の検体から作製したライブラリーから8検体分および9検体分を混合し、2個の混合ライブラリーを調整した。これらの混合ライブラリーについてイルミナ社 HiSeq2000シーケンサーを用いて1レーンまたは2レーン分の解析を実施、両端から100塩基ずつの配列データを得た。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それぞれの検体に由来する塩基配列を分離した。得られた配列データのうち、Q30以上の品質を示した塩基は平均89%であった。今年度実施した96検体について解析した塩基配列全体のデータサイズは合計87億リード数(8.7 G reads)、8.87億塩基(887 G base)であった。1検体につき約9200万リード数(92 M reads)、約930万塩基(9.3 G base)のデータを算出したことになる。本研究においてのエクソン濃縮に用いたAgilent SureSelect v4 + UTRキットのターゲット領域(約71 Mb)に対して、1検体あたり平均130倍量の塩基配列データが得られたことになる。これらの塩基配列データは、眼関連疾患の原因を解明するための変異解析を行うために東京医療センターおよび遺伝学研究所に供した。

D. 考察

本研究において実施したエクソームシーケンス解析により、対象となる全遺伝子エクソン領域の100倍以上にあたる、1検体あたり平均9.3 G塩基のデータが得られた。得られた塩基配列データは、イルミナ社のカタログスペック(Q30以上の塩基が80%以上)と比べても、非常に高い品質であった。塩基変異解析を行うために求められる高品質かつ大量の塩基配列データを解析することに成功したといえる。

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96検体についてエクソームシーケンス解析を実施し、全遺伝子のエクソーム領域を対象とした高品質な塩基配列データを大量に得ることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- いずれも該当なし

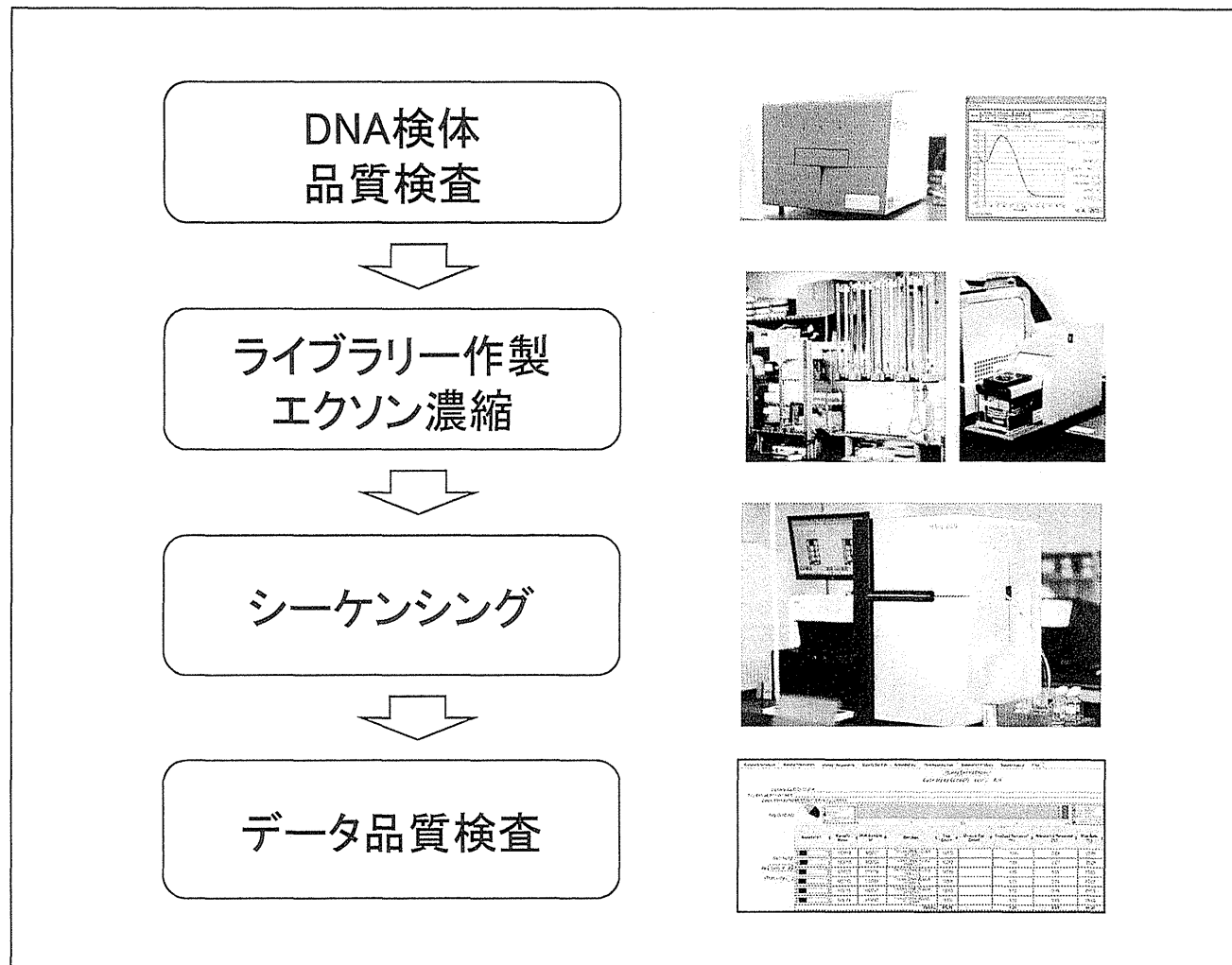


図 エクソームシーケンスの解析フロー。平成24年度は96検体を対象としたエクソーム配列解析を行い、合計87億リード数(8.7 G reads)、8.87億塩基(887 G base)の塩基配列データを得た。

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）
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

分担研究者 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

眼科疾患240検体から Exome シーケンスを行い、遺伝性の明らかな家系を優先的に調べ、劣性、優性遺伝形式の家系ごとに適切なフィルタリングを行い、候補となる変異を網羅的に抽出する。

C. 研究結果

本研究では SureSelect Human All Exon RP1L1 の変異を正確に検出できていることを確認した。また三宅病の別の 1 家系は、RP1L1 中のこれまで報告されていない変異が原因であると推定された。そのほか、レー

V4+UTRs によって Exome キャプチャを行い、DNA を濃縮し、Illumina HiSeq2000 を用いてシーケンスを行った。SureSelect のターゲットとする配列長の合計は 71 Mb で、今回のシーケンスから得られた 1 サンプルあたりの塩基数は平均 6.2 Gb、ターゲット領域の 88 倍のデータ量が得られた。

シーケンスデータから SNV, INDEL 抽出までの一連の解析は、Genome Analysis Toolkit (GATK) の標準的な解析フローに従い、BWA, Picard, GATK を用いて解析を行った。シーケンサーから得られたリードをマッピングした結果、RefSeq によってアノテーション付けられた遺伝子領域の 69% を、1 検体あたり平均でカバーしていた。

抽出された SNV, INDEL の数は、合計で 13,529,100 個であり、その中でアミノ酸配列に影響を与えうる変異は 93,994 個 (0.69%) であった。上記の変異のリストを元に、家系ごとに、ホモ接合の劣性遺伝、コンパウンドヘテロの劣性遺伝、X 連鎖性遺伝、常染色体優性遺伝、de novo で生じた優性遺伝をそれぞれ調べた。

28 家系を調べた結果、三宅病の 2 家系は、確認のため再度シーケンスでも既知の

パー先天性黒内障、全色盲、先天性夜盲症、網膜色素変性、錐体杆体ジストロフィー、黄斑ジストロフィー、スターガルト病の家系も併せて、劣性遺伝が疑われる家系が合計 21 あった。そのうち親子 3 名がトリオでシーケンスされた場合などで、候補遺伝子を 10 個以内に絞り込めた例が 12 家系であった。さらに、これまで眼科疾患の原因遺伝子としてデータベースに登録されていた遺伝子に、新規でアミノ酸置換が生じる変異を持つ家系が 5 家系発見された。これらの変異は疾患の原因である可能性が高い。

また、優性の遺伝形式と推測される 4 家系に関しては、平均 207 個の候補変異に絞り込まれた。

D. 考察

本研究では血液を採取できた検体から順次シーケンスを行ったため、1 家系の中で親、兄弟が読まれているか定まっていない。そのため、家系ごとに調査可能な変異の種類や、検出力が異なっていた。両親が読まれていない家系では、子どもで新たに生じた *de novo* 変異を抽出することは不可能であるし、少なくとも片方の親が読まれていないとコンパウンドヘテロ劣性の候補変異は 10 倍ほど増加してしまう。劣性遺伝形式ではそのように、患者に非常に近縁な検体のシーケンスが必要となる。逆に優性遺伝形式が疑われる場合には、より遠縁の親戚のデータのほうが有用である。たとえば、親の染色体の半分は子どもが受け継ぐため、親子で共通の変異に限定しても 50%しか減少しない。しかし従兄弟であれば共有する染色体の領域から、原理的には 13%にまで絞り込むことが可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

・査読なし

次世代シーケンサー目的別アドバンス

今回の絞り込みで最も効率よく候補を絞り込めたケースは、劣性家系で両親が読まれており、さらに罹患した兄弟が二人以上読まれた場合であった。De novo 変異の探索は、特にツールによるアーティファクトが生じやいが、兄弟で共通する変異に限定することで、約 50 個から 5 個程度に絞り込むことが可能であった。

また、1 家系内で 7 検体以上読まれた劣性遺伝形式の家系が 3 家系存在したが、そのうち 2 家系については、候補遺伝子が 0 個となってしまう。原因として、そもそも Exome 内に原因となる変異が存在しなかった、もしくは SureSelect のターゲット外に原因が存在した、または SNV, INDEL ではなくコピー数多型、構造多型が原因であるなどが考えられる。それ以外にも、原因遺伝子の浸透率や、診断ミス、遺伝形式の推測ミスなども可能性として加わってくる。困難ではあるが、診断の精度を上げ、より正確でより大きな家系図を作成することによって、遺伝形式を正確に推測し、候補変異を絞り込む基準を変更できると思われる。

E. 結論

Exome シーケンスによる網羅的な疾患遺伝子の探索は非常に有効であり、1 家系あたり親子 3 人のトリオ以上の検体をシーケンスすることによって、非常に効率的に候補遺伝子を絞り込むことが可能である。

トメソッド 秀潤社(2012) p186-192 池尾、
吉武、藤井

2. 学会発表

・口頭発表

2012年分子生物学会 3W2II-6 次世代シ
ーケンサーから得られるExomeデータを解析
するプラットフォームの開発 吉武、赤堀、岩
田、池尾

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（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

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、表現型を明確にする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、クリスタリン網膜症、優性視神経萎縮、その他先天性停止性夜盲等、多岐にわたった。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。

当院では健常者の家族を含めて、初年度から110症例以上の臨床検査、DNA採血を行った。遺伝解析により、KCNV2遺伝子（錐体ジストロフィー）の新規変異が複数個見出された。オカルト黄斑ジストロフィーについては、これまでにないミスセンス変異の候補が複数個発見された。また、網膜色素変性および錐体ジストロフィーの家系からは、これまでに国内で報告のない候補遺伝子の関与を示唆する結果が示された。

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、クリスタリン網膜症、優性視神経萎縮、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

KCNV2関連錐体ジストロフィーの3家計4例について、日本人として初めての遺伝子解析を行った。その結果、世界的に報告のない新規変異が3つ見出され、日本人特有の疾患特徴であることが示唆された（論文査読中）。

オカルト黄斑ジストロフィーについては、これまでダイレクトシーケンスによって報告のあったArg45TrpおよびTrp960Argのミスセンス変異の他、全く異なるミスセンス変異が複数個見つかり、本疾患の新たな疾患原因と考えられた（論文執筆中）。

また、錐体ジストロフィー、網膜色素変性についても、これまで国内外で報告のない遺伝子変異が含まれる可能性が示されているが、現在家系内のSegregationを行い確認作業中である。

また、オカルト黄斑ジストロフィーについては、すでに当施設からRP1L1遺伝子の関与が報告されているが、今回、RP1L1以外に疾患関連遺伝子が存在するかを調べる目的で、大家系における正常者、罹患者のDNAよりエクソーム解析を行った。High-LOD Score領域における関連する遺伝子

変異の存在を再調査した結果、RP1L1以外に疾患関連遺伝子が存在しないことが明らかになった(論文執筆中)。

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。これまでの解析で、過去に報告のない原因遺伝子、原因変異が複数個含まれていることが分かった。その一部は論文投稿中である。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、新たな疾患概念が構築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, Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, and Webster AR. The Clinical Effect of Homozygous ABCA4 Alleles in 18 Patients. *Ophthalmology* 2013 in press
- 2) Fujinami K, Lois N, Davidson AE, Mackay DS, Hogg CR, Stone EM, Tsunoda K, Tsubota K, Bunce C, Robson AG, Moore AT, Webster AR, Holder GE, Michaelides M. A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Clinical and Electrophysiologic Assessment, Progression, and Genotype Correlations. *Am J Ophthalmol.* 2013 Mar 14.
pii: S0002-9394(13)00074-3. doi: 10.1016/j.ajo.2013.01.018. [Epub ahead of print]
- 3) Watanabe K, Tsunoda K, Mizuno Y, Akiyama K, Noda T. Outer retinal morphology and visual function in patients with idiopathic epiretinal membrane. *JAMA Ophthalmol.* 2013 Feb 1;131(2):172-177
- 4) 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 Jun;32(6):1135-1147
- 5) Hanazono G, Tsunoda K, Kazato Y, Suzuki W, Tanifuji M. Functional topography of rod and cone photoreceptors in macaque retina determined by retinal densitometry. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(6), 2796-2803, 2012.5
- 6) 角田和繁. 三宅病の現状と展望. *日本臨床*, 71(2), 2012, 355-364

7) 角田和繁. OCTの「コストライン」について. *Retina Medicine.* 1, 1, 90-94, 2012.10

8) 角田和繁. functional OCTの進歩. 専門医のための眼科診療クオリファイ 14:網膜機能検査 A to Z. 215-218, 中山書店, 2012/9/25

2. 学会発表

- 1) Tanaka H, Tsunoda H, Fujinami K, Kubono H, Shinoda K, Akahori M, Iwata T and Miyake Y. Variation in photoreceptor morphology in patients with occult macular dystrophy without RP1L1 gene mutation. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 50th Symposium, Valencia, Spain. 2012.6.7
- 2) Nakamura N, Tsunoda K, Fujinami K, Shinoda K, Akahori M, Iwata T, Tomita K, Hatase T, Usui T, and Miyake Y. Long-term follow-up of four Japanese patients with KCNV2-related retinopathy. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 50th Symposium, Valencia, Spain. 2012.6.7
- 3) Suzuki W, Hanazono G, Nanjo T, Ito K, Nishiyama J, Tanifuji M, Tsunoda K. Imaging of rod and cone photoreceptor activities using functional optical coherence tomography (fOCT) in the macaque retina. ARVO annual meeting 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA. 2012.5.7
- 4) 角田和繁、田中宏樹、藤波芳、篠田啓、赤堀正和、岩田岳、三宅養三. RP1L1変異(p.Ser1199Cys)を持つオカルト黄斑ジストロフィー4名の臨床的特徴. 第66回日本臨床眼科学会. 名古屋. 2012.10.5
- 5) 中村奈津子、角田和繁、藤波芳、篠田啓、富田香、畑瀬哲尚、臼井知聡、赤堀正和、岩田岳、三宅養三. 杆体反応の増強をともなう錐体ジストロフィー4例の長期経過. 第66回日本臨床眼科学会. 名古屋. 2012.10.5
- 6) 角田和繁. シンポジウム1.1 網膜変性と視機能解析の最先端。「三宅病研究の最前線」. 第116回日本眼科学会総会、東京、2012年6月4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

小児遺伝性網膜疾患の網膜機能を詳細に検査するための、 低侵襲網膜電図の開発に関する研究

研究分担者 近藤 峰生 三重大学大学院医学系研究科臨床医学系講座眼科学

研究要旨：遺伝性網膜疾患の多くは、症状の発症が小児期にみられる。このような小児の網膜機能を他覚的に評価する検査として網膜電図（ERG）は重要な検査である。我々はこれまでに小児のERGをより低侵襲で記録することを目的に、皮膚電極ERGの開発を進めてきた。しかしながら、これまでの装置では暗順応後に強い光刺激を用いたフラッシュERGの記録のみが可能であり、杆体反応やフリッカー反応などの記録はできなかった。もしも国際視覚電気生理学学会（ISCEV）が推奨するようなERG応答を全て皮膚電極で追加記録できれば、杆体一色覚や網膜色素変性、小口病などの遺伝性網膜疾患の症にの診断に有用であると考えた。そこで今回我々は、刺激の強さと刺激条件を工夫することによって、皮膚電極ERG装置を用いて杆体反応とフリッカー反応を記録したので報告する。

A. 研究目的

遺伝性網膜疾患の多くは、小児期に症状が出現する。このような小児の網膜機能を他覚的に評価する検査として網膜電図（ERG）は現在においても重要な検査である。我々はこれまでに小児のERGをより低侵襲で記録することを目的に、小型でノイズの少ない簡易型皮膚電極ERGの開発を進めてきた。しかしながら、これまでの装置では暗順応後に強い光刺激を用いたフラッシュERG（いわゆるbright flash ERG）の記録のみが可能であり、杆体反応、錐体反応やフリッカー反応などの記録はできなかった。もしも国際視覚電気生理学学会（ISCEV）が推奨するようなERG応答を全てこの皮膚電極で追加記録できれば、杆体一色覚や網膜色素変性、小口病などの先天性網膜疾患の診断に有用な装置になりうると考えた。そこで今回我々は、刺激の強さと刺激条件を工夫することによって皮膚電極を用いて杆体反応とフリッカー反応を記録する試みを行ったので報告する。

B. 研究方法

我々がこれまでに小児に対するERG装置として開発した、皮膚電極ERGの装置の概要については以前の報告書で詳細に述べた。以下に簡単に説明する。刺激には、円筒状の白色ケースにdiffuserと白色LEDを組み込んだものを用い、これを視力検査用眼鏡枠に取り付けて使用した。光刺激強度は、被験者の角膜の位置で測定した。また、皿型の銀電極を両眼の下眼瞼部にテープで止めて、これを記録電極とした。この位置は、眼瞼縁より5-7mm下方とした。接地電極は耳朶に装着した。

実際のERG記録は、電極を全て装着したあとに20分の暗順応を行い、刺激装置を取り付けた眼鏡枠を装着し、15秒おきに左右交互にそれぞれ8-32回ずつ刺激を行った。生体ノイズを除去するため

に2つの工夫を行った。1つは従来から使用されてきた加算平均法であり、左右ともに8-32回の反応を加算平均した。2つめの工夫は反対眼の眼瞼皮膚から記録された基線ノイズをノイズ除去に用いるという方法である。つまり、刺激した眼の眼瞼皮膚から記録された反応から刺激していない反対眼の眼瞼皮膚の基線ノイズを差し引いて、それを数回繰り返すという方法を用いた。これによる全てのERG応答合計の記録時間は約10分間であった。

今回は、皮膚電極ERGで特に記録が難しいといわれる、フリッカー反応と杆体反応が我々の皮膚電極ERG装置で記録可能であるかどうかを検討した。

（倫理面への配慮）

ERG記録は、被験者に対して今回の研究について十分説明をした後に承諾を得て行った。

C. 研究結果

1) フリッカー反応

まず、皮膚電極ERG装置を用いてフリッカー反応（flicker response）の記録を試みた。刺激の強度としては、ISCEVが標準刺激として推奨している3 cd-s/m²のパルス刺激を用いた。加算回数については8-16回ではノイズが多くて十分ではないことがわかり、50回を採用した。1.5秒おきに左右眼の交互刺激を行い、反対眼の電位を差し引くことでノイズ除去を行った。電圧軸は10 μ V/divに、時間軸は10 msec/divに設定した。また、フリッカー応答の記録の前には10分間の明順応を行い、錐体系ERGの振幅が最大になるように準備した。

その結果、図1に示すように十分な大きさのフリッカー反応を記録することができた。振幅はやはり無散瞳では小さく、記録には散瞳が必須であることがわかった。