

(887 ギガベース)、1 検体あたり約 93 億塩基 (9.3 ギガベース) のデータを得た。ターゲットとなるエクソン領域の大きさ (約 71 メガベース) に対して、1 検体あたり 130 倍以上に相当する塩基配列データを得ることができた。解析された配列データのうち、約 89% の塩基において Q30 以上の品質を示した。

疾患の原因変異を同定する情報解析を行うため、これらの塩基配列データを東京医療センターおよび遺伝学研究所に供した。

#### D. 考察

当研究により解析された DNA は合計 138 検体分、算出された塩基配列データは 1 検体あたりで平均約 82 億塩基 (8.2 ギガベース)、全検体では合計 1 兆 1320 億塩基 (1.132 テラベース) であった。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) と比べて高い品質を示した。当研究における解析の結果、エクソーム領域を高い重複率でカバーする高品質な塩基配列データを得ることができたといえる。

#### E. 結論

黄斑ジストロフィーおよび関連する遺伝性網膜関連疾患の家系より採取された DNA 検体、合計 138 検体についてエクソーム濃縮ライブラリーを作製し、次世代シーケンサーによる塩基配列解析を実施した。解析の結果、遺伝性網膜関連疾患家系における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算出することに成功した。

#### 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

英文雑誌 :

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 Alström syndrome. *Molecular Vision* 2013; 19 : 2393-2406

邦文雑誌 :

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疾患の原因遺伝子探索、エクソーム解析 - 成果と将来 -, 医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社 2013; 245:401-407

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

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：本研究において当研究室では、様々な遺伝性網膜疾患患者の臨床診断を行い、その DNA 解析データから疾患表現型と遺伝子型の関係を明確するという研究を行った。

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、その他先天性停止性夜盲等、多岐にわたる。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。

これまでに合計 173 名の患者から DNA 検体が得られた。そのうち 68 症例でエクソームによる解析が終了し、約半数の症例において疾患原因遺伝子の絞り込みを行った。

#### 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；OCT）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

##### 1) オカルト黄斑ジストロフィー

新潟における大家系を除く、22 症例において検

査を行い、これまでに 20 症例において DNA 解析が終了している。その結果、14 例に RP1L1 遺伝子変異が見られ、そのうち家族例は 3 家系含まれていた。このなかには、新規の変異が 4 つ含まれていた。残りの 6 症例については、RP1L1 遺伝子変異がみられなかった。

RP1L1 遺伝子に変異が見られた 14 症例は、いずれも OCT 画像に過去に報告したものと同様の特徴が見られた (Tsunoda, Retina 2011)。すなわち、黄斑部に限局した錐体視細胞外節先端部ライン (COST ライン) の消失、視細胞内節 ellipsoid ライン (ISe ライン) の不明瞭化などである。一方、変異のない 6 例中 4 例は孤発例で、2 例は劣性遺伝を示唆する家系であった。それらの OCT 画像では、全例において上記と全く異なる所見を示していた。すなわち、ISe ラインが正常であったり、経過が短いにも関わらず視細胞層が完全に消失しているなどである。オカルト黄斑ジストロフィーの発症には、これまでに報告された RP1L1 遺伝子の関与以外に、AR 遺伝子の関与や非遺伝性の病態が含まれていると考えられた。

2) 眼底変化に乏しい錐体・杆体ジストロフィー  
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。

### 3) 中心窩回避を伴う黄斑ジストロフィー

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、全症例でエクソーム解析が行われているところである。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。

### 4) 網膜色素変性

これまでに、優性遺伝、劣性遺伝形式を含め、20 例の症例が登録され、このうち6例でエクソーム解析が終了している。これらのデータは、共同研究者すべてのデータの一部として共有され、網膜色素変性の原因遺伝の頻度分類に活用された。

ただし、おもに優性遺伝家系においては疾患原因が特定できていない症例が多く、原因確定のための家系内が進行中である。

### 5) 先天性停止性夜盲症

これまでに8例の症例が登録され、そのうち4例でシークエンスが終了した。

シークエンスの結果、1家系から、これまでに報告された *GRM6*, *TRPM1*, *NYX*, *CACNA1F*, *CABP4* とは異なる遺伝子と疾患との関与が疑われた。現在、さらに症例を追加して新規疾患原因遺伝子について調査中である。

## E. 結論

これまでに登録した173名の患者のうち、68症例においてエクソームによる解析が終了した。このうち約半数の症例において疾患の原因と考えられる遺伝子変異の絞り込みが可能であった。

これらの一部については、これまでの臨床的・遺伝学的知見と合致するものであり、主に新規変異についての報告を行った。また、一部にはこれまでにない (眼科疾患関連遺伝子と想定されていない) 遺伝子の関与が疑われる家系が含まれていた。今後、さらに症例数を増やし、遺伝子の機能解析を行うことによって、これまでに報告の無い疾患遺伝子の関与が証明できる可能性が高くなった。

## 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

(平成25年度)

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 sibs with late-onset cone-rod dystrophy and no visible macular degeneration. *Clinical Ophthalmology*. 2013 Aug; 7:1703-11

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 (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. 日本眼科学会会誌. 117(8):629-40, 2013.8

(平成24年度)

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; 131(2): 172-7

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 family with mutation of RP1L1 gene. *Retina*. 2012 Jun;32(6):1135-47.

角田和繁. 三宅病の現状と展望. 日本臨床. 2013 ; 71(2):355-64

(H 平成23年度)

Fujinami K, Tsunoda K, Nakamura M, Oguchi Y, Miyake Y. Oguchi's Disease with Unusual Findings Associated with a Heterozygous Mutation in *SAG* Gene. *Arch. Ophthalmol*. 2011 Aug; 129(10): 1375-6

Fujinami K, Akahori M, Fukui M, Tsunoda K, Iwata T, Miyake Y. Stargardt Disease with Preserved Vision: identification of a novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene. *Acta Ophthalmologica*, 2011

May;89(3):e297-8

Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, Shinoda K, Ohde H, Miyake Y. Fundus Autofluorescence in Autosomal Dominant Occult Macular Dystrophy. *Arch. Ophthalmol*. 2011 May; 129 (5):579-602

角田和繁. オカルト黄斑ジストロフィー: 三宅病. あたらしい眼科. 2011 ; 28(7): 953-61

2. 学会発表

(平成25年度)

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

(平成 24 年度)

平成 24 年 6 月 7 日

Tanaka H, Tsunoda K, Fujinami K, Kubono H, Shinoda K, Akahori M, Iwata T, 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

平成 24 年 6 月 7 日

Nakamura N, Tsunoda K, Fujinami K, Shinoda K, Akahori M, Iwata T, Tomita K, Hatase T, Usui T, 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

平成 24 年 10 月 5 日

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

平成 24 年 10 月 5 日

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

平成 24 年 8 月 10 日

角田和繁. 網膜ジストロフィー診断のコツ. 第 11 回信濃町網膜研究会

平成 24 年 6 月 4 日

角田和繁. シンポジウム 11 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

平成 24 年 5 月 19 日

角田和繁. 眼底所見の乏しい遺伝性網膜疾患. 第 45 回日本眼科講習会 (東京ブロック講習会)

(平成 23 年度)

平成 23 年 11 月 19 日

Tsunoda K. Symposium, 'Genetics and retinal dystrophy' *RP1L1* gene mutations in Occult Macular Dystrophy (Miyake's Disease). The 2nd JSCEV-KSCEV Joint Meeting, Seoul, South Korea

平成 23 年 5 月 5 日

Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y, Tsuji S, Usui T, Nakamura M, Ohde H, Itabashi T, Iwata T. Dominant Mutations In *RP1L1* Are Responsible For Occult Macular Dystrophy. ARVO annual meeting 2011, Fort Lauderdale, Florida, USA

平成 23 年 5 月 2 日

Tsunoda K, Hatase T, Usui T, Fujinami K, Miyake Y. Optical Coherent Tomography (OCT) Findings In Occult Macular Dystrophy (OMD) With *RP1L1* Mutation. ARVO annual meeting 2011, Fort Lauderdale, Florida, USA

平成 23 年 10 月 7 日

中村奈津子、角田和繁、田中宏樹、福島梨紗、窪野裕久、藤波芳、篠田啓、富田香、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姉弟例の OCT 所見. 第 65 回日本臨床眼科学会、東京

平成 23 年 9 月 4 日

角田和繁. シンポジウム 6 「OCT は既存の検査機器を超えたか?. OCT vs 網膜電図 (OCT による黄斑ジストロフィーの診断). 第 47 回日本眼光学学会総会、東京

平成 23 年 7 月 1 日

角田和繁. オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) - 最新の知見 -. 第 9 回信濃町網膜研究会、東京

平成 26 年 6 月 10 日

角田和繁. オカルト黄斑ジストロフィー (三宅病) - 最新の知見 -. 第 15 回近畿眼科先進医療研究会 近畿大学、大阪

平成 23 年 5 月 13 日

赤堀正和、角田和繁、三宅養三、福田陽子、石浦浩之、辻省次、白井知聡、畑瀬哲尚、中村誠、大出尚郎、板橋剛、岡本はる、岩田岳. オカルト黄斑ジストロフィー (Occult Macular Dystrophy) の原因遺伝子解明. 第 115 回日本眼科学会総会、東京

## 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 23～25 年度 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

「遺伝性網膜変性における網膜電図の変化についての研究」

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: 遺伝性網膜疾患の代表的な疾患である、網膜色素変性における網膜電図 (ERG) の変化における詳細な研究は少ない。我々は今回、我々が作製した網膜色素変性モデルウサギであるロドプシン P347L transgenic (Tg) ウサギと野生型 (WT) のウサギの硝子体内に薬物を注射し、錐体 ERG の a 波における視細胞応答を取り出して比較検討した。その結果、Tg では WT に比べて錐体 ERG の a 波中の視細胞の割合が減り、OFF 型双極細胞の割合が増えていた。錐体 ERG の国際記録条件に相当する光刺激において、a 波中の視細胞成分は WT では 66%であったが、Tg では僅か 34%であった。また、視細胞変性初期の Tg において、弱い光刺激に対する OFF 型双極細胞由来成分そのものが WT より増大し、感度が上昇している可能性が示唆された。今回の結果により、網膜色素変性では a 波が見かけ上保たれていても OFF 型双極細胞成分が半分以上を占めており、視細胞の機能が残っていると解釈してはいけないことが今回の実験で判明した。

#### A. 研究目的

遺伝性網膜疾患の代表的な疾患である、網膜色素変性における網膜電図 (ERG) の変化における詳細な研究はそれほど多くない。

明順応状態で記録した錐体 ERG の a 波の起源は錐体視細胞であると古くから信じられてきたが、1994 年の Bush らの研究により、霊長類の錐体 ERG の a 波には錐体視細胞だけでなく OFF 型双極細胞や水平細胞などの視細胞以降の成分が関与していることが示された。

しかし、彼らの研究は正常眼における結果であり、実際に網膜色素変性 (retinitis pigmentosa: RP) などの視細胞変性疾患において錐体 ERG の a 波に対する視細胞と

視細胞以降成分の関与がどのように変化するのはこれまで明らかにされていない。

我々は、2009 年に RP の原因遺伝子の 1 つであるロドプシン遺伝子を変異させた P347L トランスジェニック (Tg) ウサギの作製に成功し、この動物が実際の患者と同様に進行性の視細胞変性をおこすことを確認した。

そこで、本研究では野生型 (WT) と Tg ウサギの錐体 ERG の a 波の細胞起源を薬物によるシナプス遮断により調べ、Tg ウサギの錐体 ERG に占める視細胞および視細胞以降成分の関与の割合を研究した。

#### B. 研究方法

4 か月および 12 か月齢の WT および Tg

ウサギ各 5 例ケタミンとキシラジンにて全身麻酔し、明順応後にドーム型光刺激装置を用いて白色背景光下 (3.3 log scot td.) に 5 段階 (0.2-2.2 log cd·s/m<sup>2</sup>) のフラッシュ光で網膜を刺激して錐体 ERG を記録した。2-Amino-4-phosphonobutyric acid (APB) と 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3(1H, 4H)-dione (CNQX) の硝子体内注射により、視細胞から ON 型双極細胞の伝達と OFF 型双極細胞及び水平細胞への伝達をそれぞれ遮断した。a 波振幅の測定方法は、薬物注射前では基線から陰性頂点までとし、薬物注射後では基線から投与前の頂点潜時における陰性点までとした (図 1)。

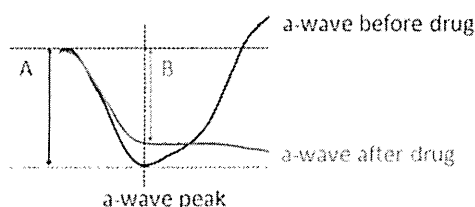


図 1: 薬物投与前後の a 波振幅測定法

a 波中の錐体視細胞の割合は以下の式で計算した。(薬物注射後の a 波振幅) / (薬物注射前の a 波振幅) × 100。

a 波振幅と潜時について、分散分析後に Student-t test を行った (有意水準  $P < 0.05$ )。

### C. 研究結果

4 か月齢および 12 か月齢の Tg ウサギの錐体 ERG の a 振幅は WT より有意に小さく、Tg の錐体 ERG の a 波振幅は加齢により減弱した。4 か月齢の錐体 ERG の潜時は Tg と WT とで差はなかったが、12 か月齢では Tg の潜時が延長していた。

次に、4 か月齢の WT と Tg の錐体 ERG の a 波に対する APB と CNQX の単独の作

用を検討した。Tg と WT の a 波振幅は APB 注射前後では殆ど変化しなかったが、CNQX 注射後には著明に減少した (図 2)。

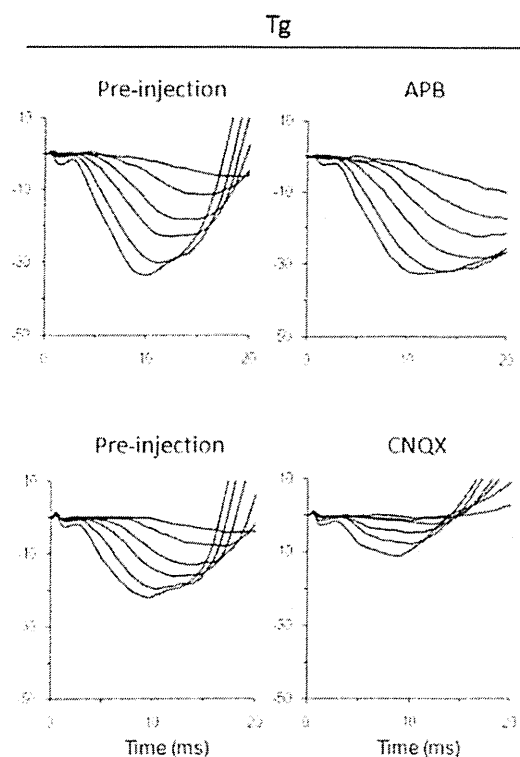


図 2: Tg ウサギの ERG a 波の薬物作用

WT と Tg の錐体 ERG の a 波振幅は、APB + CNQX の注射後に全刺激強度で減少した (図 3)。

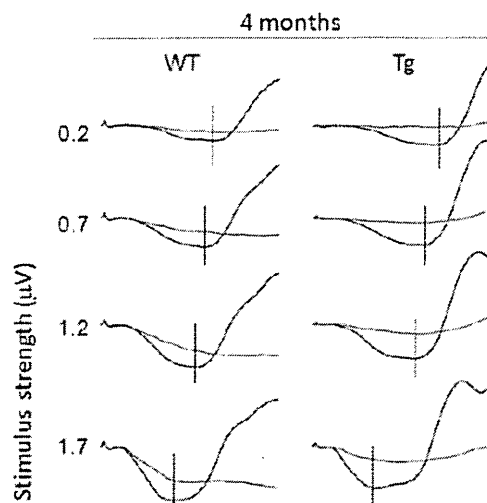




図 3: APB+CNQX 後の ERG a 波の変化

注射前の a 波振幅に対する薬物注射後の a 波振幅の割合（即ち a 波に占める錐体視細胞成分の割合）は、刺激強度によって増加する傾向がみられ、4 か月齢の WT では 54%~75%であったが、Tg では 32%~51%と有意に低かった(図 4)。12 か月齢のウサギでも同様の傾向がみられた。

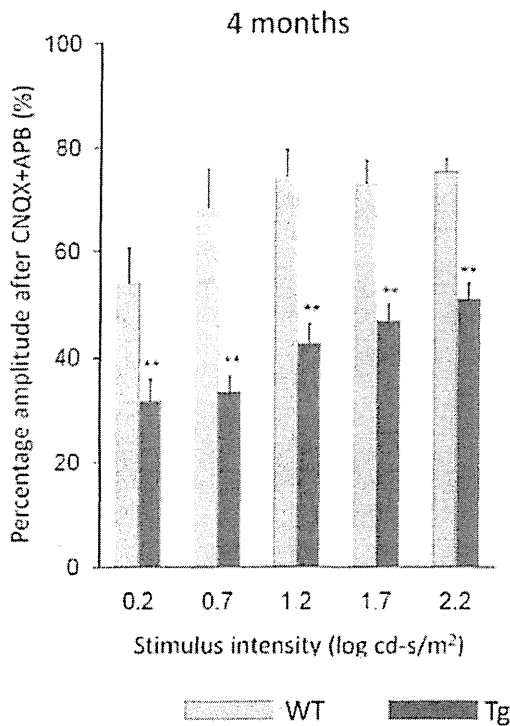


図 4: ERG の a 波中の視細胞応答の割合

Tg の錐体 a 波における視細胞成分の割合が減少した理由は、単に変性により視細胞数が減少したために相対的に視細胞成分の割合が減少したのか、それとも視細胞以降の成分の振幅が増大したことも関与しているのかを確認するため、薬物注射前と注射後の a 波振幅の絶対値の差をプロットした(図 5)。その結果、4 か月齢の Tg では、弱い刺激強度 (0.2 および 0.7 log cd·s/m<sup>2</sup>) では視細胞以降成分の振幅が WT より有意

に高いことがわかった。これにより、4 か月の Tg では視細胞以降成分の振幅増大も相対的な視細胞成分の割合減少に関与していたことがわかった。

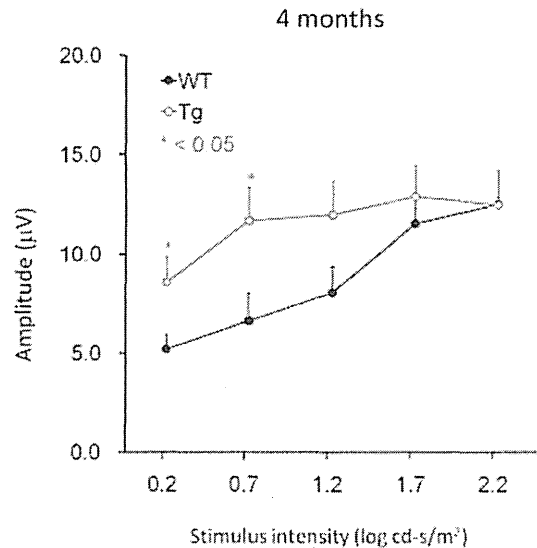


図 5: ERG の a 波中の視細胞後成分の割合

#### D. 考察

今回の研究により、Tg ウサギの錐体 ERG の a 波における錐体視細胞成分の割合は WT に比べて有意に低いことがわかった(図 5)。これまでの研究でも、RP のモデル動物では視細胞数が減少しても網膜中層と内層は保たれるという報告があり、我々の結果は当然のように見える。しかし今回の結果では、Tg ウサギの錐体 ERG の a 波における視細胞成分の割合の減少は、視細胞以降成分の振幅増大も関与しているという興味深い所見が得られた(図 6)。最近の研究では、杆体視細胞が変性していく過程で杆体 ON 型双極細胞が錐体視細胞に異所性に接続することが組織学的に示されており、今回の我々の結果は、視細胞変性に伴うシナプスやニューロンの 2 次的変化を示唆している可能性があると考えられた。

また今回の結果は、眼科臨床的にも重要な意義を持つと考えられた。現在でも錐体 ERG の a 波は錐体視細胞そのものの電氣的応答であると考えている臨床家が多い。しかし進行性の視細胞変性疾患を有する患者（例えば RP）では、錐体視細胞の残存機能を錐体 ERG の a 波で測定しようとするとき過大評価してしまう可能性があることがわかった。例えば国際臨床電気生理学会が推奨する錐体 ERG の刺激強度（0.48 log-cd·s/m<sup>2</sup>）における錐体 ERG の a 波に含まれる視細胞の成分は、変性網膜では 34% しかないからである。RP 患者の錐体 ERG の a 波を評価する際には、視細胞以降由来成分が少なからず関与していることを考慮に入れるべきである。

## E. 結論

視細胞が進行性に変性する P347L Tg ウサギの網膜において、錐体 ERG の a 波に視細胞以降の成分が含まれており、a 波に占める錐体視細胞成分の相対的な割合は正常網膜より低いことがわかった。この結果から、RP 患者の錐体 ERG の a 波を使用して錐体機能を評価する際には十分な注意が必要であることが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Morita Y, Kimura K, Fujitsu Y, Enomoto A, Ueno S, Kondo M, Sonoda KH. Autoantibodies to transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1 in a Japanese patient

with melanoma-associated retinopathy. *Jpn J Ophthalmol.* in press.

(2) Hibi N, Kondo M, Ishikawa K, Ueno S, Komeima K, Terasaki H. Transient increase of retinal nerve fiber layer thickness after macular hole surgery. *Int Ophthalmol.* in press.

(3) Suto K, Hosono K, Takahashi M, Hirami Y, Arai Y, Nagase Y, Ueno S, Terasaki H, Minoshima S, Kondo M, Hotta Y. Clinical Phenotype in Ten Unrelated Japanese Patients with Mutations in the EYS Gene. *Ophthalmic Genet.* in press.

(4) Ueno S, Nishiguchi KM, Tanioka H, Enomoto A, Yamanouchi T, Kondo M, Yasuma TR, Yasuda S, Kuno N, Takahashi M, Terasaki H. Degeneration of retinal on bipolar cells induced by serum including autoantibody against TRPM1 in mouse model of paraneoplastic retinopathy. *PLoS One.* 2013;8:e81507.

(5) Hibi N, Ueno S, Ito Y, Piao CH, Kondo M, Terasaki H. Relationship between retinal layer thickness and focal macular electroretinogram components after epiretinal membrane surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54:7207-14.

(6) Nishiguchi KM, Tearle RG, Liu YP, Oh EC, Miyake N, Benaglio P, Harper S, Koskiniemi-Kuendig H, Venturini G, Sharon D, Koenekoop RK, Nakamura M, Kondo M, Ueno S, Yasuma TR, Beckmann JS, Ikegawa S, Matsumoto N, Terasaki H, Berson EL, Katsanis N, Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:16139-44.

- (7) Ueno S, Koyasu T, Kominami T, Sakai T, Kondo M, Yasuda S, Terasaki H. Focal cone ERGs of rhodopsin Pro347Leu transgenic rabbits. *Vision Res.* 2013; 91:118-23.
- (8) Fukuda S, Nagano M, Yamashita T, Kimura K, Tsuboi I, Salazar G, Ueno S, Kondo M, Kunath T, Oshika T, Ohneda O. Functional endothelial progenitor cells selectively recruit neurovascular protective monocyte-derived F4/80(+) /Ly6c(+) macrophages in a mouse model of retinal degeneration. *Stem Cells.* 2013;31:2149-61.
- (9) Nishiguchi KM, Ushida H, Tomida D, Kachi S, Kondo M, Terasaki H. Age- dependent alteration of intraocular soluble heparan sulfate levels and its implications for proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2013;19: 1125-31.
- (10) Sugimoto M, Kondo M, Horiguchi M. Uniform suspension of the clustered triamcinolone acetone particle. *J Ophthalmol.* 2013;2013:315658.
- (11) Matsui Y, Tsukitome H, Uchiyama E, Wada Y, Yagi T, Matsubara H, Kondo M. Peripheral capillary nonperfusion and full-field electroretinographic changes in eyes with frosted branch-like appearance retinal vasculitis. *Clin Ophthalmol.* 2013; 7:137-40.
- (12) Ushida H, Kachi S, Asami T, Ishikawa K, Kondo M, Terasaki H. Influence of preoperative intravitreal bevacizumab on visual function in eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 2013;49:30-6.
- (13) Iwata E, Ueno S, Ishikawa K, Ito Y, Uetani R, Piao CH, Kondo M, Terasaki H. Focal macular electroretinograms after intravitreal injections of bevacizumab for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:4185-90.
- (14) Morimoto T, Kanda H, Kondo M, Terasaki H, Nishida K, Fujikado T. Transcorneal electrical stimulation promotes survival of photoreceptors and improves retinal function in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53: 4254-61.
- (15) Muraoka Y, Ikeda HO, Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One.* 2012;7:e36135.
- (16) Omori Y, Araki F, Chaya T, Kajimura N, Irie S, Terada K, Muranishi Y, Tsujii T, Ueno S, Koyasu T, Tamaki Y, Kondo M, Amano S, Furukawa T. Presynaptic dystroglycan -pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J Neurosci.* 2012;32(18):6126-37.
- (17) Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. *PLoS One.* 2012;7:e31036.
- (18) Hirota R, Kondo M, Ueno S, Sakai T, Koyasu T, Terasaki H. Photoreceptor and post-photoreceptor contributions to photopic

- ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(3):1467-72.
- (19) Nojima K, Hosono K, Zhao Y, Toshiba T, Hikoya A, Asai T, Kato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Clinical features of a Japanese case with Bothnia dystrophy. *Ophthalmic Genet.* 2012 Jun;33(2):83-8.
- (20) Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, Marmor MF, McCulloch DL, Palmowski-Wolfe AM; International Society For Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol.* 2012;124:1-13.
- (21) Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, Dridi S, Fowler BJ, Blandford AD, Albuquerque RJ, Hirano Y, Terasaki H, Kondo M, Fujita T, Ambati BK, Tarallo V, Gelfand BD, Bogdanovich S, Baffi JZ, Ambati J. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol Ther.* 2012;20:101-8.
- (22) Nishimura T, Machida S, Kondo M, Terasaki H, Yokoyama D, Kurosaka D. Enhancement of ON-bipolar cell responses of cone electroretinograms in rabbits with the Pro347Leu rhodopsin mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:7610-7.
- (23) Sanuki R, Onishi A, Koike C, Muramatsu R, Watanabe S, Muranishi Y, Irie S, Uneo S, Koyasu T, Matsui R, Chérasse Y, Urade Y, Watanabe D, Kondo M, Yamashita T, Furukawa T. miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci.* 2011;14:1125-34.
- (24) Yasuda S, Kachi S, Kondo M, Ushida H, Uetani R, Terui T, Piao CH, Terasaki H. Significant correlation between electroretinogram parameters and ocular vascular endothelial growth factor concentration in central retinal vein occlusion eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:5737-42.
- (25) Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. *PLoS One.* 2011;6:e19911.
- (26) Yasuda S, Kondo M, Kachi S, Ito Y, Terui T, Ueno S, Terasaki H. Rebound of macular edema after intravitreal bevacizumab therapy in eyes with macular edema secondary to branch retinal vein occlusion. *Retina.* 2011;31:1075-82.
- (27) Terui T, Kondo M, Sugita T, Ito Y, Kondo N, Ota I, Miyake K, Terasaki H. Changes in areas of capillary nonperfusion after intravitreal injection of bevacizumab in eyes with branch retinal vein occlusion. *Retina.* 2011;31:1068-74.

## 2. 学会発表

- (1) Kondo M, Sanuki R, Ueno S, Nishizawa Y, Hashimoto N, Ohguro H, Yamamoto S, Machida S, Terasaki H, Adamus G, Furukawa T. Identification of autoantibodies against TRPM1 in patients with paraneoplastic retinopathy associated with ON bipolar cell dysfunction. Annual Meeting of the Association

for Research in Vision and Ophthalmology.  
Florida, USA. May 3, 2011.

2) Kondo M, Hirota R, Ueno S, Sakai T,  
Koyasu T, Terasaki H. Photo- receptor and  
post-photoreceptor contributions to photopic  
ERG a-wave in rhodopsin P347L transgenic  
rabbits. International Society for  
Electrophysiology of Vision. Quebec. June 11,  
2012.

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

(1) Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, et al.  
ISCEV Standard for full-field clinical  
electroretinography (2008 update). Doc  
Ophthalmol. 2009;118:69–77.

(2) Frishman LJ. Origins of the  
electroretinogram. In: Heckenlively JR, Arden  
GB, eds. Principles and Practice of Clinical  
Electrophysiology of Vision. 2nd ed. London:  
MIT Press; 2006:139–183. (3) Bush RA,  
Sieving PA. A proximal retinal component in  
the primate photopic ERG a-wave. Invest  
Ophthalmol Vis Sci. 1994;35:635–645.

(4) Sieving PA, Murayama K, Naarendorp F.  
Push-pull model of the primate photopic  
electroretinogram: a role for hyperpolarizing

neurons in shaping the b-wave. Vis Neurosci.  
1994;11:519–532.

(5) Jamison JA, Bush RA, Lei B, Sieving PA.  
Characterization of the rod photoresponse  
isolated from the dark-adapted primate ERG.  
Vis Neurosci. 2001;18:445–455.

(6) Robson JG, Saszik SM, Ahmed J, Frishman  
LJ. Rod and cone contributions to the a-wave  
of the electroretinogram of the macaque. J  
Physiol. 2003;547:509–530. (7) Friedburg C,  
Allen CP, Mason PJ, Lamb TD. Contribution of  
cone photoreceptors and post-receptor  
mechanisms to the human photopic  
electroretinogram. J Physiol.  
2004;556:819–834.

(8) Sharma S, Ball SL, Peachey NS.  
Pharmacological studies of the mouse cone  
electroretinogram. Vis Neurosci.  
2005;22:631–636. MedlineWeb of Science

(9) Bui BV, Fortune B. Origin of  
electroretinogram amplitude growth during  
light adaptation in pigmented rats. Vis Neurosci.  
2006;23:155–67.

(10) Koyasu T, Kondo M, Miyata K, et al.  
Photopic electroretinograms of  
mGluR6-deficient mice. Curr Eye Res.  
2008;33:91–99.

(11) Miura G, Wang MH, Ivers KM, Frishman  
LJ. Retinal pathway origins of the pattern ERG  
of the mouse. Exp Eye Res. 2009;89:49–62.

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 篠田啓 帝京大学医学部眼科学教室 教授

研究要旨：当研究室では、DNA解析に必要な患者の臨床診断を行い、表現系を明確するという作業を各種の遺伝性網膜疾患について行った。

対象は、スターガルト病、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性、BEST 病、白点状網膜炎等、多岐にわたっており、また、その表現形は典型的なものから、これまでに報告のない特殊なものも含まれている。これらの患者に対し、問診による病歴家族歴調査、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った。そして、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析の候補として、61 例の採血を行い、検体を東京医療センターに送った。

また、黄斑疾患の診断の際に重要な多局所網膜電図(mfERG)の刺激モニターについて、近年社会的に CRT から移行しつつある LCD の有用性を検討した。LCD を刺激装置として用いた場合でも応答密度波形は従来のもものと類似していたが、モニターの種類によってはその振幅や潜時が有意に異なることから、今後の刺激装置としてのモニターの選択に注意を要することが示唆された。

#### A. 研究目的

網膜ジストロフィーの診断は臨床所見すなわち表現形に加えて原因遺伝子の変異が同定されることでより確実となる。さらには原因遺伝子やその変異の解析は、病態や病理学的・分子遺伝学的な原因の解明や治療法の開発に大きな前進となる。しかし、中には原因遺伝子が明らかにされていない、ないしは一部の原因遺伝子しか見つかっていない疾患においては、たとえ臨床的に診断名が確定していても、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、表現系を明確にした。

また、黄斑疾患の診断の際に重要な検査の一つとして、多局所網膜電図(mfERG)が用いられるが、その刺激モニターについて、近年社会的に CRT から移行しつつある LCD の有用性を検討した。

#### B. 研究方法

当院眼科外来を受診した、錐体杆体ジストロフィー、網膜色素変性、ベスト病、白点状網膜炎、その他分類不能の黄斑ジストロフィーを対象とした。

各症例に対し詳しい問診を行いその経過や家族歴を詳しく調べた。さらに、健常者を含めた定期的な眼科検査（ルーチンの視力、視野検査等）の他に、疾患に応じて、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（眼底自発

蛍光、蛍光眼底造影、光干渉断層計）などを行い、臨床所見の多面的な解析によってより詳しい病態把握を行った。その上で、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。

また、mfERG 記録の際に従来用いられている CRT モニターと LCD を刺激装置として用い、刺激モニター画面の輝度変化の違いを検討し、さらに得られた反応波形を比較検討した。

#### C. 研究結果

罹患者およびその家族を含めて、オカルト黄斑ジストロフィー 2 例、網膜色素変性 51 例、白点状網膜炎 4 例、錐体ジストロフィー 3 例、ベスト病 1 例について臨床的に診断し、採血を行った。

また、mfERG においては LCD を刺激装置として用いた場合でも応答密度波形は従来のもものと類似していたが、モニターの種類によってはその振幅の減少や潜時の延長が認められた。この原因として LCD では刺激画面の白黒の変化に数 msec 要する事が CRT との大きな違いであること（図 1）、これが振幅や潜時の変化に影響していると考えられた。その対策として刺激画面の白黒のコントラストを下げるないしは反応時間の早いものを用いる事が有用であると考えられた。また、今後は有機 EL ディスプレイが視覚検査刺激装置として用いる事が可能かどうかについても検討が

必要と考えられた。

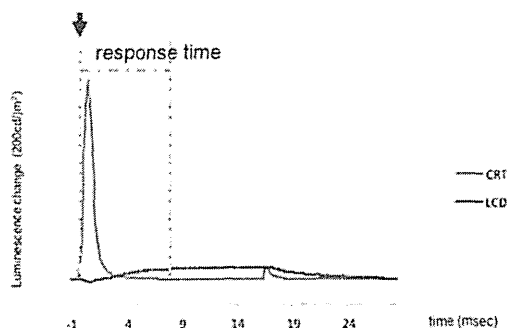


図 1: CRT と LCD 画面の輝度変化

矢印で示された刺激命令から、画面輝度変化が生じるまでの時間は両画面に差はないものの、黒→白に変化する際に要する時間(response time)は LCD では 8.6 msec であった。さらに白→黒→白に要する時間は LCD では 20msec 以上であった。mfERG の刺激は 16.7msec 間隔で行われるため、LCD では白刺激が連続した場合に、次の白→黒に戻りきる前に次の白刺激がやってくるために、後者の白刺激が有効に働かない。振幅減少や潜時延長はこれらのために生じると考えられた。

#### 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。この中には優性遺伝および劣性遺伝家系が含まれており、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ある。

また、mfERG 記録に際して今後 LCD モニターを用いる際には、各機種の特徴を理解した上で結果を適切に解釈する必要があると考えられた。

#### 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. Matsumoto CS, Shinoda K, Satofuka S, Nakatsuka K, Mizota A, Miyake Y. The impact of Stiles-Crawford effect on Focal Macular ERGs in Monkeys. *JOV* 2012 Mar 6;12(3). 2012.
2. Sonoyama H, Shinoda K, Ishigami C, Tada Y, Ideta H, Ideta R, Takahashi M, Miyake Y. Oguchi disease masked by retinitis pigmentosa. *Doc Ophthalmol*. 2011 Oct;123(2):127-33
3. So K, Shinoda K, Matsumoto CS, Satofuka S, Imamura Y, Mizota A. Functional and

microstructural change of the localized photoreceptors in acute zonal occult outer retinopathy. *Case Reports Ophthalmol*. 2011 Sep;2(3):307-13.

4. Hirasawa M, Noda K, Noda S, Suzuki M, Ozawa Y, Shinoda K, Inoue M, Ogawa Y, Tsubota K, Ishida S. Transcriptional Factors Associated with Epithelial-Mesenchymal Transition in Choroidal Neovascularization. *Mol Vis*. 2011;17:1222-30.
5. Kawamura R, Inoue M, Shinoda H, Shinoda K, Itoh Y, Ishida S, Tsubota K. Incidence of Increased Intraocular Pressure after Subtenon Injection of Triamcinolone Acetonide. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2011 Jun;27(3):299-304
6. Sugahara M, Shinoda K, Matsumoto CS, Satofuka S, Hanazono G, Imamura Y, Mizota A. Outer Retinal Microstructure in Case of Acute Idiopathic Blind Spot Enlargement Syndrome. *Case Reports Ophthalmol*. 2011;2(1):116-22.
7. So K, Shinoda K, Watanabe E, Mashiko T, Mizota A. Vitrectomy for Proliferative Retinopathy in Patient with advanced Duchenne Muscular Dystrophy. *Retinal Cases & Brief Reports* 6(2):142-144,2012.
8. Akiyama Y, Shinoda K, Watanabe E, Mashiko T, Mizota A. Simultaneous bilateral central retinal artery occlusion in Churg-Strauss syndrome. *Retinal Cases & Brief Reports*. 6(1):60-64,2012.
9. Ozeki N, Shinoda K, Ohde H, Ishida S, Tsubota K. Transcorneal electrical stimulation to treat Best vitelliform macular dystrophy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*
10. Uchida A, Shinoda K, Matsumoto CS, Ohde H, Ozawa Y, Ishida S, Inoue M, Mizota A, Tsubota K. Acute visual field defect following vitrectomy was determined as optic nerve origin by Electrophysiology. *Case Reports Ophthalmol*. 2012;3:396-405
11. Gocho K, Kikuchi S, Kabuto T, Kameya S, Shinoda K, Mizota A, Yamaki K, Takahashi K. High-resolution en face images of microcystic macular edema in patients with autosomal dominant optic atrophy. *J Ophthalmol, BioMed Research International* Epub 2013 Nov 28.
12. Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Funada H, Mizota A. Comparison of flash effect during pattern visually evoked potentials in different driving frequency Liquid Crystal

- Display monitors . *Ophthalmic Res*
13. Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Matsumoto K, Funada H, Mizota A. Liquid Crystal Display Screens as Stimulators for Visually Evoked Potentials: flash effect due to delay in luminance changes. *Documenta Ophthalmol.* 2013 Oct;127(2):103-12.
  2. 学会発表
    1. Kondo T, Matsumoto CS, Satofuka S, Matsumoto H, Funada H, Shinoda K, Mizota A. Liquid Crystal Display monitors as a visual stimulator for recording Pattern-reversal Visual Evoked Potentials: Usefulness and limitations. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, (44th; 2011; Fort Lauderdale, Florida). 2011.5.1.-5.5.
    2. Matsumoto K, Matsumoto CS, Terauchi N, Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G, Inomata K, Shinoda K, Noda T, Mizota A, Miyake Y. Transient macular ischemia determined by focal macular electroretinogram. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.
    3. Kawai S, Matsumoto CS, Terauchi G, Ohde H, Uchida A, Kawai M, Ozawa Y, Ishida S, Inoue M, Satofuka S, Shinoda K, Mizota A. Acute visual field defect following vitrectomy was determined as optic nerve origin by multifocal ERG and multifocal VEP. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.
    4. Shinoda K, Ozeki N, Ohde H, Matsumoto CS, Inoue M, Tsunoda K, Inomata K, Kimura I, Mizota A. Transcorneal electrical stimulation on eyes with no light perception. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.
    5. Wakasa R, Kimura I, Matsumoto CS, Terauchi M, Matsumoto H, Imamura Y, Sugahara M, Kondo T, Satofuka S, Shinoda K, Mizota A. Focal retinal response and retinal microstructure in a patient with acute zonal occult outer retinopathy. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9.
    6. Matsumoto CS, Kondo T, Matsumoto H, Satofuka S, Funada H, Shinoda K, Mizota A: High Frequency 120Hz Liquid Crystal Display monitors as a visual stimulator for recording Pattern-reversal Visual Evoked Potentials. *International Society for Clinical Electrophysiology of Vision*, (49 th;2011;ケベック, カナダ). 2011.9. 1.
    7. 篠田啓. この疾患にこそERG/VEPを 眼底正常な視力低下で電気生理を 第115回日本眼科学会 2011. 5. 東京
    8. 石川敦、今村裕、市川良和、堤頼久、石田政弘、篠田啓、溝田淳. 多発消失性白点症候群の網膜・脈絡膜OCT所見. 第65回日本臨床眼科学会2011. 10. 7. 東京
    9. 水谷吉宏、藤田京子、松本惣一セルソ、今村裕、里深信吾、田中恵津子、篠田啓、溝田淳、湯澤美都子. 慢性中心性漿液性脈絡網膜症に対する光線力学療法前後の微小視野計測. 第65回日本臨床眼科学会2011. 10. 7. 東京
    10. 曹圭徹、松本セルソ惣一、里深信吾、近藤尚明、渡邊恵美子、篠田啓、溝田淳、今村裕、石田政弘. 急性帯状潜在性網膜外層症の形態と機能評価. 第65回日本臨床眼科学会 2011. 10. 7. 東京
    11. 松本浩一、花園元、尾羽澤実、里深信吾、松本惣一、今村裕、篠田啓、溝田淳、安藤靖恭. 応援練習中に生じた網膜硝子体出血. 第65回日本臨床眼科学会2011. 10. 7. 東京
    12. 曹圭徹、渡邊恵美子、近藤尚明、松本セルソ惣一、里深信吾、篠田啓、溝田淳. 強度近視眼の網膜分離に対する手術前後の網膜微小形態. 第50回日本網膜硝子体学会2011. 12. 3. 東京
    13. 大熊志保、篠田啓、望月祐人、木村至、溝田淳. 心因性視力低下と片眼の周辺部錐体機能不全の疑われた1例. 第49回日本神経眼科学会総会2011. 11. 25. 神戸
    14. 篠田啓. 人工網膜 ー網膜電気刺激ー 第xx回杏林アイセンターオープンカンファレンス 2011. 5. 27. 東京
    15. 篠田啓. 手術とERG. 第7回 樋田メモリアル網膜ラウンジ 2011. 11. 5. 東京
    16. 篠田啓. 硝子体手術中のERG. MIVSワークショップ・シーズンII 2011. 12. 3. 東京
    17. 松本惣一セルソ、篠田啓、松本治恵、船田英明、溝田淳. 液晶ディスプレイを刺激装置としたパターンリバーサルVEPの記録. 第116回日本眼科学会 2012. 4. 5-8. 東京



18. 木村至、篠田啓、若狭玲、松本惣一セルソ、今村裕、溝田淳、村上晶. 急性带状潜在性網膜外層症の視機能と層構造の回復過程の検討. 第116回日本眼科学会 2012. 4. 5-8. 東京
19. 堀野武、内田敦郎、持丸博史、厚東隆志、永井紀博、篠田肇、篠田啓、大出尚郎、小沢洋子、坪田一男. ポリコナゾール内服による視覚障害から視放線の病変が見つかった再生不良性貧血の一例. 第116回日本眼科学会 2012. 4. 5-8. 東京
20. 寺内岳、松本惣一セルソ、篠田啓. レーザー硝子体手術が有効であった傍中心窩毛細血管拡張症の1例. 第774回東京眼科集談会. 2012. 5. 23. 東京
21. 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60回日本臨床視覚電気生理学会. 2012年12月5-6日、名古屋
22. 望月祐人、篠田啓、松本惣一セルソ、木村至、海老原伸行、溝田淳. 片眼性周辺部錐体機能不全の疑われた1例. 第60回日本臨床視覚電気生理学会. ミニシンポジウム. 2012年12月5-6日、名古屋
23. 寺内岳、松本惣一セルソ、中込亮太、松本治恵、関圭介、篠田啓、溝田淳. 多局所網膜電図における液晶モニターの臨床応用についての検討. 第60回日本臨床視覚電気生理学会. 2012年12月5-6日、名古屋
24. 若狭玲、木村至、篠田啓、松本惣一セルソ、今村裕、溝田淳、村上晶. AZOOR complexの回復過程における視機能と網膜の検討. 第66回日本臨床眼科学会 2012. 10. 25-28. 京都
25. Mizutani Y, Fujita K, Shinoda K, Imamura Y, Matsumoto S, Yuzawa M. Low luminance visual acuity after half-dose verteporfin photodynamic therapy in patients with chronic central serous chorioretinopathy. The 8<sup>th</sup> APVRS Congress. The 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Retina and Vitreous Society. 2013. 12.6.-8. Nagoya
26. Fujita K, Shinoda K, Imamura Y, Matsumoto S, Mizutani Y, Yuzawa M. One-year results of half-dose verteporfin photodynamic therapy for chronic central serous chorioretinopathy: efficacy and side effects. The 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Retina and Vitreous Society. 2013. 12.6.-8. Nagoya
27. 寺内岳、松本惣一セルソ、近藤尚明、渡邊恵美子、篠田啓、溝田淳. 強膜圧迫による眼底周辺部観察にIOL径が及ぼす影響. 第117回日本眼科学会. 2013. 4. 4~7. 東京
28. 松本惣一セルソ、寺内岳、清水聡子、松本浩一、篠田啓. 新生血管緑内障に対するエクस्प्रेसフィルトレーションデバイスを用いた濾過手術. 第778回手術東京都眼科集談会. 2013. 5. 22.
29. 寺内岳、松本惣一セルソ、近藤尚明、渡邊恵美子、篠田啓、溝田淳. 腎周囲膿瘍からの内因性眼内炎により眼球摘出に至った1例. 第67回日本臨床眼科学会. 2013. 10. 31. ~11. 3. 横浜
30. 町田繁樹、篠田啓、新井三樹、近藤峰生、山本修一. インストラクションコース、ERG、どうとる？ どう読む？ 第67回日本臨床眼科学会 2013. 10. 31. ~11. 3. 横浜.
31. Shinoda K, Matsumoto CS, Matsumoto H, Funada H, Mizota A. JSCEV Pattern visual evoked potentials recorded elicited by liquid crystal display 第3回韓日合同臨床視覚電気生理学会. 2013年10月4-5日、大阪
32. 松本惣一セルソ、篠田啓、松本治恵、船田英明、溝田淳. 有機ELディスプレイを用いたパターンVEP記録 第61回日本臨床視覚電気生理学会. 2013年10月4-5日、大阪
33. 中込亮太、松本惣一セルソ、篠田啓、溝田淳. 異なった刺激間隔による両眼同時フラッシュVEPの記録 第61回日本臨床視覚電気生理学会. 2013年10月4-5日、大阪
34. 亀谷修平、後町清子、菊地佐知子、加部東武徳、篠田啓、溝田淳、山本邦比古、高橋浩. OPA1遺伝子変異を持つ常染色体優性視神経萎縮6例(4家系)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会. 2013年10月4-5日、大阪
35. 松本惣一セルソ、寺内岳、松本治恵、篠田啓、溝田淳. 新生血管緑内障に対するエクस्प्रेसフィルトレーションデバイスを用いた濾過手術. 第37回日本眼科手術学会 2014. 1. 17-19. 京都
36. 篠田啓. MacTel1に対する硝子体手術. 第4回硝子体手術フォーラム 北海道 2014. 2. 13-15.
37. 篠田啓. 周辺視野が教えてくれること. 第2回日本視野学会. モーニングクルズス. 横切

りで見える視機能～中心視野と周辺視野～

2013年5月19日、東京

38. 篠田啓. 術中網膜機能評価. 第13回浜松眼科フォーラム. 2013. 10. 18、浜松
39. 篠田啓. 術中視機能評価. 第5回 滋賀レイクサイドセミナー2013. 11. 9、大津
40. 篠田啓. Leica M844とBIOMで究極のQOVをめざす. 第37回日本眼科手術学会. ランチョンセミナー. 2014年1月18日、京都

#### 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

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 國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室 講師

**研究要旨：** 本研究は、遺伝性網膜ジストロフィーの原因遺伝子を究明し、その遺伝型と臨床型の関連について調査し報告することが目的である。分担研究組織である近畿大学医学部眼科学教室では、レーベル先天盲/若年発症網膜ジストロフィー、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、オカルト黄斑変性と診断された患者のうち、家族歴のはっきりしている症例について、前眼部、眼底、視力、視野、蛍光眼底造影、網膜電図(ERG)、暗順応、光断層干渉計(OCT)、超音波の各臨床検査を行い、合わせて家族歴を詳細に調査した。さらに、同意を得た患者とその血縁者に対して全血採血を行って東京医療センター分子生物学教室に送付し、次世代シーケンサーを用いた全エクソームの解析を行った。近畿大学医学部眼科学教室では、平成 23～25 年度にわたり、125 家系 248 例の患者とその家族に対して臨床検査と遺伝子検査を行い、うち 5 家系について原因遺伝子が確定した。

#### A. 研究目的

本研究の目的は、次世代シーケンスを用いて遺伝性網膜ジストロフィー患者とその血縁者の全エクソームを解析し、原因遺伝子とその変異を発見しようとするものである。全エクソームを解析することにより既知・未知を問わずに遺伝子異常を発見することができる。この解析方法は、特に、ホモ接合で発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患において、その原因の候補となる遺伝子を効率的にリストアップできる。

本研究では、常染色体劣性遺伝形式をとる網膜ジストロフィーを中心に、次世代シーケンサーを用いて遺伝子異常を発見し、その遺伝型と臨床型を比較して検討した。

#### B. 研究方法

まず、近畿大学医学部遺伝子倫理委員会に研究内容について書類で申請を行い、平成 23 年 2 月 2 日に承認を得た。

本研究では、近畿大学医学部附属病院眼科を受診した常染色体劣性遺伝が疑われる網膜ジストロフィーの患者とその家族を対象に遺伝子解析と臨床検査を行った。対象となった疾患は、レーベル先天盲/若年発症網膜ジストロフィー、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、オカルト黄斑ジストロフィー、コロイデレミア、白点状眼底であった。発端者とその血縁者の臨床検査と遺伝子解析を行った。

臨床検査としては、前眼部・眼底検査、視力検査、視野検査、網膜電図(ERG)検査、暗順応検査、

光干渉断層型(OCT)検査を行った。必要な症例に対しては、フルオレセインおよびインドシアニングリーン蛍光眼底造影検査、そして角膜検査や超音波断層検査を施行した。

発端者の血縁者には眼底検査を行った。さらに了解を得た血縁者に対しては、眼底写真撮影や視野検査、ERG 検査、OCT 検査を行った。

遺伝子解析は、倫理委員会で承認された方法に則ってインフォームドコンセントを行い、全例書面で同意書を取得した。その後患者およびその血縁者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て遺伝子解析を行った。

#### C. 研究結果

平成 23 年から 25 年度にかけて、レーベル先天盲/若年発症網膜ジストロフィー 5 家系 18 例、網膜色素変性 106 家系 192 例、錐体-杆体ジストロフィー 7 家系 18 例、オカルト黄斑ジストロフィー 5 家系 14 例、コロイデレミア 1 家系 5 例、白点状眼底 1 家系 1 例、合計 125 家系 248 例について臨床検査と遺伝子検査を行った。遺伝子検査では、検体から DNA を抽出して全エクソームのシーケンスを行った結果、数種の新規遺伝子変異が原因遺伝子として候補に挙がり、現在、機能検査についての検討が行われている。また、5 種の既知遺伝子について新規変異が 3 種、既知変異が 6 種、網膜ジストロフィーの原因として同定された。これら遺伝子異常が確認されたケースについては論文作成をすすめ、3 本の論文を作成して投稿した。

## E. 結論

本研究では、近畿大学医学部眼科学教室で臨床検査を行い東京医療センターで遺伝子解析を行った網膜ジストロフィーの家系例において、5種の既知遺伝子について3種の新変異と6種の既知変異が疾患の原因として同定された。

## 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) Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Nakao Y, Matsumoto C, Shimomura Y. Two types of acute zonal occult outer retinopathy differentiated by dark- and light-adapted perimetry. *Jpn J Ophthalmol* 58: 177-187, 2014.
- 2) Kuniyoshi K, Sugioka K, Sakuramoto H, Kusaka S, Wada N, Shimomura Y. Intravitreal injection of bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Jpn J Ophthalmol* 2014 (in press)
- 3) Kuniyoshi K, Terasaki H, Arai M, Hirose T. Multifocal electroretinograms in Stargardt's disease/fundus flavimaculatus. *Ophthalmologica* 2014 (in press)
- 4) 櫻本宏之, 國吉一樹. 電気生理学的検査. 全視野ERG. *眼科* 56: 65-75, 2014.
- 5) Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Nakao A, Sato T, Utsumi T, Tsuneoka H, Shimomura Y. Novel mutations in enhanced S-cone syndrome. *Ophthalmology* 120: 431.e1-6, 2013.
- 6) 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. *Clin Ophthalmol* 7: 1703-1711, 2013.
- 7) 國吉一樹. Q&A 眼科診療ピットフォーラム. 金芳堂, 79-90, 2013
- 8) 國吉一樹. 抗アクアポリン4抗体陽性視神経炎. 図で早わかり 実践!眼科薬理. *臨床眼科* 67 (増刊号): 188-193, 2013.
- 9) 國吉一樹. ERGの有用性. 専門医のための眼科診療クオリファイ 16 糖尿病合併症. 中山書店, 37-40, 2013.
- 10) Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Nakao A, Takada S, Shimomura Y. A case of bilateral, acquired and acute dysfunction of short-wavelength-sensitive cone systems. *Doc*

*Ophthalmol* 125: 75-80, 2012.

- 11) 國吉一樹. さまざまな網膜疾患におけるERG. 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. 中山書店, 143-155, 2012.
- 12) 國吉一樹. 夜盲. 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. 中山書店, 29-36, 2012.
- 13) 若山暁美, 國吉一樹. 動的視野検査. 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. 中山書店, 54-62, 2012.
- 14) 櫻本宏之, 國吉一樹, 咲山豊, 中尾彰, 岡崎能久, 松本長太, 下村嘉一. 左右差の著しい網膜変性の長期経過. *眼臨紀* 4: 567-573, 2011.

### 2. 学会発表

- 1) Kuniyoshi K, Iwata T, Sakuramoto H, Tsunoda K, Akahori M, Shimomura Y. Longitudinal clinical courses of two siblings with congenital amaurosis of Leber. 8<sup>th</sup> Congress of Asia-Pacific Vireo-retinal Society. 2013.12.6.
- 2) Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Matsumoto C, Shimomura Y. Automated static two-color perimetry. 8<sup>th</sup> Congress of Asia-Pacific Vireo-retinal Society. 2013.12.6.
- 3) Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Tsuneoka H, Shimomura Y. Blue-on-yellow electroretinography on patients with enhanced S-cone syndrome. Annual meeting of Association of Research for Vision and Ophthalmology (ARVO). Seattle, USA. 2013.5.8.
- 4) 國吉一樹, 林 孝彰, 櫻本宏之, 常岡 寛, 下村嘉一. Enhanced S-cone Syndromeの blue-on-yellow ERG. 第117回日本眼科学会総会. 2013.4.4.

## 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