

201331006A

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25年度 総括研究報告書

平成26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25年度 総括研究報告書

平成26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26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	池尾一穂 三宅養三 吉村長久 角田和繁 近藤峰生 篠田 啓 國吉一樹 林 孝彰 上野真治	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 京都大学医学部眼科学教室 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觉医学講座眼科学 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觉器障害制御学	准教授 理事長 教 授 室 長 教 授 准教授 講 師 講 師 助 教
事務局	照山 遊	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（感觉器センター） 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: teruyamayu@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	業務班長

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	1
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)	2
II. 分担研究報告	7
池尾一穂 国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究センター	8
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)	11
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	15
篠田 啓 帝京大学医学部眼科学教室	19
國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室	21
林 孝彰 東京慈恵会医科大学眼科学教室	23
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	26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

I. 総括研究報告

平成25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。視機能に必要な黄斑は網膜のほぼ中央に位置し、視細胞が集中する構造となっている。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。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多数報告されるようになった。我々は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 (次世代シーケンス) と国立遺伝学研究所 (遺伝子解析) 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) を対象に全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、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の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。

本研究では多数の電気生理学的な診断を得意とする眼科医と国内最大規模の次世代シーケンサー施設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、全エクソームシーケンスによって遺伝性希少難病眼疾患の原因解明を行った。

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視機能検査を包括的に行った。本研究は参加施設の倫理委員会において承認済みであり、患者の書面による同意によって採血された。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で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た。

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を約250家系について解析した。全エクソームのキャプチャーとエクソームシーケンスは理化学研究所横浜研究所(<http://www.yokohama.riken.jp/>)において行った。また、一部は外注された。各患者エクソームにおけるシーケンスは平均100リードである。

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)

エクソーム塩基配列のレファレンス配列へのマッピングとアミノ酸配列変異の抽出、健常者での検出頻度は国立遺伝学研究所(<http://www.nig.ac.jp/>)において行った。健常者における検出頻度は1,000人ゲノムプロジェクトのデータベースに加え、日本人1,500人エクソームプロジェクトのデータベースを用いて頻度が低いものを優先的に抽出した。アミノ酸配列への影響はPolyPhen2やPROVEAN2を参考にして絞り込んだ。特に低い頻度で検出されるアミノ酸置換、タンパク質への影響の大きいアミノ酸配列のトランケーション、インサクションに着目した。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、既知遺伝子変異による発症か、未知遺伝子による発症か判断した。

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、一部の原因遺伝子についてはタンパク質の局在、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した。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した。

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)、マウス神経細胞株(RGC5)および患者iPS細胞(リンパ球由来)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した。

6) 発症機序の解明とモデル動物の作製と解析(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、原因遺伝子のノックインマウスとノックアウトカニクイザルを作製中である。モデル動物は病理学的な研究に加えて、視機能障害を改善するため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。国内民間会社との共同研究により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附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お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は黄斑ジストロフィーを含む10疾患に拡大して、約250家系（約800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。

2) エクソーム解析（古野、池尾、岩田）

平成25年度は全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。

3) タンパク質構造解析

原因遺伝子がコードするタンパク質と変異体について、コンピュータによるシミュレーションを行い、変異体の異常なタンパク質構造を一部の遺伝子変異によって明らかにした（論文投稿中）。

4) iPS細胞樹立とモデル動物の作製

若年で発症し、黄斑や網膜全体に重篤な症状が観察された一部の遺伝子変異については家系内の患者および健常者のiPS細胞を樹立し、眼杯作製を行っている。劣性遺伝形式の遺伝子変異で遺伝子がノックアウト状態になる変異についてはノックアウトカニクイザルを作製中である。

5) データベース登録と診断キットと新薬の開発

京都大学ゲノムセンターのデータベースに遺伝子変異を登録した。診断キットについては開発が順調に進んでおり、大手検査会社での導入が決定している。今年中には営業に入ると期待される。我々が検出した遺伝子変異の多くはこのキットを用いて、誰でも検査ができるようになる。ただしこのキットでは大きなデリーションやインサーションは検出されない。

D. 考察

8施設から約250家系の症例情報とDNA約800検体が収集され、エクソーム解析を行った。平成25年度は親子3名か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している（論文準備中）。

これまで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。その結果、既知遺伝子変異は17%の家系で検出され、14%の家系において既知遺伝子内に新規遺伝子変異が発見された。残りは既知遺伝子のエクソン内には遺伝子変異は無いと考えられる。

新規原因遺伝子については平成26年度も継続して機能解析が進められており、病態機序を論文として発表する予定である。

E. 結論

日本では網羅的な解析が十分に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、既知遺伝子変異の検出率は14%

であった。日本人は多数の新規遺伝子によって発症していると考えられ、東洋人を対象とした遺伝子解析が必要と考えられる。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

Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Yoshitake K, Abe K, Ikeo K, Furuno M, Tsunoda K, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Longitudinal clinical course of three Japanese patients with Leber congenital amaurosis/severe early childhood onset retinal dystrophy with *RDH12* mutation. *Documenta Ophthalmologica* 2014 in press

Katagiri S, Akahori M, Hayashi T, Yoshitake K, Gekka T, Ideo K, Tsuneoka H, Iwata T. Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the *EYS* gene. *Documenta Ophthalmologica* 2014 in press

Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Seki K, Nagasaka E, Iwata T, Mizota A. What monitor can replace cathode ray tube for visual stimulation to elicit multifocal electroretinograms? *Journal of Vision* 2014 in press

Kobayashi H, Okamoto H, Murakami A, Iwata T. Plasma Proteome Analysis On Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Pedigrees With Early Onset Drusen Formation. *Journal of Experimental Animals* 2014 in press

Ohkuma Y, Hayashi T, Sakai T, Watanabe A, Yamada H, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Noda T, Tsuneoka H. Retinal angiomatous proliferation associated with risk alleles of *ARMS2/HTRA1* gene polymorphisms in

Japanese patients. *Journal of Clinical Ophthalmology* 2014;8:143-8

Iwata T, *Animal Models for Eye Diseases, Handbook of Laboratory Animal Science III*, (Editor: Hau J and Schapiro SJ) CRC Press 2014;195-217

Katagiri S, Yoshitake K, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T. Whole-exome sequencing identifies a novel *ALMS1* mutation (p.Q2051X) in two Japanese brothers with Alstrom Syndrome. *Molecular Vision* 2013;19:2393-406

Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Shimomura Y. Two siblings with late-onset cone-rod dystrophy and no visible macular degeneration. *Journal of Clinical Ophthalmology*. 2013;7:1703-11

Nakamura N, Tsunoda K, Fujinami K, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Iwata T, Miyake Y. [Long-term observation over ten years of four cases of cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. 2013;117:629-40

Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura N, Kato Y, Noda T, Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Ozawa Y, Tsubota K, Miyake Y. Molecular characteristics of four Japanese cases with *KCNV2* retinopathy: report of novel disease-causing variants. *Molecular Vision* 2013;19:1580-90

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;22:3559-67

書籍

赤堀正和、岩田岳、黄斑ジストロフィー、特集 ゲノムと網膜関連疾患の関与を探る (編

集：山城健児）、RETINA Medicine、先端医学社 2014;3:33-37

3 その他 無し

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 - (編集：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 (編集：本庶佑)、Medical Science Digest、ニューサイエンス社 2013;39:2-4

岩田岳、緑内障の遺伝子とその機能解析、緑内障の病態と疫学、高齢者の視覚障害とそのケア (編集：小口芳久)、公益財団法人長寿科学振興財団、2013;107-118

学会発表

Daisuke Iejima; Toru Noda; Atsushi Mizota; Takeshi Iwata. Characterization of HtrA1 Promoter in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration, ARVO 2013 Seattle WA USA

Yuriko Minegishi; Takeshi Iwata Distinct protein complex formation evokes insolubility of OPTN and mislocalization in iPSC-derived neural cells from E50K-POAG patients. ARVO 2013 Seattle WA USA

Yu Kato; Kaoru Fujinami; Natsuko Nakamura; Masakazu Akahori; Takeshi Iwata; Kazushige Tsunoda. Clinical and Molecular Findings in Japanese Cases with *KCNV2*-retinopathy: Report of Novel Variants. 2013 ARVO Seattle WA USA

8 知的所有権の出願・取得状況

1 特許取得 無し

2 実用新案登録 無し

II. 分担研究報告

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

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

眼科疾患の計390検体を対象に全Exomeシーケンスを行い、標準となっているヒトゲノムとの変異を網羅的に抽出する。抽出された変異は、劣性遺伝形式、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 Agilent SureSelect Human All Exon V4+UTRs によって Exome キャ

プチャを行い、Illumina HiSeq2000 を用いてシーケンスを行った。シーケンスデータから SNV, INDEL 抽出までの一連の解析は Broad Institute の定めた Best Practices Workflow に従い、BWA, Picard, Genome Analysis Toolkit を用いて解析を行った。

今年度は前年度の解析結果を受け、遺伝病の候補変異を絞り込みやすい劣性遺伝形式の家系を中心に解析を行った。劣性遺伝形式が疑われる家系の場合は、基本的には罹患者本人とその両親の3人をセットでシーケンスを行い、罹患者の兄弟姉妹の採血が可能な場合には、兄弟姉妹も含めてシーケンスを行った。その結果、今年度は新しく39家系142検体についてシーケンスを行い、データ解析を行った。優性遺伝形式の原因遺伝子探索は、親子3名程度を用いた全 Exome シーケンスでは、候補変異の絞り込みが通常困難になるため、調査した割合的には少なく、7家系8検体のみである。

昨年度までにシーケンスした家系とあわせると、合計187家系390検体のシーケンスを行ったことになる。

今年度行った解析フローの変更点として、The Human Genetic Variation Database

(HGVD) のデータを用いることで、1000 ゲノムデータベースを用いても除去できなかった日本人特有の変異を効率的に除去することが可能となり、候補数を 15%減少させることができた点が挙げられる。

上記の HGVD も含めた変異解析のフローに関しては、全て国立遺伝学研究所で開発中の次世代シーケンサー解析プラットフォームである Maser というシステムにパイプラインとして登録済みである。そのため、他機関の研究者も Maser を用いることで、同様の解析を自動で行うことが可能となっている。

また、今年度は全 Exome シーケンスから解析可能な構造多型についても調査を行った。コピー数変異多型 (CNV) に関しては、XHMM というツールを用いて解析を行った。さらに、大規模な挿入、欠損変異や、逆位、重複に関して Pindel というツールを用いて優性遺伝形式が疑われる家系を中心に解析した。しかし、検出された CNV は抗体の可変領域など、人が本来多コピー持っている遺伝子であり、疾患と結びつくような構造多型は今のところ見つかっていない。

D. 考察

Exome シーケンスデータから CNV を探索したが、疾患の候補となる CNV は検出されなかった。そもそも、がん細胞では CNV が多数報告されている一方で、遺伝病では CNV の寄与がどの程度あるのか未だ不明であり、本来 CNV が存在しない可能性も十分にあり得る。さらに Exome シーケンスを行う際には、Exon 領域の濃縮が必要となり、SureSelect による各 Exon 領域の

キャプチャ効率のばらつきも問題であった。

以上のキャプチャ効率の問題点は、今後解析手法が全 Exome シーケンスから全ゲノムシーケンスへと移行するにしたがって解決されると期待される。また、CNV 以外の構造多型についても、全ゲノムシーケンスを行うことでイントロン領域の構造多型も検出できるようになるため、検出感度が高まることが期待される。

E. 結論

眼科疾患の検体計 390 検体 (187 家系) について全 Exome シーケンスを実施した。その中の 11 家系については既知遺伝子中の新規変異として論文を作成し、既に 1 報は出版済みである。今後は、病気の原因であるかどうかの検証が難しい新規遺伝子新規変異について、十分な検証を行い、インパクトの高い発見に繋がればと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1: Mol Vis. 2013 Nov 24;19:2393-406.

Whole-exome sequencing identifies a novel ALMS1 mutation (p.Q2051X) in two Japanese brothers with Alström syndrome.

Katagiri S, Yoshitake K, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T.

2: Doc Ophthalmol. 2014 Mar 21.

Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the EYS gene.

Katagiri S, Akahori M, Hayashi T, Yoshitake K, Gekka T, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T.

2. 学会発表

2013年分子生物学会 P1-1044

De novo assembly pipeline development on NGS analysis platform, Maser

Kazutoshi Yoshitake, Nobuyuki Fujii, Norikatsu Monma, Kazuho Ikeo

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

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

なし

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研究部長

研究要旨：平成 25 年度は、これまでより継続してオカルト黄斑ジストロフィーの疾患原因と遺伝子異常との関係について探求した。検体は、当院を含む 7 施設より集められたものである。また、平成 25 年度の研究においては、特にスターガルト病、錐体・杆体ジストロフィー等の、黄斑ジストロフィーの形態をとる疾患群について、集中して臨床型—遺伝子型の関係について調査を行った。

上記疾患を発症した患者について家族歴を詳細に調査するとともに、視力、視野等の自覚的検査、および、蛍光眼底造影、網膜電図、眼底自発蛍光、光断層干渉計等の他覚的検査を行い、DNA 採血を行った。

オカルト黄斑ジストロフィーについては、RP1L1 遺伝子に、これまでの報告に見られないミスセンス変異が 5 検体より複数個見つかかり、現在論文投稿準備中である。臨床型は、これまでに RP1L1 変異症例として特徴的とされた視細胞変性を伴うものも、それとは異なる形態異常を示すものも含まれていた。

スターガルト病については、特に ABCA4 遺伝子異常との関係が注目されている特殊な黄斑病変、「Foveal Sparing; 中心窩回避」を示す症例を 12 例集積した。現在、エクソーム解析を依頼中であり、結果により、本病態と原因遺伝子との関係が明らかになると思われる。

また、眼底所見が比較的軽微な錐体杆体ジストロフィー 22 検体について、エクソーム解析を行ったところ、これまでも報告されている原因遺伝子である、RPGR、GUCY2D、KCNV2 などが原因として同定され、その中に複数の新規変異が含まれていた。現在新たに症例を加えて解析中であり、この疾患群に関連する遺伝子の全容が、今後明らかになることが期待される。

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が多く、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—遺伝子型の間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。

特に平成 25 年度の研究においては、スターガルト病、錐体・杆体ジストロフィー等の、黄斑ジストロフィーの形態をとる疾患群について、集中して臨床型—遺伝子型の関係について調査を行った。

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

家族歴が明らかでないオカルト黄斑ジストロフィー 29 例について、罹患者の DNA より次世代シーケンサーを用いて RP1L1 遺伝子の検索を行った。その結果、すでに報告されている p.R45W および p.S1199C の変異が 8 症例に見られたほか、これまでに報告のない新規変異が 5 症例より見出された。これについては、現在、論文投稿準備中である。それ以外の症例については、RP1L1 遺伝子に疾患に関与すると思われる変異は見られなかった。変異の見られない症例の臨床型は、これまでに RP1L1 変異症例として特徴的とされた視

細胞変性を伴うものも、それとは異なる形態異常を示すものも含まれていた。

黄斑ジストロフィーのなかで、中心窩に眼底自発蛍光での異常が回避されており、中心視力が温存されている 12 症例 (Foveal Sparing) について、詳細な電気生理学的検査を行うとともに、DNA 採血を行った。現在、エクソーム解析が進行中である。特に本病態と ABCA4 遺伝子異常との関係が注目されているが、これまでに APEX による解析ではほとんどの症例で ABCA4 遺伝子に異常が見つかっておらず、新たな病態の解明が期待される。

また、眼底所見が比較的軽微な錐体杆体ジストロフィー 22 検体について、エクソーム解析を行ったところ、これまでも報告されている原因遺伝子である、RPGR、GUCY2D、KCNV2 などが原因として同定され、その中に複数の新規変異が含まれていた。さらに、複数の家系において過去に報告のない遺伝子が原因として示唆されているが、確定のためには更なる家族内の確認が必要である。

E. 結論

オカルト黄斑ジストロフィーについては、新規の変異を含めて RPIL1 遺伝子に異常の見られるケースが 13 例あったが、半数以上の 16 例では同遺伝子に変異が認められなかった。これらはいずれも家族歴が明らかでない症例であり、オカルト黄斑ジストロフィーの原因として、他の遺伝子による劣性遺伝形式の病態、および遺伝的な原因とは異なる病態が含まれている可能性が示唆された。

中心窩回避を伴う黄斑ジストロフィーについては、晩期発症で視力が比較的温存される特殊な病態であり、その原因は確定されていない。これまでにスターガルト病に関連する ABCA4 遺伝子の関与が指摘されているが、当院のこれまでの調査により、他にも原因となりうる複数の遺伝子が推定されている。

眼底所見の軽微な錐体・杆体ジストロフィーについては、一般眼科診療での診断が非常に難しく、遺伝学的な病因検索がとくに重要な疾患である。これまでのエクソーム解析では、過去に報告されている複数の原因遺伝子が原因として同定されている (論文準備中)。ただし、まだ確定が完了していないものの、これまでに報告されていない遺伝子の関与が疑われる家系も複数見つかっている。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が

高い。また、これらの調査により、不確定であった錐体杆体ジストロフィーの疾患概念が再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

Yamazaki R, Tsunoda K, Fujinami K, Noda T, Tsubota K. Fundus autofluorescence imaging in patient with juvenile form of galactosialidosis. *Ophthalmic Surgery Lasers & Imaging Retina*. (in press)

Fujinami K, Lois N, Mukherjee R, MacBain VA, Tsunoda K, Tsubota K, Stone EM, Fitzke FW, Bunce C, Moore AT, Webster AR, Michaelides M. A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Quantitative Assessment of Fundus Autofluorescence, Progression and Genotype Correlations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Dec; 54(13): 8181-90

Fujinami K, Sergouniotis PI, Davidson AE, Mackay DS, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, Webster AR. The Clinical Effect of Homozygous ABCA4 Alleles in 18 Patients. *Ophthalmology*. 2013 Nov; 120(11): 2324-31

Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Webster AR, Moore AT, Allikmets R, Michaelides M. ABCA4 Gene Screening by Next-Generation Sequencing in a British Cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Oct; 54(10): 6662-74

Fujinami K, Sergouniotis PI, Davidson AE, Wright G, Chana RK, Tsunoda K, Tsubota K, Egan CA, Robson AG, Moore AT, Holder GE, Michaelides M, Webster AR. Clinical and molecular analysis of Stargardt disease with preserved foveal structure and function. *Am J Ophthalmol*. 2013 Sep; 156(3): 487-501

Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Shimomura Y. Two siblings with late-onset cone-rod dystrophy and no visible macular degeneration. *Clinical Ophthalmology*. 2013 Aug; 7:1703-1711

Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura N, Kato Y, Noda T,

Shinoda K, Tomita K, Hatase T, Usui T, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Ozawa Y, Tsubota K, Miyake Y. Molecular characteristics of four Japanese cases with KCNV2 retinopathy: report of novel disease-causing variants. *Mol Vis*. 2013 Jul ; 20(19):1580-90.

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 Jun; 155(6): 1075-88

角田和繁. 弱視との鑑別に OCT オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) の OCT 所見. 臨床眼科、(印刷中)

角田和繁、藤波芳. 黄斑ジストロフィーと自発蛍光. 眼科. 55(9):1003-8, 2013.9.18

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. 10年以上の長期観察を行った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. 日本眼科学会誌. 117(8):629-640, 2013.8

2. 学会発表

平成 25 年 10 月 14 日

Goto S, Fujinami K, Akahori M., Iwata T, Noda T, Miyake Y, Tsunoda K. Clinical and Molecular Analysis of Macular Dystrophy with Preserved Foveal Structure and Function. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 51th Symposium, Chongqing, China

平成 25 年 10 月 14 日

Fujinami K, Sergouniotis PI, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG, Moore AT, Michaelides M, Webster AR, Holder GE. Clinical and Molecular Analysis of Stargardt Disease with Preserved Foveal Structure and Function. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV), 51th Symposium, Chongqing, China

平成 25 年 5 月 6 日

Kato Y, Fujinami K, Nakamura N, Akahori M, Iwata T, Tsunoda K. Clinical and Molecular Findings in Japanese Cases with *KCNV2*-retinopathy: Report of Novel Variants. ARVO annual meeting 2013, Seattle,

Washington, USA

平成 25 年 5 月 5 日

Fujinami K, Lois N, Mukherjee R, McBain VA, Tsunoda K, Tsubota K, Fitzke FW, Bunce C, Moore AT, Webster AR, Michaelides M. A Longitudinal Study of Stargardt Disease: Quantitative Assessment of Fundus Autofluorescence, Progression and Genotype Correlations. ARVO annual meeting 2013, Seattle, Washington, USA

平成 25 年 11 月 2 日

山崎梨沙、藤波芳、野田徹、角田和繁. 眼底自発蛍光において黄斑部に著明な過蛍光を認めたガラクトシアリドーシスの1例. 第67回日本臨床眼科学会、横浜

平成 25 年 10 月 5 日

中村奈津子、藤波芳、野田徹、松永達雄、加我君孝、林孝彰、角田和繁. Auditory neuropathy を伴う常染色体優性視神経萎縮症の1例. 第61回日本臨床視覚電気生理学学会、大阪

平成 25 年 10 月 5 日

加藤悠、藤波芳、野田徹、赤堀正和、岩田岳、三宅養三、角田和繁. 硝子体牽引にともない中心窩に局所的網膜剥離を来したオカルト黄斑ジストロフィーの1例. 第61回日本臨床視覚電気生理学学会、大阪

平成 25 年 10 月 5 日

中西絢美、上野真治、川野健一、伊藤逸毅、角田和繁、赤堀正和、岩田岳、寺崎浩子. オカルト黄斑ジストロフィーの補償光学眼底カメラによる解析. 第61回日本臨床視覚電気生理学学会、大阪

平成 25 年 4 月 5 日

角田和繁. シンポジウム〈網膜機能のイメージング〉. 光を用いた網膜機能のイメージング. 第117回日本眼科学会総会、東京

平成 25 年 4 月 4 日

加藤悠、角田和繁、藤波芳、小口芳久. 金屏風様反射領域と低反射領域の混在する小口病眼底の詳細な観察. 第117回日本眼科学会総会、東京

平成 25 年 7 月 6 日

角田和繁. 眼底所見の乏しい遺伝性網膜疾患. 第13回北海道眼科ワークショップ、札幌

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

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等分野の医療の実用化研究事業)

平成 25 年度 分担研究報告書

次世代シークエ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

「次世代シークエンサーを用いたエクソーム配列解析を行う遺伝性網膜疾患の診断に
有用な、散瞳不要フリッカ ERG の有用性」

研究分担者 近藤峰生 三重大学大学院医学系研究科眼科学講座

研究要旨: 次世代シークエンサーを用いたエクソーム配列解析を行う遺伝性網膜疾患の診断に有用な、散瞳不要フリッカ網膜電図 (ERG) の有用性について検討した。これまでの ERG は、眼球に直接電極が接触するというだけではなく、検査終了後に散瞳状態が 6 時間程度継続することから、患者にとって不快感を伴う検査であった。そのような欠点を改善する目的で、最近になり米国の LKC 社から新しい網膜電図の装置 RETeval という装置が開発され、本邦でも医療装置として承認された。この装置には瞳孔面積測定装置が内蔵されており、瞳孔径に応じて一定量の光刺激が入るように設定されているため、散瞳を必要としない。また眼瞼の下に 1 枚の粘着シールを張るのみ (つまり皮膚電極) で電極装着が完了するため侵襲性が低く検査は準備開始から 3 分以内に終了するため、患者に対する負担も少ない。RETeval は網膜疾患患者におけるマススクリーニングとして使用されることが今後期待されている。今回我々はあたらしい網膜電図装置 RETeval の機能評価を目的とする研究を行ったので報告する。

A. 研究目的

次世代シークエンサーを用いたエクソーム配列解析を行う遺伝性網膜疾患網膜疾患患者を診断するためには、眼底検査、蛍光眼底検査、光干渉断層計、眼底自発蛍光などの検査の他に、網膜電図 (ERG) による機能評価が必要である。しかしながら、これまでの ERG は 20 分程度の暗順応後にコンタクトレンズ型電極を角膜上に接触させなければならず、時間がかかる上に被験者にとっても快適な検査とはいえなかった。これに対して、昨年米国の LKC 社より暗順応なしに簡単に記録できる ERG 装置が発売された。この装置は RETeval と呼ばれ、1 枚の皮膚電極を下眼瞼に貼るのみで、暗順応

なしで 10 秒程度の検査時間でフリッカ ERG が記録できる。さらにこの装置では散瞳の必要がない。検査中に瞳孔の大きさを常に計測し、瞳孔面積に応じて刺激光量を調節して一定の光量が眼内に入るように調整されているからである。しかし、この装置において同一被験者において実際に瞳孔面積が変化しても本当に同じ ERG 波形が得られるかどうかについては未だ検証がない。そこで今回我々は、瞳孔の大きさを点眼薬で変化させながら RETeval でフリッカ ERG を連続的に記録した。

B. 研究方法

対象は全身疾患や病的近視がない被験者。

結果の再現性を検討するため、被験者 5 人に対し 5 日間連続で毎日同じ時間帯にフリッカ ERG を測定した。また結果の信頼性を検証するため、右眼を散瞳剤（ミドリン® P, 参天製薬）で瞳孔面積を変化させながら RETeval でフリッカ ERG を測定した。散瞳剤点眼前と散瞳剤点眼後 3 分おきに 21 分まで網膜電図及び瞳孔面積測定をそれぞれ RETeval™、OPD ScanIII™ により施行した。左眼は無散瞳で右眼と同じように 21 分まで網膜電図及び瞳孔面積測定を RETeval™、OPD ScanIII™ により施行した。瞳孔径と振幅及び潜時との相関については二元配置分散分析と Bonferroni 型多重比較を用いて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究施行にあたり、研究計画を当院倫理委員会に提出し承認を得た。

C. 研究結果

RETeval を用いて 5 日間連続でフリッカ ERG を測定したが、振幅、潜時ともに良好な再現性が得られた。

* P<0.05

次に、散瞳薬を点眼したあとの RETeval の波形を解析した。まず瞳孔面積に関しては、右眼の瞳孔面積は 12 分から 21 分にかけて有意に増大し、左眼は 18 分から 21 分にかけて有意に縮小した（図 1）。振幅は瞳孔面積の変化に伴い小さくなる傾向にあったが、有意差は認められなかった（図 2）。潜時は右眼の瞳孔面積の増大に伴い 12 分から 21 分にかけて有意に延長した。左眼では 6 分から 21 分にかけて潜時が有意に短縮した（図 3）。

両眼の瞳孔面積と潜時について回帰分析を行ったところ、正の相関関係が認めら

れ、瞳孔面積が 1mm 大きくなると潜時が約 0.05msec 延長する傾向があることがわかった（図 4）。

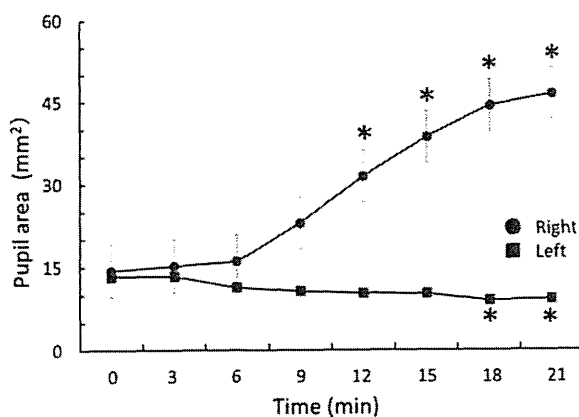


図 1 右眼及び左眼の瞳孔面積の変化

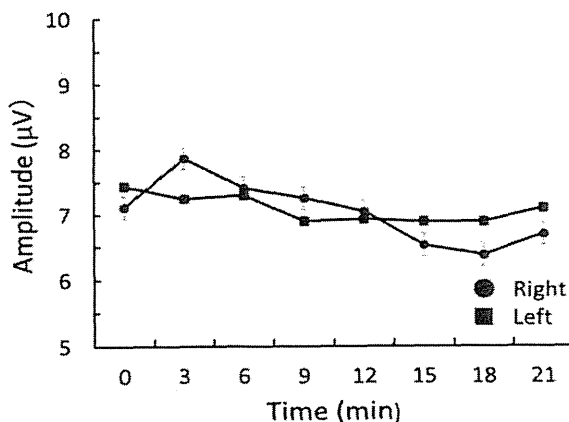


図 2 振幅の経時的変化

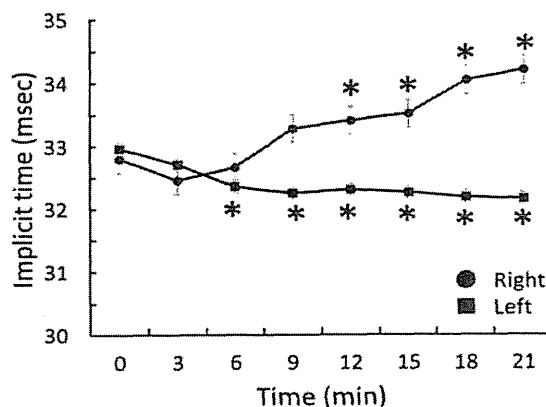


図 3 潜時の経時的変化