

EYS 遺伝子による網膜色素変性の遺伝疫学に関する研究

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

[目的] 本研究の目的は、*EYS* 遺伝子変異を原因にもつ日本人常染色体劣性網膜色素変性症(arRP)患者 (*EYS*-RP) の遺伝疫学を明らかにするため、大規模な患者サンプルを用いて、*EYS* 遺伝子の変異スペクトル解析および保因者数の推定を行うことである。[対象と方法] 当施設（東日本域）230 名および京都大学（西日本域）210 名の arRP 患者 440 名について、血液または唾液よりゲノム DNA 精製を行い、*EYS* 遺伝子の全エクソンおよびエクソン-イントロン部を含む領域の直接的塩基配列の決定、並びに Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法を用いた欠失・重複変異の検出を行った。[結果] *EYS* 遺伝子変異を有する患者の出現率は 32.3% (142/440)であった。合計 21 種類の *EYS* 遺伝子変異を同定し、このうち 10 種類は新規変異であった。*EYS* 遺伝子変異が片側アレルから検出される患者 58 名において MLPA 法による解析を行い、8 名 (13.7%) より欠失・重複変異を同定した。これらの結果から、*EYS* 遺伝子変異の両側アレルからの検出にもとづく *EYS*-RP 患者は全体の 20.9% (92/440)であった。そして、これら *EYS*-RP 患者における 3 つの創始者変異 (*EYS*-JM1、*EYS*-JM2、そして *EYS*-JM3) を有する割合は 94.6% (87/92)であった。健常者において保因者が観察される *EYS*-JM3 の遺伝子型頻度から推定される *EYS* 遺伝子変異の保因者率は 1/25、疾患の発症頻度は 1/2500 であった。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。[結論] 日本人 arRP 患者 440 名における解析結果から、*EYS* 遺伝子変異を有する患者の出現率は全体の約 3 割であり、主要な原因遺伝子であることが再確認された。また、サンガー法と MLPA 法によって *EYS*-RP の診断に至ったのは 92 名 (20.9%) であった。これら arRP 患者の大規模コホートに基づく遺伝疫学および変異スペクトル解析は、遺伝子診断方法の確立と各変異における病態解析において有用であり、治療法開発の戦略上も役立つものと考えられる。

研究協力者

吉村長久 京都大学医学部眼科学 教授
大石明生 京都大学医学部眼科学 助教
荻野 顕 京都大学医学部眼科学 助教

とである。

A. 研究目的

本研究の目的は、日本人の網膜色素変性症（以下、RP）の主要な原因である *Eyes shut homolog* (*EYS*) 遺伝子における遺伝疫学を明らかにするこ

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）、X 染色体連鎖性劣性遺伝（以下、X 連鎖性）が約 5% 程度を占める（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 85% 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。

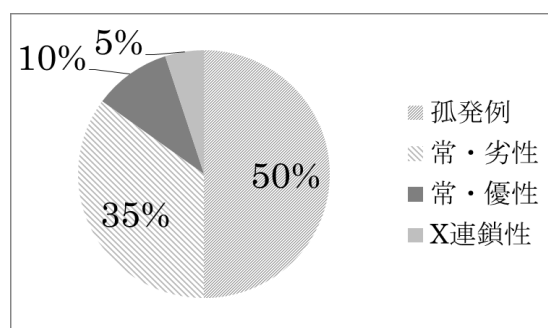


図 1. 網膜色素変性症における遺伝形式の概略

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、これらの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 EYS 遺伝子変異の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、c.4957dupA (p.S1653Kfs*2)、c.8805C>A (p.Y2935*)、そして c.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、～

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伝播し、受け継がれてきたことが示唆された。

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.S1653Kfs*2	Close to coiled-coil	Frameshift
JM2	43	c.8805C>A	p.Y2935*	EGF	Nonsense
JM3	16	c.2528G>A	p.G843E	EGF	Missense

参考文献、Iwanami et al. IOVS, 2012

昨年度までの解析結果から、日本人におけるこれら 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確認され、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（平成 24 年度報告）。しかし、このスクリーニング法を検討するにあたっては、より多くの対象患者における EYS 遺伝子変異の同定を行うことで、正確なスクリーニング法の診断率を検討する必要がある。

そこで今年度は、東日本域 230 名、西日本域 210 名の計 440 名の全国的な患者サンプルにおける EYS 遺伝子の解析を網羅的に行うことによって、日本人における EYS 遺伝子の遺伝疫学を明らかにすることを目的とした。

C. 対象と方法

1. 対象と遺伝子解析方法

当センター病院眼科を受診した 230 名の arRP 患者（東日本域）、京都大学を受診した arRP 患者 210 名（西日本域）、および健常者 200 名を対象に遺伝子解析を行った。患者 440 名および健常

者 200 名の血液または唾液からゲノム DNA の精製を行い、*EYS* 遺伝子の全エクソンおよびそのエクソン-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. 欠失・重複変異の同定方法

サンガー法によって検出が困難である欠失・重複変異について、これらの検出に適した Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いた検索を行った。対象は、全 43 エクソン領域の直接的塩基配列決定の結果において、片側アレルからのみ *EYS* 遺伝子変異が検出された arRP 患者 58 名とした。

3. 遺伝子変異の病原性解析

遺伝子変異は、主に短縮型変異(機能欠失変異)、欠失・重複変異(機能欠失変異)、およびミスセンス変異に分類される。特にミスセンス変異におけるアミノ酸置換では、その病原性を検討するため、一般的な方法である以下の 4 点を検討した。

- (a) 蛋白ドメインにおける変異アミノ酸部位の保存性
- (b) 生物種間での変異アミノ酸部位の保存性
- (c) 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
- (d) 家系解析

(c)の解析ツールとしては、以下のものを用いた。SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、PMut(<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>)、SNAP(<https://www.rostlab.org/services/snap/submit>)。

(d)の家系解析においては、変異の同定された患者の血縁家族から協力の同意を得られた場合、家族の血液または唾液からゲノム DNA の精製を行い、*EYS* 遺伝子の解析と問診を行った。

4. 遺伝子変異における保因者率の推定

当施設における健常者 200 名の遺伝学的な解析結果に加えて、日本人の健常者のデータベースである Human Genetic Variation Browser (HGV) (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>)

を参照して、変異アレルの観測値をもとに、健常者(頻度 p)、保因者(ヘテロ接合)、ホモ接合(頻度 q)の頻度を集計した($q=1-p$)。任意交配が成立しているメンデル集団において、遺伝子型 $AA:Aa:aa$ の存在頻度比が $p^2:2pq:q^2$ となるハーディ・ワインベルク(Hardy-Weinberg)則の仮定にもとづき、 p, q の値を観測値から近似計算し、保因者率($2pq$)および疾患発症率(q^2)を推定した。

(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

1. *EYS* 遺伝子変異を有する患者の出現率の検討

arRP 患者 440 名のうち、サンガー法によって *EYS* 遺伝子のエクソン領域に病原性変異が同定された患者は 142 名、変異を有する患者の出現率は 32.3% (142/440) であった(図 2)。

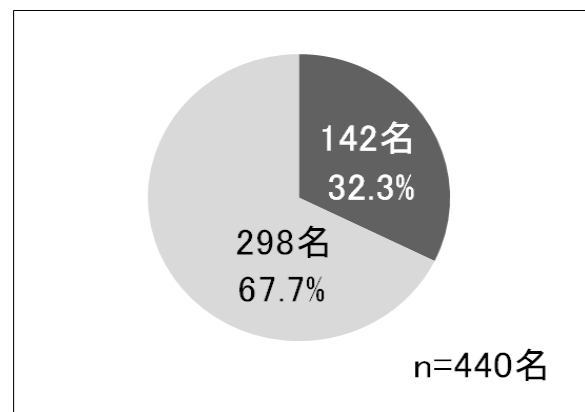


図 2. *EYS* 遺伝子変異を有する患者の割合

2. *EYS* 遺伝子変異による RP 診断率の検討

EYS 遺伝子の病原性変異を有する 142 名のうち 84 名 (59.2%) において、*EYS* 遺伝子変異の両側アレルからの同定に至った。一方で残る 58 名は片側アレルからのみの変異同定に留まったが、こ

れら患者を対象に MLPA 法を用いた欠失・重複変異の解析を行った結果、8 名（欠失変異を 7 名、重複変異を 1 名）の患者からこれら変異を同定し、検出率は 13.8% (8/58)であった。従って、両側アレルからの変異同定に至った患者は計 92 名（92/142、64.8%）となった（図 3）。MLPA 法により欠失・重複変異の同定された 8 名を除いた残る 50 名（50/142、35.2%）については、片側アレルのみ変異を検出する結果となった。

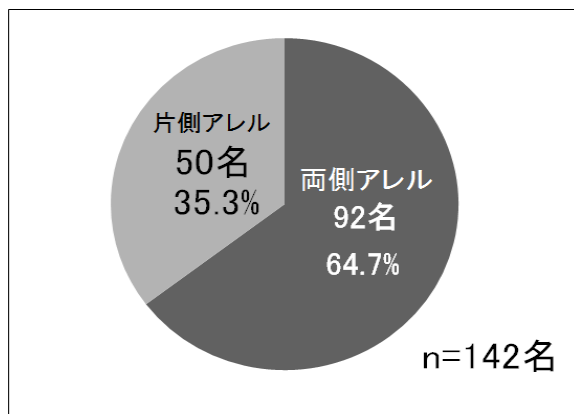


図 3. EYS 遺伝子変異を両側アレルに有する患者の割合

以上の結果から、両側アレルからの EYS 遺伝子変異の同定により RP 診断に至った症例（以下、EYS-RP）は 92 名であり、全体の 20.9% (92/440) であった（図 4）。また、片側アレルのみ変異同定に至った患者は 50 名（50/440、11.4%）であり、これら患者は EYS 遺伝子による RP との診断には至らなかった。

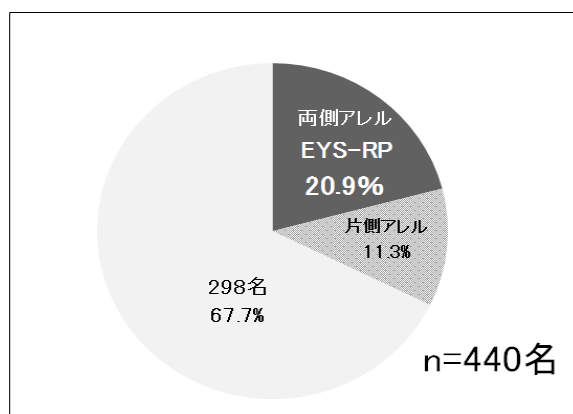


図 4. EYS 遺伝子変異による RP 診断率

3. EYS-RP 患者における 3 つの創始者変異を有する割合の検討

これら診断に至った EYS-RP 患者 92 名のうち、94.6%を占める 87 名は EYS-JM1、EYS-JM2、そして EYS-JM3 の創始者変異を少なくとも 1 つ有する患者であり、これら 3 つの創始者変異は高頻度に観察された（図 5）。

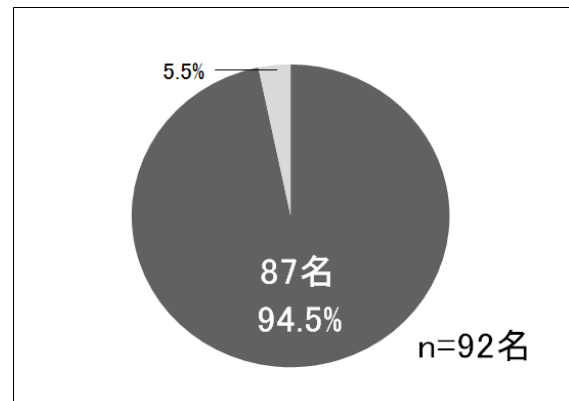


図 5. EYS-RP 患者における 3 つの創始者変異を有する割合

また、EYS 遺伝子変異を少なくとも一つ以上有する患者 142 名のうち、EYS-JM1、EYS-JM2、そして EYS-JM3 の創始者変異をもつ割合は、93.0% (132/142)、創始者変異をもたないものは 7.0% (10/142) であった（図 6）。

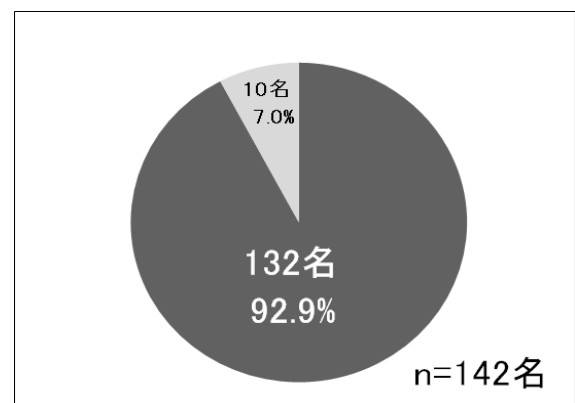


図 6. EYS 遺伝子変異を有する患者における 3 つの創始者変異を有する割合

4. EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3 の創始者

変異のアレル頻度について

arRP 患者 440 名における EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3 の各創始者変異の出現個体の頻度を検討すると、EYS-JM1 (63/440, 14.3%, ホモ 16, ヘテロ 47)、EYS-JM3 (56/440, 12.7%, ホモ 5, ヘテロ 51)、そして EYS-JM2 (39/440, 6.9%, ホモ 3, ヘテロ 33) の順に多く観察された。同様に各変異のアレル頻度 (n=880 染色体あたり) は、EYS-JM1 (88/880, 10.0%)、EYS-JM3 (61/880, 6.9%)、そして EYS-JM2 (45/880, 5.1%) の順に多く観察された (図 7)。

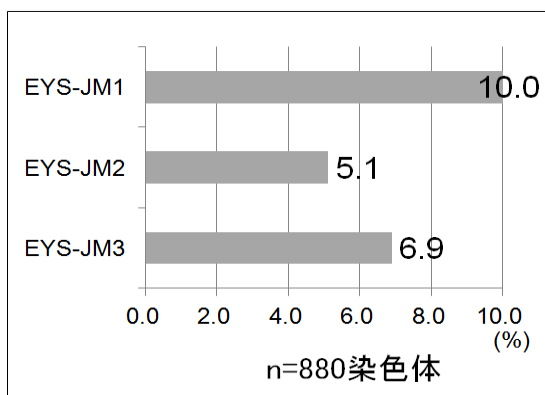


図 7. arRP 患者 440 名における 3 つの創始者変異のアレル頻度 (%)

次いで健常者 200 名における EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3 の各創始者変異のアレル頻度を示す (図 8)。EYS-JM3 のみ、ヘテロ接合の保因者の存在が観察され、そのアレル頻度は 1.25% (5/400) であった。EYS-JM3 のホモは健常者 200 名において観察されなかった。

5. EYS-JM3 (ミスセンス変異、p.G843E) の病原性変異としての信頼性の検討

上述のようにミスセンス変異 p.G843E については、健常者における保因者が、2.5% (5/200) の頻度で認められることから、病原性変異としての詳細な検討が必要と考えられた。そこで、以下の 4 項目についての検討を行ったが、いずれの結果も、p.G843E の病原性を示唆する結果であった。

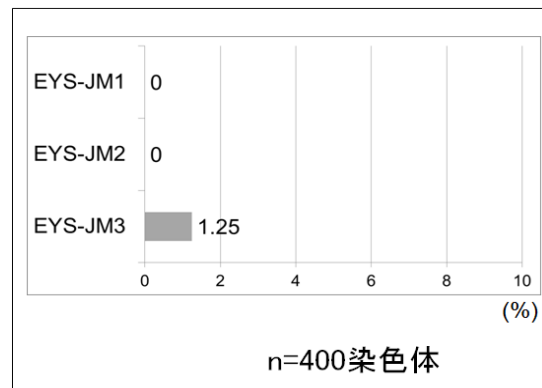


図 8. 健常者 200 名における 3 つの創始者変異のアレル頻度 (%)

(a) 843 番目アミノ酸の EYS 蛋白質-EGF ドメインにおける保存性の検討

EYS 蛋白質がもつ 18 個の EGF-like ドメインにおける G843 相当のアミノ酸部位の相同性を比較すると、EGF ドメイン 1-18 の順に、G/G/G/D/G/G/G/G/G/G/G/G/G/G/G/G/G (太字下線が G843 に相当) と、EGF-like ドメイン内において、極めて保存されたアミノ酸部位であることが確認された。EGF-like ドメインの 2 次元構造と保存されたアミノ酸配列 (黒丸) G843 相当のアミノ酸部位を矢印で示す (図 9、矢印)。

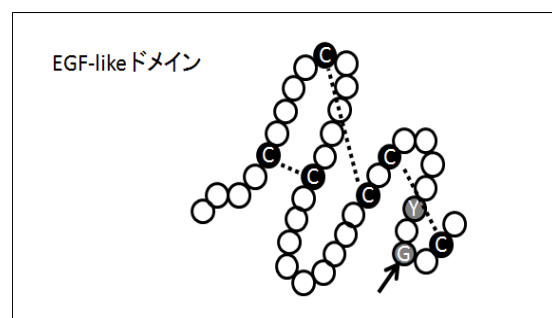


図 9. EGF-like ドメインの構造図

(b) 843 番目アミノ酸の EYS 蛋白質における生物種間での保存性

Human/Orangutan/Marmoset/Horse/Dog/Opossum/Platypus/Chicken/Zebrafish/Drosophila の順に、G843 アミノ酸に相当する部位の検討を行った。結果、G/G/G/G/G/G/G/G/A/G とほぼ生物進化上も

よく保存されたアミノ酸であることが確認された。

(c) 予測ソフトウェアツールを用いた p.G843E の病原性解析

病原性を予測する 4 種類の解析ツール SIFT, PolyPhen-2, PMut, SNAP を用いて、p.G843E 変異の病原性を予測した。すべての結果において、「病原性」との予測結果を得た (図 10)。

Computational prediction	Results
SIFT	Damaging Score 0.00 (<0.05)
PolyPhen2	Probably Damaging Score 1.00
PMut	Pathological
SNAP	Non-Neutral

図 10. 予測ソフトウェアツールを用いた p.G843E の病原性解析

(d) 家系解析における病原性の検討

ミスセンス変異 p.G843E における表現型と遺伝型の家系における分離解析を行った。代表的な家系解析の 2 例を示す (図 11)。

RP206 家系 (EYS-JM1 (p.S1653Kfs*2) と EYS-JM3 (p.G843E) の複合ヘテロ接合体、および RP134 家系 (EYS-JM2 (p.Y2935*) と EYS-JM3 (p.G843E) の複合ヘテロ接合体のいずれにおいても、罹患者と非罹患者において表現型と遺伝型の関係が矛盾なく一致することが確認された。他、7 家系の解析においても、同様に一致することから、ミスセンス変異である p.G843E の病原性を示唆する結果を得た。

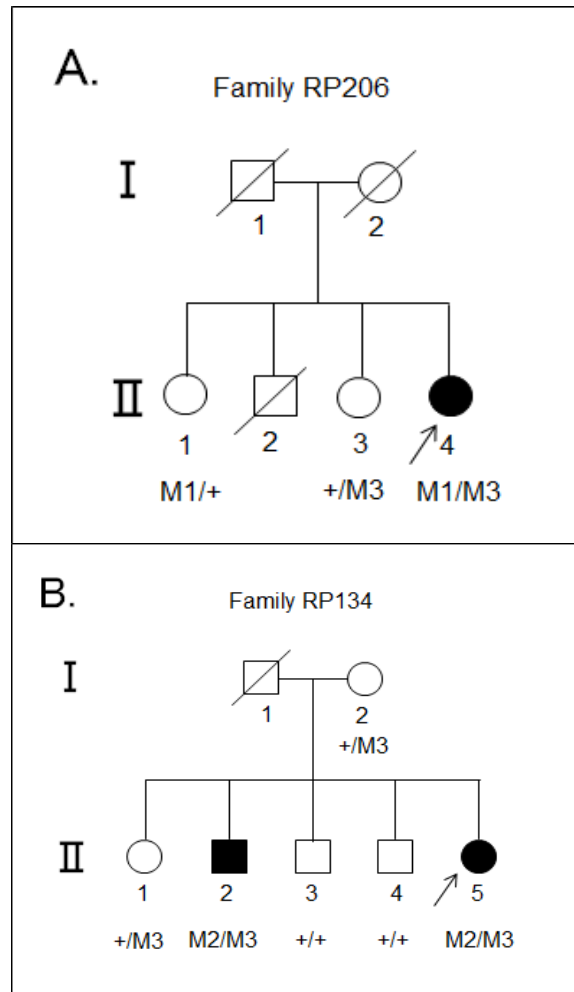


図 11 p.G843E 変異を有する家系解析

(A)RP206 家系、(B)RP134 家系

M1: 変異 p.S1653Kfs*2 (EYS-JM1),

M2: 変異 p.Y2935* (EYS-JM2)

M3: 変異 p.G843E (EYS-JM3)

男性, 女性, 罹患者男性, 罹患者女性,
矢印 () 発端者を示す。

また他の短縮型変異(p.S2428*, p.W2640*など)と複合ヘテロ接合体で同定されることもこれらを支持す結果であり、EYS-RP 患者 92 名のうち 24 家系が、短縮型変異と EYS-JM3 (p.G843E) の複合ヘテロ接合体であった。

6. EYS-JM3 (ミスセンス変異、p.G843E) における保因者率の推定

図 8 に示すように、健常者 200 名における EYS-JM3 (p.G843E) の保因者 (ヘテロ接合) は、5 名 (5/200, 2.5%) であった。つづいて、日本人の健常者のデータベース HGV より、

p.G843E(rs74419361) アレルのデータを参照すると、健常者 1134 名のうち、保因者（ヘテロ接合）は 51 名（51/1134, 4.5%）、ホモ接合は 1 名（1/1134, 0.08%）であった。これら合計を表 2 に示す。

表 2. EYS-JM3(p.G843E)の保因者数

健常者 解析	母数 (人数)	健常者(p; +) +/+	保因者 p.G843E/+	ホモ(q; p.G843E) p.G843E/p.G843E
1. 当施設	200	195	5	0
2. HGV	1134	1082	51	1
合計	1334 名	1277 名	56	1

両解析における各遺伝型の観測人数を合わせると、母数は 1334 名（200+1134）となり、保因者とホモ接合を除いた健常者(p)：保因者（ヘテロ接合）：ホモ接合（q）は、それぞれ 1277 名（1277/1334, 95.7%）：56 名（56/1334, 41.9%）：1 名（1/1334, 0.07%）となった。これら観測値にもとづき保因者率の推定をハーディ・ワインベルク平衡の仮定（方法参照）にもとづいて検討を行った（表 3）。

表 3. EYS-JM3(p.G843E)の保因者率の推定

表現型	遺伝子型	頻度	計算値
健常者(p)	+/+	0.957 (1277/1334)	0.964 (p ²)
保因者 ヘテロ接合	p.G843E/+	0.0419 (56/1334)	0.0394 (2pq)
EYS-RP(q)	p.G843E/	0.00007	0.0004 (q ²)
ホモ接合	p.G843E	(1/1334)	

Hardy-Weinberg 法則より、健常者（p）の遺伝子型頻度は 0.98、またホモ接合（q）の遺伝子型頻度は 0.02 と計算された。

結果、観測された頻度より算出される健常者（p）の遺伝子型頻度は 0.98、またホモ接合（q）の遺伝子型頻度は 0.02（RP 発症）に近似され、保因者の頻度は $2pq=2 \times 0.98 \times 0.02=0.0392=1/25.5$

と計算された。すなわち、健常者の 25～26 人に 1 人、約 4%の保因者率と推定された。また、ホモ接合（q）の遺伝子型頻度 0.02 から疾患頻度を計算すると、 $q^2=0.0004=1/2500$ 、すなわち EYS-RP は 2500 人あたりに 1 人の発症となることが推定された。

他の EYS-JM1、EYS-JM2 変異についても、HGV データを参照すると、それぞれの保因者（ヘテロ接合）の存在は、EYS-JM1（5/729）、EYS-JM2（7/730）であり、いずれもホモ変異体は認めなかった。EYS-JM3 と同様に保因者率を推定すると、ほぼ 0 と推定される結果となった。

7. 創始者変異（EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3）以外に同定された変異

arRP 患者 440 名おける EYS 遺伝子の解析結果から、EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3 を除き、複数名の患者より同定された変異を頻度順（4 番目以降）に表 4 にまとめた。これら以外に 1 個体でのみ検出された低頻度の変異は全部で 13 種類あり、すべて合わせると 21 種類の変異が同定された。これらのうち少なくとも 10 種類は未報告の新規変異であり、すべての変異が EGF 様ドメインや Laminin G ドメイン内、または coiled-coil ドメインすぐ近傍に存在した。

表 4. arRP 患者 440 名から同定された EYS 遺伝子変異

（EYS-JM1 から JM3 に続く頻度 4 番目以降の変異を示す）

No.	エクソン	塩基配列	アミノ酸変異	変異タイプ	アレル頻度
4	32	c.6557G>A	p.G2186E	Missense	12/880
5	32	c.6563T>C	p.I2188T	Missense	6/880
6	4	新規	新規	Frameshift	3/880
7	8	c.1211dupA	p.N404Kfs*3	Nonsense	2/880
8	11	新規	新規	Nonsense	2/880

8. 遺伝子変異型-表現型における臨床重症度の評価

arRP 患者 440 名おける EYS 遺伝子の解析結果から同定された 92 名の EYS-RP 患者のうち、20 歳から 80 歳の間で、2 年以上の長期経過での観察が可能であった患者 29 名の視力データをまとめた。

まず、短縮型変異（機能欠失変異体あるいはC末端欠失変異体）をホモまたは複合ヘテロ接合で2つ有する個体群（n=15, 平均観察期間8.4年±5.4年）について、その経過時の良いほうの眼における矯正視力値をプロットした（図12）。60歳代において、小数視力0.1（logMAR 1.0）程度まで低下するものが多く観察された。

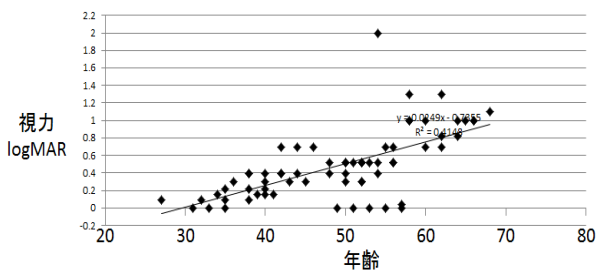


図12 短縮型変異をホモまたは複合ヘテロ接合で2つ有する個体群（n=15）

つづいて短縮型変異とミスセンス変異（異常蛋白質を生じる変異）を複合ヘテロ接合で有する個体群についても同様に解析を行った（図13）（n=14, 平均観察期間8.9年±4.4年）。これら短縮型変異とミスセンス変異の個体群においては、60歳代において小数視力0.1（logMAR1.0）まで低下するものは少なく、上記の個体群と比較して、より視力低下の進行は緩やかな傾向が観察された。

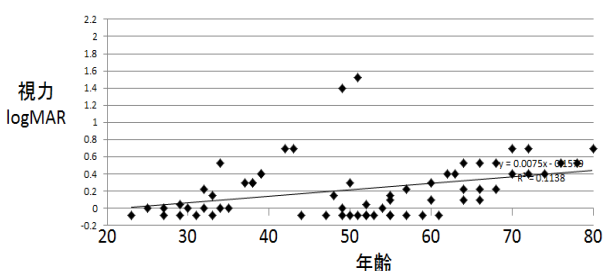


図13 短縮型変異とミスセンス変異を複合ヘテロ接合で2つ有する個体群（n=14）

E. 考察

1. EYS 遺伝子診断法の検討

arRP患者440名におけるEYS遺伝子の詳細な解析結果から、EYS遺伝子変異を有する患者は142

名、出現率は32.3%（142/440）であった。このうち、EYS-JM1、EYS-JM2、およびEYS-JM3の3つの創始者変異を有する割合は92.9%（132/142）であった。さらに、EYS-JM1、EYS-JM2、およびEYS-JM3に加えて、これらに続いて頻度の高いエクソン32の2つの変異（p.G2186E, p.I2188T）を有する患者を含めた場合、陽性が5名増えて137名、96.4%（137/142）となった。従って、EYS-JM1（エクソン26）、EYS-JM2（エクソン43）、EYS-JM3（エクソン16）、およびp.G2186E, p.I2188T（エクソン32）の変異を用いて一次スクリーニングを実施した場合、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。一方で、本解析において、このスクリーニング法によって検出が不能と判断された5名（5/142, 3.6%）については、エクソン10、35、39、40における低頻度の変異であり、全エクソンの解析を要するものが含まれていることから、この簡易的な一次スクリーニング方法はEYS-RPの患者群において、96.4%の陽性率を持つと同時に3.6%の偽陰性を持つことが示唆された。今後、これら精度の向上を可能とする詳細な検討が求められる。

EYS遺伝子変異を有する患者142名のうち、EYS遺伝子変異の両側アレルからの検出によるRPと診断に至ったEYS-RP患者は、全体（n=440）の20.9%にあたる92名であったが、これらEYS-RP患者における3つの創始者変異を有する割合は94.6%（87/92）であった。しかしながら、EYS-JM1、EYS-JM2、およびEYS-JM3のみの同定では、EYS-RP患者92名うち70名（70/92, 76.0%）の両側アレルの同定にしか至らず、加えて全エクソンにおける変異同定を行うことで、84名（84/92, 91.3%）の診断を得る結果であった。そして、残る片側アレルからのみ変異の同定された58名におけるMLPA解析により、8名（8/92, 8.7%）の欠失または重複変異を同定した。従って、片側アレルからのみ変異の同定された症例においては、13.7%（8/58）の割合で欠失または重複変異が同定されることが示唆された。従って、全43エクソンの

解析後に、片側アレルからのみの変異の検出に留まる場合において、積極的に MLPA 解析を行う必要性が示唆された。また、arRP 患者 440 名おける欠失または重複変異の頻度についても今後の検討課題となった。

また、本解析において、最終的に片側アレルからのみの変異の検出に留まった 50 名については、他の既に報告されているスプライシングバリエーション領域にも変異は認められず、今後は *EYS* 遺伝子の 5' -UTR、3' -UTR、および今回の解析対象以外のイントロン領域における変異候補の同定を進めていく必要がある。

2. *EYS*-JM3 (ミスセンス変異、p.G843E) の病原性変異としての信頼性

EYS 遺伝子変異の主要な 3 つの創始者変異の 1 つである *EYS*-JM3 を有する *EYS*-RP 患者は、*EYS*-RP 患者 92 名のうち 32 名 (32/92, 34.7%) を占め、そのうち 5 名はホモ接合変異体であった。このように *EYS*-JM3 は、*EYS* - RP の約 3 割を占める主要な変異である一方で、他の短縮型変異である *EYS*-JM1、*EYS*-JM2 とは異なるミスセンス変異 (p.G843E) であるため、この変異の病原性については慎重に判断をする必要がある。また、*EYS*-JM1、*EYS*-JM2 では、健常群 200 名においてこれら変異の検出を認めないものの、*EYS*-JM3 においては 5 名の保因者を認めた。従って、これら主要な創始者変異の中でも、最も頻度が高いことが想定され、疾患の有病率を想定する上でも鍵になるものと考えられる。

EYS-JM3 (ミスセンス変異、p.G843E) の病原性については、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て解析した変異アミノ酸部位の病原性の可能性といった *EYS* 蛋白質における構造特性において、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 家系の分離解析においても、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た。これ

らの結果は、いずれもミスセンス変異 (p.G843E) の病原性を強く支持するものであった。今後、変性視細胞モデル (分担研究 世古 参照) およびモデル動物におけるこれら変異蛋白質の生化学的な活性評価を行うことが求められる。

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 440 名のうち 132 名 (30.0%) と約 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。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 200 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 5 名から検出され、健常者の 2.5% の割合で保因者が同定された。

そこで、最近公開された日本人健常者における遺伝子データベースである HGV の各遺伝型の観測人数を合わせた母数 1334 名 (200+1134) を用いて、これら観測値にもとづき保因者率の推定をハーディ・ワインベルク平衡の仮定 (方法参照) にもとづいて検討を行った結果、健常者 (p) の遺伝子型頻度は 0.98、またホモ接合 (q) の遺伝子型頻度は 0.02 と計算された。すなわち、健常者の 25 ~ 26 人に 1 人、約 4% の保因者率と推定された。ホモ接合 (q) の遺伝子型頻度 0.02 から疾患頻度を計算すると、 $q^2 = 0.0004 = 1/2500$ 、すなわち *EYS*-RP は 2500 人あたりに 1 人の発症となることが推定された。RP の疫学においては、海外の調査にもとづいて一般に 4000 人に 1 人の発症と推定されており、

1/2500 は一般的な推計を上回る結果となった。

この推計値の信頼性については、日本人における疫学調査の裏付けが必要と考えられるが、一方で、EYS-JM3 (p.G843E) のホモ接合個体における浸透率 (penetrance)、表現度 (expressivity)、発症年齢についても詳細に解析を行う必要性がある。arRP 患者 440 名において同定されたホモ接合変異体は 5 名であったが、これら個体の臨床データを上記の視点で今後詳細に検討する必要がある。

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 (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。また、まだ解析数は少ないが、ミスセンス変異をホモまたは複合ヘテロ接合でもつ個体群についても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. *EYS* 遺伝子変異を有する患者の出現率は 32.3% (n=440) であった。*EYS* 遺伝子変異による RP 診断に至ったのは全体の 20.9% (n=440) であった。*EYS*-RP 患者における 3 つの創始者変異を有

する割合は 94.6% であった。

2. *EYS*-JM1 (エクソン 26)、*EYS*-JM2 (エクソン 43)、*EYS*-JM3 (エクソン 16)、および p.G2186E, p.I2188T (エクソン 32) の変異を用いての一次スクリーニングを検討した場合、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。この簡易的な一次スクリーニング方法は 96.4% の陽性率を持つと同時に 3.6% の偽陰性を持つことが示唆された。

3. *EYS*-JM3 (ミスセンス変異、p.G843E) の病原性について検討を行った。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* 蛋白質における構造特性において、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、これらの結果は、いずれもミスセンス変異 (p.G843E) の病原性を強く支持するものであった。

4. 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。今後これら数値の妥当性については、*EYS*-RP 患者の各遺伝型における臨床所見と遺伝疫学といった様々な角度から詳細な検証が必要と考えられた。

5. 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。

G. 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. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし。

