

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 230 名並びに京都大学病院眼科を受診した arRP 患者 210 名合計 440 名のゲノム DNA を用い、日本人特有の 3 種の創始者変異 p.S1653Kfs*2 (EYS-JM1)、p.Y2935* (EYS-JM2)、p.G843E (EYS-JM3) の一次スクリーニングを行った結果、約 30% の陽性患者を同定できることが示された。これら陽性患者において、全 43 エクソンの解析を行った結果、両側アレルに変異が認められるのは、その中の約 60% であった。残り 40% の患者について、コピー数変異解析を行ったところ、約 10% についてエクソンの欠失や重複が同定された。さらに、EGF 様ドメイン内に存在するミスセンス変異 p.G843E の病原性、創始者変異の保因者率、遺伝型-表現型の関連性について検討した。また、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、4 種の転写因子を導入することによって視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子並びに *EYS* 遺伝子を発現する視細胞様細胞に分化誘導できることが示された。arRP 患者由来の誘導視細胞様細胞において、変異を有する *EYS* 遺伝子の発現産物が同定できたことから、この手法が新しい遺伝子診断法や治療法の開発につながる可能性が出てきた。

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 第二診療部部長
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 顕 京都大学医学部医学研究科眼科学助教

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。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。

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。日本人では、通常 4,000 人から 8,000 人に 1 人程度

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

昨年度に引き続き、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 p.S1653Kfs*2 (EYS-JM1)、p.Y2935* (EYS-JM2)、p.G843E (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、サンガー法で塩基配列を決定した。片方のアレルにのみ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からない場合には、MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法による欠失・重複変異解析を行った。

B-1-3 ミスセンス変異 p.G843E の病原性解析

EYS-JM3 (p.G843E) の病原性を、蛋白質ドメインにおける変異アミノ酸部位の保存性、生物種間での変異アミノ酸部位の保存性、予測ソフトウェアツールを用いた変異アミノ酸部位の病原性解析といった EYS 蛋白質の構造特性の面から検討した。また、EYS-JM3 変異をもつ患者家系において、遺伝型と表現型についての分離解析を行った。

B-1-4 EYS 遺伝子変異の保因者に関する遺伝疫学

健常者 200 名の解析データ並びに日本人の健常者のデータベースである Human Genetic Variation Browser (HGV) を参照して、創始者変異の保因者数を調べた。

B-1-5 EYS 遺伝子の変異型-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。

B-2 ヒト皮膚繊維芽細胞の直接リプログラミング

B-2-1 市販ヒト皮膚繊維芽細胞の分化誘導

分担研究者の世古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。まず、市販のヒト皮膚細胞に *CRX*, *NEUROD*, *RAX*, *OTX2* 遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて導入し、遺伝子導入した細胞 (誘導視細胞様細胞) と導入していない細胞 (コントロール細胞) それぞれから mRNA を抽出後、RT-PCR による視細胞特異的遺伝子の発現解析、並びに網

羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、それぞれの細胞を用いて、暗黒下にてパッチクランプを行い、光応答を調べた。

B-2-2 被験者ヒト皮膚繊維芽細胞の分化誘導

3 名の正常ボランティアの皮膚繊維芽細胞の単離・培養法を確立した後、3 名の arRP 患者の皮膚繊維芽細胞を同様に単離・培養した。それぞれの細胞を培養し、上述の転写因子遺伝子を導入して分化誘導を行った後、誘導細胞から mRNA を抽出し、視細胞特異的遺伝子の発現を RT-PCR によって確認した。

B-2-3 ヒト網膜完全長 cDNA ライブラリーの作製

市販ヒト網膜 mRNA から我々の独自技術であるベクターキャッピング法 (Kato et al., DNA Res., 2005) を用いて完全長 cDNA ライブラリーを作製した。また、ヒト網膜由来細胞株 Y79 の完全長 cDNA ライブラリーから得られた EYS 遺伝子の完全長 cDNA クローンの解析を行った。

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 患者からの網膜の臨床像と血液ゲノム DNA の収集を続行し、これまでに総計 230 名の国リハ患者からサンプルが得られた。

C-1-2 EYS 遺伝子の変異解析

国リハ患者 230 名と京大患者 210 名、計 440 名について塩基配列解析の結果、EYS 遺伝子のエクソン領域に変異を有する患者の出現率は 32.3% (142/440) であった。この内、両側アレルに変異を同定できたのは、84 名であった。

片側アレルにのみ変異が同定された 58 名について、MLPA 法を用いて欠失・重複変異の解析を行った結果、8 名の患者において新規の欠失・重複変異を同定した。従って、EYS 遺伝子の変異の同定によって、常染色体劣性網膜色素変性症 (arRP) と診断できたのは、84+8=92 名、全体の 20.9% (92/440) であった。

EYS 遺伝子の 3 種の主要変異 p.S1653Kfs*2 (EYS-JM1)、p.Y2935* (EYS-JM2)、p.G843E (EYS-JM3)、及び p.G2186E、p.I2188T 変異を用いる一次スクリーニングを検討したところ、このスクリーニング法の感度は 31.1% (137/440)、特異度は 97.5% (195/200) となった。

C-1-3 ミスセンス変異 p.G843E の病原性解析

4 種類のツールを用いて、p.G843E の病原性を解析した結果、いずれも強く病原性を示唆する結果となった。また、EYS-JM3 を有する 9 家系の家系解析においても、罹患者と非罹患者における表

現型と遺伝型の関係は矛盾なく一致することが確認され、これらの結果も p.G843E の病原性を強く支持するものであった。

C-1-4 EYS 遺伝子変異の保因者に関する遺伝疫学

日本人に特異な 3 つの創始者変異 (EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3) における各アレル頻度から推定される保因者率は 1/25 であった。また、EYS-RP の発症率は 1/2500 と推定された。

C-1-5 EYS 遺伝子の遺伝型-表現型関連解析

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 (n=15) 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 (n=14) の比較において、前者で重症化する傾向が観察された。今後、さらに解析数を増やすことで、これら遺伝子型-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。

C-2 ヒト皮膚繊維芽細胞の直接リプログラミング

C-2-1 市販ヒト皮膚繊維芽細胞の分化誘導

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、視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子の発現誘導がみられた[論文 2]。作製した誘導視細胞様細胞に、光応答(過分極反応)がみられたことから、発現した遺伝子が、光トランスダクションの機能を果たしていることが示された。

C-2-2 被験者ヒト皮膚繊維芽細胞の分化誘導

正常ボランティア由来の皮膚線維芽細胞を分化誘導した結果、視細胞特異的な遺伝子の発現が見られ、4 種の転写因子の導入によって、安定的に EYS 遺伝子の発現誘導がみられた。

arRP 患者由来の皮膚線維芽細胞を分化誘導した結果、上記同様、視細胞特異的な遺伝子である EYS 遺伝子の発現増加が見られた。発現した EYS 遺伝子の転写産物の解析の結果、ゲノム解析で得られた短縮型変異 (EYS-JM1) と一致した変異が見られた。

C-2-3 ヒト網膜完全長 cDNA ライブラリーの作製

96 クローンの 5' 端塩基配列を解析した結果、完全長含有率は 67% であった。このライブラリーは、ヒト網膜由来の完全長 cDNA クローンのリソースとして利用できる。また、Y79 細胞株から選択スプライシングによって生成する異なる EYS 遺

伝子の転写産物を同定した[論文 3]。

D. 結論

我々が以前 EYS 遺伝子に見いだした日本人特有の 3 種の創始者変異 p.S1653Kfs*2 (EYS-JM1)、p.Y2935* (EYS-JM2)、p.G843E (EYS-JM3) を用いる一次スクリーニングを行った結果、約 30% の陽性患者を同定できることが示された。これら陽性患者において、全 43 エクソンの解析を行った結果、両側アレルに変異が認められるのは、その中の約 60% であった。残り 40% の患者について、コピー数変異解析を行ったところ、約 10% については、エクソンの欠失や重複が同定されたが、まだ未同定の変異が残る可能性が示唆された。なお、EGF 様ドメイン内に存在するミスセンス変異 p.G843E は、ドメイン間の保存性、生物種間の保存性、各種ツールによる病原性解析、患者家系の分離解析等から、病原性変異であることが強く示唆された。この変異は健常者にも見られ、保因者率は約 4% と推定された。また、EYS 遺伝子に変異が見られた患者の遺伝型と視力等の表現型に相関が認められたので、予後推定を行うためにも、今後解析数を増やす必要がある。

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、4 種の転写因子を導入することによって視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子並びに EYS 遺伝子を発現する視細胞様細胞に分化誘導できることが示された。arRP 患者由来の誘導視細胞様細胞において、変異を有する EYS 遺伝子の発現産物が同定できたことから、この手法が新しい遺伝子診断法や治療法の開発につながる可能性が出てきた。

E. 健康危険情報 なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 岩波将輝. EYS 遺伝子変異による網膜色素変性症. 日本の眼科 85(4), 2014, p.40-41.
- 2) Seko, Y., Azuma, N., Ishii, T., Komuta, Y., Miyamoto, K., Miyagawa, Y., Kaneda, M., Umezawa, A. Derivation of human differential photoreceptor cells from adult human dermal fibroblasts by defined combinations of CRX, RAX, OTX2 and NEUROD. Genes Cells. 19(3), 2014, p.198-208.
- 3) Kato, S. Identification of genuine alternative splicing variants for rare or

long-sized transcripts. In: DiMaggio S. and Braschipp E. eds. *New Developments in Alternative Splicing Research*. New York, Nova Biomedical. 2013, p.89-108.

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) Iwanami, M., Nishida, T., Nakadomari, S., Nakajima, A., Seko, Y., Kato, S. Three founder mutations in the *EYS* gene in Japanese patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. The 10th International Workshop on Advanced Genomics. Tokyo, Japan, 2013-5-21/5-23.
- 3) 世古裕子, ヒト体細胞から網膜視細胞へのダイレクト・リプログラミングによる最終分化. 第 6 回網膜・リサーチ・ミーティング (RRM). JP タワーホール & カンファランス, 東京, 2013-11-30.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。