

10. Schuster A, Janecke AR, Wilke R, Schmid E, Thompson DA, Utermann G, Wissinger B, Zrenner E, Gal A (2007) The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with *RDH12* mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:1824–1831
11. Sun W, Gerth C, Maeda A, Lodowski DT, van der Kraak L, Saperstein DA, Héon E, Palczewski K (2007) Novel *RDH12* mutations associated with Leber congenital amaurosis and cone-rod dystrophy: biochemical and clinical evaluations. *Vision Res* 47:2055–2066
12. Valverde D, Pereiro I, Vallespín E, Ayuso C, Borrego S, Baiget M (2009) Complexity of phenotype-genotype correlations in Spanish patients with *RDH12* mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:1065–1068
13. Benayoun L, Spiegel R, Auslender N, Abbasi AH, Rizel L, Hujeirat Y, Salama I, Garzozzi HJ, Allon-Shalev S, Ben-Yosef T (2009) Genetic heterogeneity in two consanguineous families segregating early onset retinal degeneration: the pitfalls of homozygosity mapping. *Am J Med Genet Part A* 149A:650–656
14. Sodi A, Caputo R, Passerini I, Bacci GM, Menchini U (2010) Novel *RDH12* sequence variations in Leber congenital amaurosis. *J AAPOS* 14:349–351
15. Weleber RG, Michaelides M, Trzuppek KM, Stover NB, Stone EM (2011) The phenotype of severe early childhood onset retinal dystrophy (SECORD) from mutation of *RPE65* and differentiation from Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:292–302
16. Mackay DS, Borman AD, Moradi P, Henderson RH, Li Z, Wright GA, Waseem N, Gandra M, Thompson DA, Bhatnagar SS, Holder GE, Webster AR, Moore AT (2011) *RDH12* retinopathy: novel mutations and phenotypic description. *Mol Vis* 17:2706–2716
17. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M (2009) ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol* 118:69–77
18. Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760
19. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303
20. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain *w*<sup>1118</sup>; *iso-2*; *iso-3*. *Fly* 6:80–92
21. Kyoto University (2014) Human genetic variation browser. <http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>. Accessed 12 Mar 2014
22. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* 76:7.20.1–7.20.41
23. National Institute of Genetics (NIG) (2014) Cell innovation program. [http://cell-innovation.nig.ac.jp/index\\_en.html](http://cell-innovation.nig.ac.jp/index_en.html). Accessed 12 Mar 2014
24. Fingert JH, Oh K, Chung M, Scheetz TE, Andorf JL, Johnson RM, Sheffield VC, Stone EM (2008) Association of a novel mutation in the retinol dehydrogenase 12 (*RDH12*) gene with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 126:1301–1307
25. Fulton AB, Hansen RM, Mayer DL (1996) Vision in Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol* 114:698–703
26. Walia S, Fishman GA, Jacobson SG, Aleman TS, Koenekoop RK, Traboulsi EI, Weleber RG, Pennesi ME, Héon E, Drack A, Lam BL, Allikmets R, Stone EM (2010) Visual acuity in patients with Leber's congenital amaurosis and early childhood-onset retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 117:1190–1198
27. Leighton DA, Harris R (1973) Retinal aplasia in association with macular coloboma, keratoconus and cataract. *Clin Genet* 4:270–274
28. Margolis S, Scher BM, Carr RE (1977) Macular colobomas in Leber's congenital amaurosis. *Am J Ophthalmol* 83:27–31
29. Heckenlively JR, Foxman SG, Parelhoff ES (1988) Retinal dystrophy and macular coloboma. *Doc Ophthalmol* 68:257–271
30. Mohamed MD, Topping NC, Jafri H, Raashed Y, McKibbin MA, Inglehearn CF (2003) Progression of phenotype in Leber's congenital amaurosis with a mutation at the *LCA5* locus. *Br J Ophthalmol* 87:473–475
31. Nakamura M, Ito S, Miyake Y (2002) Novel de novo mutation in *CRX* gene in a Japanese patient with Leber congenital amaurosis. *Am J Ophthalmol* 134:465–467
32. Lotery AJ, Jacobson SG, Fishman GA, Weleber RG, Fulton AB, Namperumalsamy P, Héon E, Levin AV, Grover S, Rosenow JR, Kopp KK, Sheffield VC, Stone EM (2001) Mutations in the *CRB1* gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch Ophthalmol* 119:415–420
33. Koenekoop RK, Wang H, Majewski J, Wang X, Lopez I, Ren H, Chen Y, Li Y, Fishman GA, Genead M, Schwartzentruber J, Solanki N, Traboulsi EI, Cheng J, Logan CV, McKibbin M, Hayward BE, Parry DA, Johnson CA, Nageeb M, FORGE Canada Consortium, Poulter JA, Mohamed MD, Jafri H, Rashid Y, Taylor GR, Keser V, Mardon G, Xu H, Inglehearn CF, Fu Q, Toomes C, Chen R (2012) Mutations in *NMNAT1* cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat Genet* 44:1035–1039

## Autosomal recessive cone–rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the *EYS* gene

Satoshi Katagiri · Masakazu Akahori · Takaaki Hayashi ·  
Kazutoshi Yoshitake · Tamaki Gekka · Kazuho Ikeo ·  
Hiroshi Tsuneoka · Takeshi Iwata

Received: 27 January 2014 / Accepted: 13 March 2014 / Published online: 21 March 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

### Abstract

**Background** *EYS* mutations have been identified only in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa (arRP). This study was conducted to describe clinical and genetic features of a Japanese patient with autosomal recessive cone–rod dystrophy (arCRD) and *EYS* mutations.

**Methods** We performed complete ophthalmic examinations including full-field electroretinography (ERG). Genetic analysis using whole-exome sequencing and Sanger sequencing was performed to identify the disease-causing mutation in a 31-year-old male patient.

**Results** At the initial visit, the patient's decimal best-corrected visual acuity (BCVA) was 0.9 and 0.6 in his right and left eyes, respectively. Funduscopy indicated retinal degenerations were predominantly affected within the vascular arcades and preserved retinal vessels in the mid-periphery in both eyes. Visual field

testing showed there were relative central scotomas and preserved peripheral visual fields in both eyes. ERG indicated there was a decreased pattern for both the rod and cone responses. At the age of 36 years, his BCVA decreased to 0.2 in both eyes. Optical coherence tomography showed marked retinal thinning of the macular regions in both eyes. Genetic analysis identified compound heterozygous truncating mutations (p.Y2935X and p.S1653KfsX2) in the *EYS* gene. His unaffected parents were heterozygous for each mutation.

**Conclusions** Our results demonstrated that *EYS* mutations can be the cause of not only arRP but also arCRD. Our findings extend the phenotypic spectrum of patients with *EYS* mutations.

**Keywords** *EYS* gene · Whole-exome sequencing · Genetics · Retinitis pigmentosa · Cone–rod dystrophy

S. Katagiri · M. Akahori · T. Iwata  
Division of Molecular and Cellular Biology, National  
Institute of Sensory Organs, National Hospital  
Organization Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan

S. Katagiri · T. Hayashi (✉) · T. Gekka · H. Tsuneoka  
Department of Ophthalmology, The Jikei University  
School of Medicine, 3-25-8 Nishi-shimbashi, Minato-ku,  
Tokyo 105-8461, Japan  
e-mail: taka@jikei.ac.jp

K. Yoshitake · K. Ikeo  
Laboratory of DNA Data Analysis, National Institute of  
Genetics, Shizuoka, Japan

### Introduction

The eyes shut homolog (*EYS*) gene (Online Mendelian Inheritance in Man: \*612424), largest gene known to be expressed in the human eye, spanning more than 2 Mb within the *RP25* locus (6q12). The human *EYS* protein is a homolog of the *Drosophila* eyes shut/spacemaker (*eyes*) protein, which is an extracellular matrix protein essential for photoreceptor development and morphology of the insect eye.

In 2008, mutations in the *EYS* gene were reported in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa (arRP) [1, 2]. The *EYS* mutations, which have been shown to be predominantly truncating mutations, have been described in patients with different ethnic origins and account for 5–16 % of arRP [3–7]. Thus, disruption of the *EYS* function has been identified as a frequent cause of arRP worldwide. With the exception for arRP, to date there have been no *EYS* mutations reported for any other phenotype.

Here, we report clinical and genetic features of a patient with autosomal recessive cone–rod dystrophy (arCRD) associated with compound heterozygous *EYS* mutations.

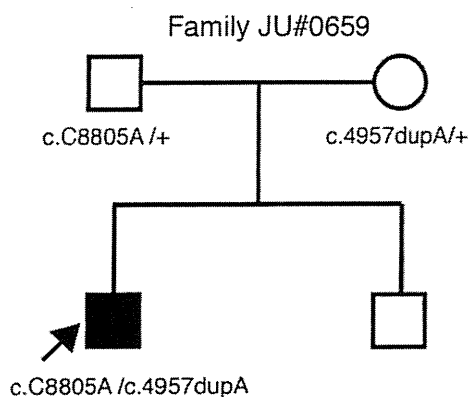
### Case report

A 31-year-old male patient (JU#0659) was referred to our hospital with a complaint of loss of visual acuity. He first reported a decreased visual acuity at the age of 29 years. Family history indicated that his parents had no previous reports of any ocular symptoms (Fig. 1). At his initial examination, decimal best-corrected visual acuity (BCVA) was 0.9 [with –6.00 diopter (dpt), cylinder (cyl) –1.25 dpt axis (Ax) 130°] in his right eye and 0.6 (with –4.50 dpt, cyl –0.75 dpt Ax 180°) in his left eye. Anterior segment examination showed no remarkable findings. Intraocular pressures were 16 mmHg in the right and 15 mmHg in the left eye. Funduscopy showed retinal degenerations within the vascular arcade in both eyes (Fig. 2a). Neither retinal degeneration nor attenuation of retinal vessels

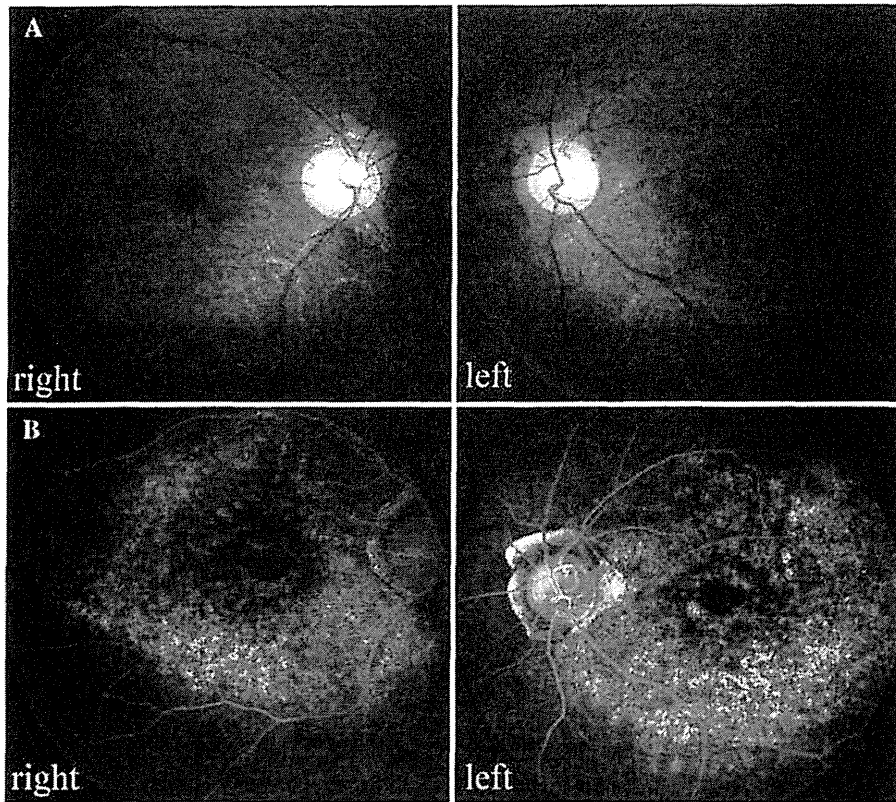
was observed in the periphery. Fluorescein angiography (VISUCAM NM/FA; Carl Zeiss Meditec AG, Dublin, CA, USA) showed a hyperfluorescence pattern due to a window defect within the vascular arcades of both eyes (Fig. 2b). At the age of 32 years, visual field testing using Goldmann kinetic perimetry (GP; Haag-Streit, Bern, Switzerland) showed bilateral central scotomas of the I-3e and I-4e isopters with relative sparing of the center, but preserved peripheral visual fields of the V-4e and I-4e isopters in both eyes (Fig. 3). Full-field electroretinography (ERG) was performed according to the protocols of the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. The procedure and conditions for ERG recording have been reported previously [8]. The ERG showed the rod, standard combined, cone, and 30-Hz flicker responses were bilaterally reduced to about one-third of those in a control, but the peak implicit time of each response was not delayed (Fig. 4).

At the age of 36 years, his BCVA decreased to 0.2 in both eyes. Funduscopy images using the Optos 200Tx imaging system (Optos PLC, Dunfermline, United Kingdom) showed retinal degenerations within the vascular arcades in both eyes, but relatively preserved mid-peripheral to peripheral retinal findings with no apparent attenuation of the retinal vessels (Fig. 5a). Fundus autofluorescence imaging (FAI) (Optos PLC) showed decreased autofluorescence within the vascular arcades but increased autofluorescence of the foveal area, and increased autofluorescence outside the vascular arcades in both eyes (Fig. 5b). Optical coherence tomography (OCT) (Cirrus HD-OCT; Carl Zeiss Meditec AG) showed retinal thinning with a visible foveal external limiting membrane line (Fig. 5c), and entire macular thinning in both eyes (Fig. 5d).

To identify disease-causing gene mutations, we performed whole-exome sequencing analysis as per a previously described method [9]. The obtained sequence data in the patient were compared with reference human genome sequences. Initially, we focused on only variants that could change the amino acid sequence. Subsequently, we filtered the remaining variants based on the criteria that a frequency of mutation was less than 1 % in the 1000-genome database (<http://www.1000genomes.org>). Finally, we screened variants residing within 207 retinal disease-associated genes published in the November 15, 2013

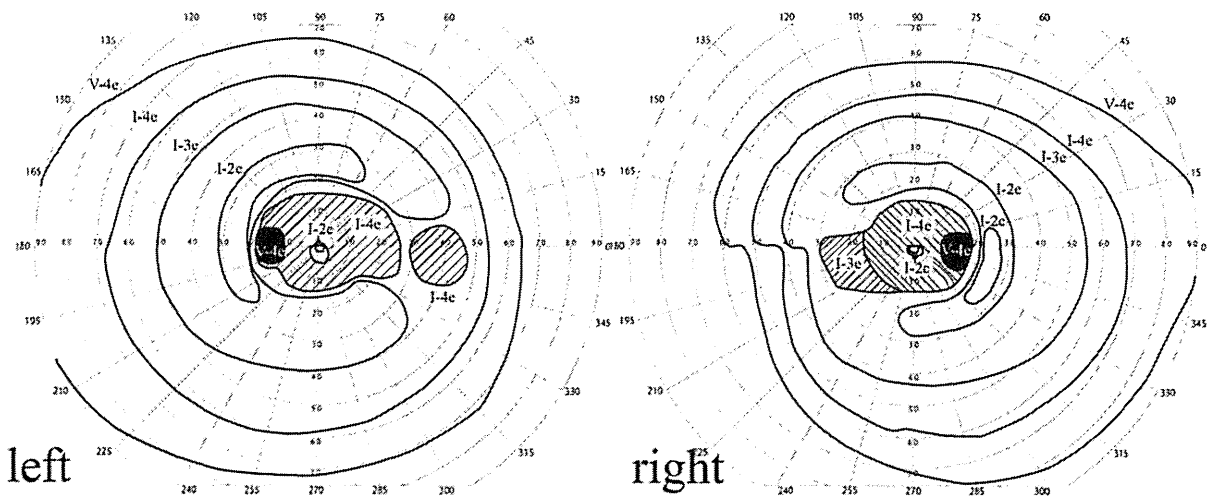


**Fig. 1** Pedigree of a Japanese family. Unaffected family members (males, *open squares*; females, *open circles*) and an affected proband (male, *solid square*) are shown



**Fig. 2** Fundus photographs and fluorescein angiography images (FA) of the patient at the age of 31 years. **a** Fundus photographs show retinal degenerations within the vascular

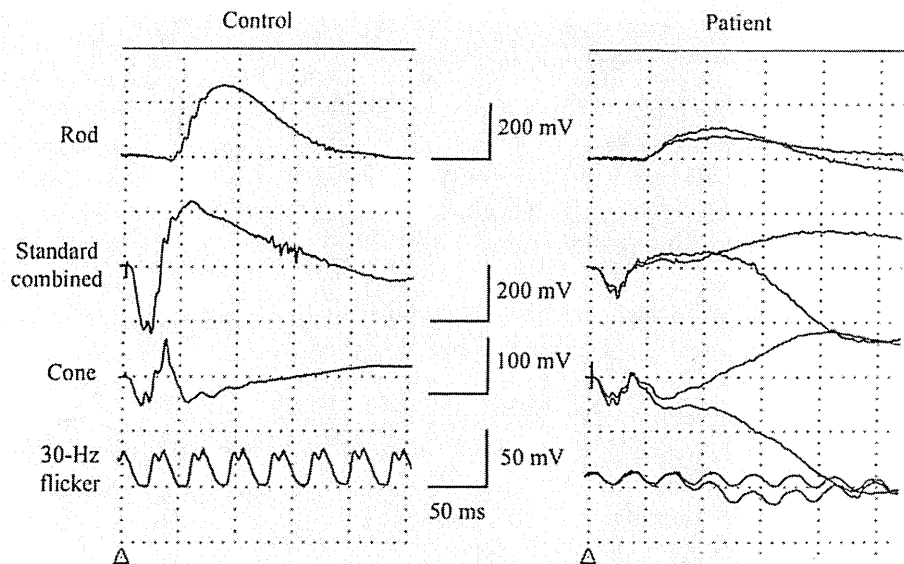
arcades in both eyes. **b** FA shows a hyperfluorescence pattern due to a window defect within the vascular arcades of both eyes



**Fig. 3** Visual field testing using Goldmann kinetic perimetry (GP) at the age of 32 years. GP shows bilateral central scotomas of the I-3e and I-4e isopters with relative sparing of the center,

but with preserved peripheral visual fields of the V-4e and I-4e isopters in both eyes

**Fig. 4** Full-field electroretinography (ERG) at the age of 32 years. ERG shows that the rod, standard combined, cone, and 30-Hz flicker responses are bilaterally reduced to about one-third of those in a control, but the peak implicit time of each response is not delayed



RetNet database (<https://sph.uth.edu/retnet/>). Based on the obtained data, known *EYS* mutations were identified in a compound heterozygous state as disease-causing mutations. In the other 206 genes, there were no mutations found in compound heterozygous or homozygous states. The identified *EYS* gene mutations were c.C8805A and c.4957dupA, which result in the truncating mutations p.Y2935X and p.S1653KfsX2, respectively. The findings were confirmed by Sanger sequencing. The patient's unaffected parents were heterozygous for each mutation. The compound heterozygous mutations (p.Y2935X and p.S1653KfsX2) have been previously reported as a cause of arRP [7]. The accession number of the *EYS* mRNA reference sequence we used was NM\_001142800.1 from the National Center for Biotechnology Information.

## Discussion

In this report, whole-exome sequencing analysis identified *EYS* mutations in a Japanese patient with arCRD. *EYS* mutations have previously only been reported in patients with arRP [1, 2]. This is the first report that describes arCRD associated with compound heterozygous mutations in the *EYS* gene.

Previous studies have revealed that the *EYS* protein is expressed specifically in the human retina and is

localized in the outer segment of the photoreceptor layers of the porcine retina [1, 2]. Although the function and structure of human *EYS* protein remain unclear, it has been suggested to be essential for photoreceptor morphogenesis [2]. In fact, *EYS* mutations give rise to RP phenotypes with thinning of the outer retinal layers [5, 7], which results from the degeneration of both the rod and cone photoreceptors. Clinical features of patients with *EYS* mutations include a typical form of RP that is characterized by a progressive constricted visual field, bone pigmentations and attenuation of the retinal vessels [3–5]. The pattern of the ERG in RP patients shows non-recordable or markedly decreased responses [3–5]. On the other hand, our patient exhibited retinal degenerations that were predominantly seen within the vascular arcades (Fig. 5a, b), central scotomas and preserved peripheral visual fields (Fig. 3), and decreased responses in the both rod and cone ERG (Fig. 4) in both eyes. Generally, CRD exhibits several features such as decreased central vision, a predominant degeneration of the macular region as compared with the mid-peripheral region, and decreased amplitudes in the cone ERG that are equal to or worse than the decreased rod ERG amplitudes [10, 11]. These characteristics of CRD were clearly consistent with the phenotype of our patient. Taken together, these findings indicated that the patient diagnosis was arCRD and not arRP.

文 献

- 1) 三宅養三：黄斑ジストロフィー. 日眼会誌 107 : 229-241, 2003
- 2) Walia S, Fishman GA : Natural history of phenotypic changes in Stargardt macular dystrophy. *Ophthalmic Genet* 30 : 63-68, 2009
- 3) Gass JDM : Stargardt's disease (fundus flavimaculatus). In : *Stereoscopic Atlas of Macular Diseases : Diagnosis and Treatment*. 328-331. Mosby, 1997
- 4) Kaplan J, Gerber S, Larget-Piet D et al : A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. *Nat Genet* 5 : 308-311, 1993
- 5) Allikmets R, Singh N, Sun H et al : A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 15 : 236-246, 1997
- 6) Rotenstreich Y, Fishman GA, Anderson RJ : Visual acuity loss and clinical observations in a large series of patients with Stargardt disease. *Ophthalmology* 110 : 1151-1158, 2003
- 7) Fishman GA, Farber M, Patel BS et al : Visual acuity loss in patients with Stargardt's macular dystrophy. *Ophthalmology* 94 : 809-814, 1987
- 8) Lois N, Holder GE, Bunce C et al : Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol* 119 : 359-369, 2001
- 9) Lois N, Halfyard AS, Bird AC et al : Fundus autofluorescence in Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Am J Ophthalmol* 138 : 55-63, 2004
- 10) Gomes NL, Greenstein VC, Carlson JN et al : A comparison of fundus autofluorescence and retinal structure in patients with Stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 : 3953-3959, 2009
- 11) Cideciyan AV, Swider M, Aleman TS et al : *ABCA4*-associated retinal degenerations spare structure and function of the human parapapillary retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46 : 4739-4746, 2005
- 12) Gass JDM : Best's Disease. In : *Stereoscopic Atlas of Macular Diseases : Diagnosis and Treatment*. 304-308. Mosby, 1997
- 13) Boon CJ, Klevering BJ, Leroy BP et al : The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the *BEST1* gene. *Prog Retin Eye Res* 28 : 187-205, 2009
- 14) Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B et al : Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet* 19 : 241-247, 1998
- 15) Marmorstein AD, Marmorstein LY, Rayborn M et al : Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (*VMD2*), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 12758-12763, 2000
- 16) Bakall B, Radu RA, Stanton JB et al : Enhanced accumulation of A2E in individuals homozygous or heterozygous for mutations in *BEST1* (*VMD2*). *Exp Eye Res* 85 : 34-43, 2007
- 17) Renner AB, Tillack H, Kraus H et al : Morphology and functional characteristics in adult vitelliform macular dystrophy. *Retina* 24 : 929-939, 2004
- 18) Burgess R, Millar ID, Leroy BP et al : Biallelic mutation of *BEST1* causes a distinct retinopathy in humans. *Am J Hum Genet* 82 : 19-31, 2008

\*

\*

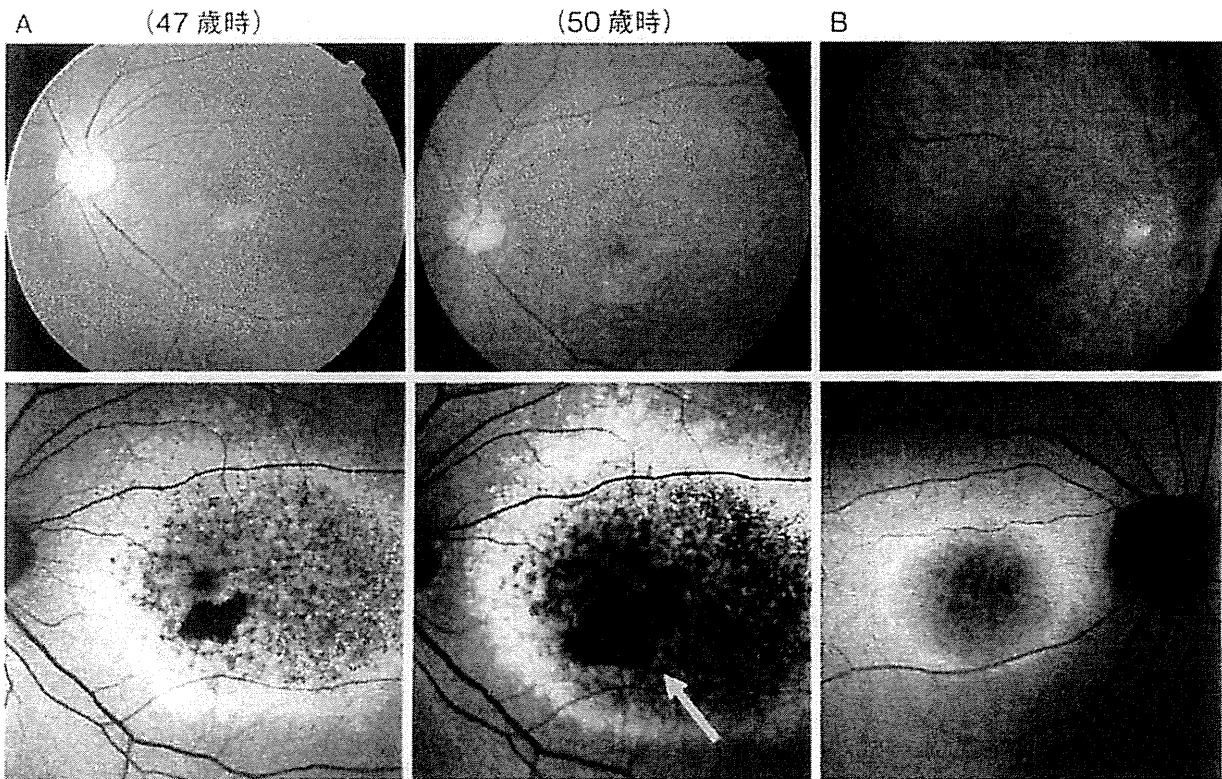


図4 AFが診断に効果的であった黄斑ジストロフィ

A: 50歳女性。47歳時に中心視野の一部が欠けていることに気が付いた。50歳時の矯正視力は右1.2、左0.9。眼底写真では黄斑部の耳側を中心にびまん性の色素上皮萎縮を認める。AFでは、過蛍光、低蛍光の混在した変性領域が黄斑部を取り囲み、変性周囲には輪状の過蛍光領域が認められる。中心窩の下方は萎縮により自発蛍光が消失している。AFを用いると、中心窩に隣接した萎縮部が経過観察中に拡大していることが明瞭に観察される(矢印)。  
 B: 62歳女性。30歳頃から両眼の視力が徐々に低下し、他院で視神経障害と診断されていた。矯正視力は右0.3、左0.3。眼底写真では明らかな黄斑変性はみられないが、AFでは黄斑部に低蛍光領域、およびその周囲に境界明瞭な輪状過蛍光を認め、視力低下の原因が黄斑ジストロフィであることが判明した。

斑ジストロフィを分別できるほど特異的なものではない。

しかしそれでも、黄斑ジストロフィの診断にAFを用いることの意義は大きい。ひとつは疾患の縦時的变化を比較することで、AFを用いると検眼鏡的検査では困難な病変の空間的变化を詳細に捉えることができる(図4A)。また眼底がほぼ正常に見える患者においてもAFによって黄斑部の病変が明らかになることがあり、黄斑部病変のスクリーニングとしての意義は大きい(図4B)。

## おわりに

「黄斑ジストロフィと自発蛍光」と題して、代表的な2つの疾患、スターガルト病とベスト病についてそれぞれのAF所見を紹介した。黄斑ジストロフィの画像診断には、従来よりFAが重要な役割を担ってきたが、網脈絡膜の血管異常が主病変でない場合には、むしろAFのほうが診断に有用であることも多い。今後、黄斑ジストロフィを含めた網膜疾患に対して、眼科診療におけるAF撮影の価値はますます高まっていくものと思われる。

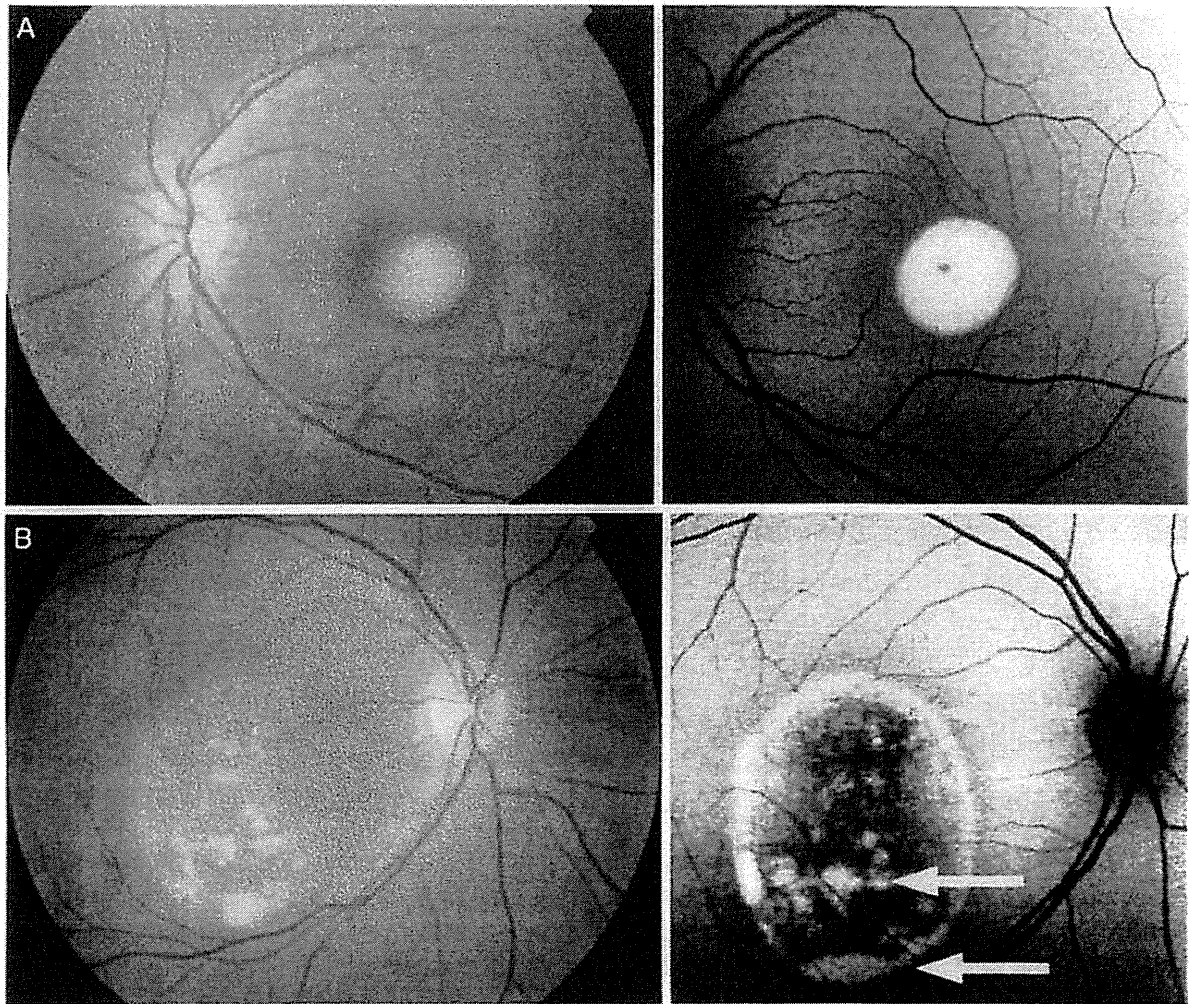


図3 ベスト病の眼底写真および眼底自発蛍光(AF)

A: 卵黄期の8歳男児。矯正視力、右1.0、左1.0。  
 眼底写真では黄斑部に卵黄様物質の沈着を認める(左)。AFでは卵黄様物質の部位に一致した過蛍光を認める(右)。  
 B: 炒り卵期の45歳男性。矯正視力、右0.3、左0.15。  
 眼底写真では黄斑部の橋円形病変部と、その内部に散在する網膜下沈着物を多数認める(左)。AFでは沈着物、および橋円形病変部の辺縁に過蛍光を認める(右、矢印)。

常を呈し、EOGは重度の異常を呈する。

なお、成人期に発症するタイプもしばしばみられ、成人発症卵黄様黄斑変性症(adult vitelliform macular dystrophy)と呼ばれている。眼底所見はベスト病に類似しているがEOGが正常であることが多く、機能的にはベスト病とは異なる病態生理をもつ疾患であると認識されている<sup>14)15)</sup>。

AFについては、黄色部病変(リポフスチン様物質)の存在に一致して過蛍光を呈する(図3)。黄色部が不鮮明であっても、AFの過蛍光

は病変部の辺縁に明瞭に観察することができる(図3B)。さらに病期が進行して網膜色素上皮が萎縮した場合、その部位は低蛍光となる。

### III. その他の黄斑ジストロフィ

黄斑ジストロフィの原因は「はじめに」で述べたように多様であり、特徴的な一部の疾患を除いて、検眼鏡的所見やAF所見のみで遺伝学的な原因を類推することは困難である。すなわちAFでみられる異常所見は、一般に各種の黄



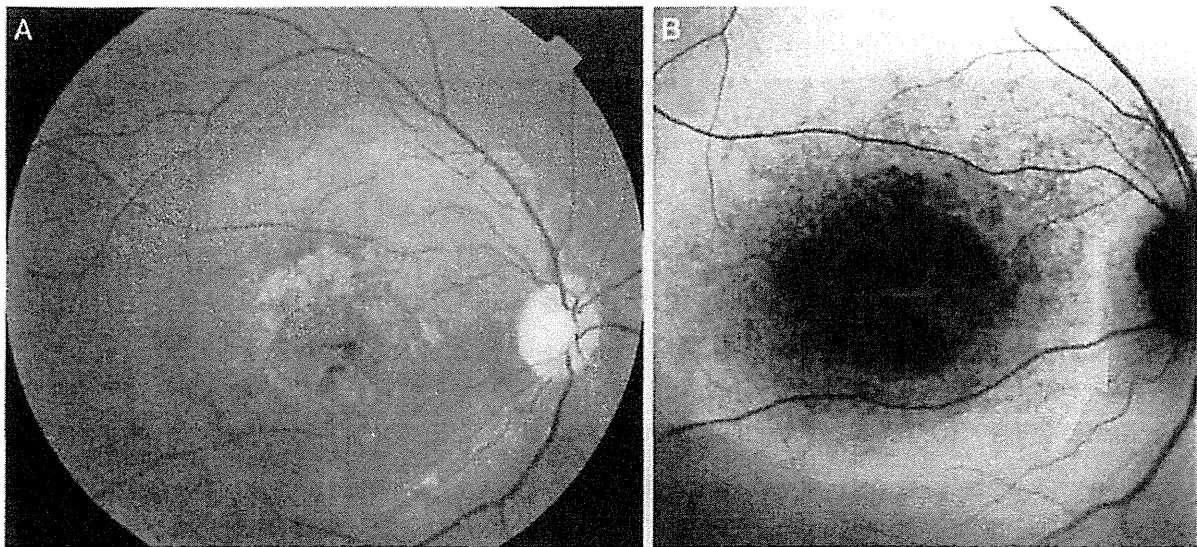


図2 スターガルト病(11歳, 女児)の眼底写真および眼底自発蛍光(AF)

A: 眼底写真。後極部に広範囲の変性を認める。特に黄斑部では萎縮が進行している。

B: AF。後極部変性部位の外周に輪状の過蛍光を認める。黄斑部では萎縮により自発蛍光が消失している。また、視神経乳頭周囲には輪状の正常領域(peripapillary sparing)を認める(矢印)。

この患者は7歳時に視力低下を自覚している。11歳時の矯正視力は右0.08, 左0.15であった。遺伝子検査では、*ABCA4* 遺伝子に複合ヘテロ変異を認めた。

蛍光を認める<sup>9,10)</sup>(図1)。また、進行に伴う fleck の増加、ならびに黄斑部変性領域の拡大は、検眼鏡的検査やOCTよりも、AFを用いることでより明瞭に観察できる。さらに、スターガルト病に特徴的とされる peripapillary sparing の所見も、AFを用いると容易に観察が可能となる<sup>11)</sup>。Peripapillary sparingとは視神経乳頭周囲部分の感覚網膜、網膜色素上皮の構造、機能が局所的に温存される所見を示し、後極部網膜全域に病変が広がっている症例においても、乳頭周囲のAF所見が正常に見える(図2, 矢印)。

## II. ベスト病(Best disease)

卵黄状黄斑ジストロフィ(vitelliform macular dystrophy)とも呼ばれる、常染色体優性遺伝の黄斑ジストロフィである。眼底所見が特徴的で、黄斑部に「卵黄様」と呼ばれる黄色円形病変を認める<sup>12)</sup>。学童期に視力低下を主訴に発症することが多いが、眼底所見の割に視力低下

が軽度の症例もある。全視野ERGは正常であるが、眼球電図(EOG)では基礎電位の低下、Arden比の低下が顕著にみられる<sup>13)</sup>。原因遺伝子として*BEST1*が同定されている<sup>14)</sup>。*BEST1*は主に網膜色素上皮の基底膜に存在する蛋白質、ベストロフィン(bestrophin)をコードしており<sup>15)</sup>、網膜色素上皮の機能障害によりEOGの顕著な異常が認められると考えられている。

黄斑部にみられる黄色物質は網膜色素上皮のリポフスチン様物質と考えられており<sup>16)</sup>、年齢とともに眼底像が変化する。眼底にほとんど異常を認めない前卵黄期、眼底に卵黄様物質が沈着する卵黄期(図3A)、卵黄が崩れて下方に貯留する偽蓄膿期、黄色斑がまだらになる炒り卵期(図3B)、黄斑部に萎縮性変化をきたす萎縮期の5期を経るとされている<sup>12)</sup>。

また最近では、同じ*BEST1*遺伝子異常による常染色体劣性遺伝のベストロフィノパシー(autosomal recessive bestrophinopathy: ARB)という疾患概念が報告されている<sup>17)</sup>。ARBでは全視野ERGは杆体系、錐体系ともに軽度異

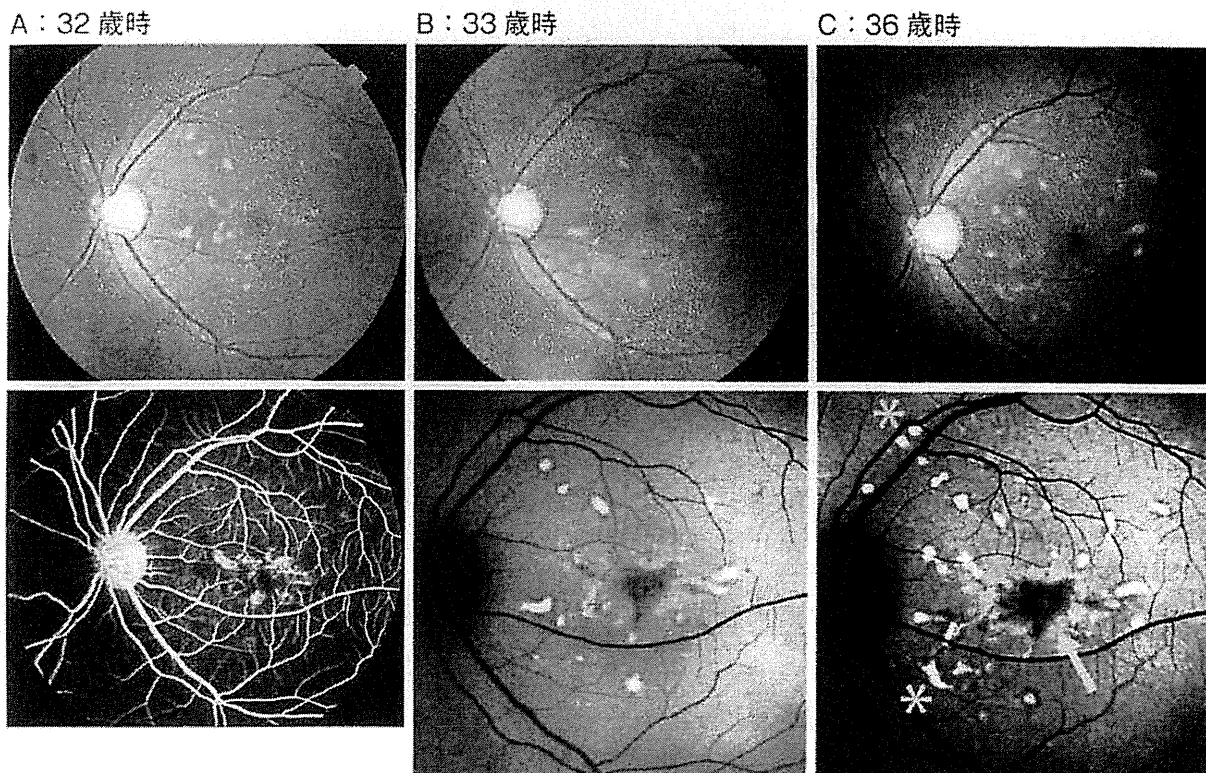


図1 スターガルト病(36歳男性)の眼底写真、フルオレセイン蛍光眼底造影(FA)および眼底自発蛍光(AF)  
 A: 32歳時の眼底写真(上)およびFA。黄斑部の萎縮と、その周囲に散在する黄色斑(fleck)を認める。FAではdark choroidと黄斑萎縮に一致したwindow defectによる過蛍光を認める。  
 B, C: 同患者の33歳時および36歳時の眼底写真(上)およびAF(下)。AFでは、黄色斑に一致した過蛍光および黄斑萎縮に一致した低蛍光を認める。背景の輝度は全体的に高い。33歳時と36歳時でAF所見を比較すると、黄斑萎縮部の拡大(矢印)および黄色斑の新たな出現(\*)が明瞭に観察される。  
 この患者は30歳時に初めて視力低下を自覚している。36歳時の矯正視力は右0.5、左0.4であった。遺伝子検査では、ABCA4遺伝子に2つの異なる変異を認めた。

## 1. スターガルト病(Stargardt disease)

比較的頻度の高い常染色体劣性遺伝の黄斑ジストロフィである。若年者に発症する黄斑部の感覚網膜、網膜色素上皮(retinal pigment epithelium: RPE)の萎縮病変、その周囲に散在する多発性黄色斑(fleck)を特徴とする疾患である<sup>2,3)</sup>。かつては黄斑萎縮が軽度でfleckを顕著に認める黄色斑眼底(fundus flavimaculatus)とは別疾患と考えられていたが、後に両者とも原因遺伝子がABCA4で同一の遺伝子異常であることが確認され<sup>4,5)</sup>、現在では同一疾患と考えられている。10歳代までに自覚する両眼の視

力低下、中心暗点などを主訴に来院することが多い。発症年齢が20歳以上であれば視力予後が比較的良いとされる<sup>6)</sup>。FAではリポフスチンの蓄積により背景蛍光がブロックされる低蛍光所見(dark choroid)が約半数の症例にみられるほか<sup>7)</sup>、黄斑萎縮に一致したwindow defectによる過蛍光、fleck部分での過蛍光が特徴的所見である。全視野ERG所見は、錐体系、杆体系ともに正常のものから、錐体系にのみ異常のみられるもの、錐体系、杆体系ともに傷害されるものなど、重症度によってさまざまである<sup>8)</sup>。

AF所見については、典型例では背景過蛍光、黄斑萎縮部位の低蛍光、fleck部に一致した異常

### 3. 黄斑ジストロフィと自発蛍光

— Fundus autofluorescence imaging in macular dystrophy —

角田 和 繁\* 藤 波 芳\*

#### はじめに

黄斑ジストロフィは両眼性、進行性の機能障害を網膜黄斑部にきたす疾患の総称であり、多くのものが遺伝性と考えられている。さまざまな臨床所見を呈するため、臨床診断にあたっては検眼鏡的所見、フルオレセイン蛍光眼底造影 (fluorescein angiography : FA)、光干渉断層計 (optical coherence tomography : OCT)、網膜電図 (ERG)、眼電位図 (EOG) などの電気生理学的検査を含む眼科的検査を包括的に行う必要がある<sup>1)</sup>。眼底自発蛍光 (fundus autofluorescence : AF) は主に網膜色素上皮細胞内のリポフスチンに由来し、その輝度の変化により網膜色素上皮のさまざまな病態が画像に反映される。AF は FA とは異なり非侵襲的であるため、近年は黄斑ジストロフィの診断においてもその利用価値が高く認められている。

近年黄斑ジストロフィを呈する疾患については、特徴的な眼底所見による分類よりも分子遺伝学的な病因分類が重要視されてきている。黄

斑ジストロフィの関連遺伝子としては、*ABCA4* (スターガルト病)、*BEST1* (ベスト病)、*RS1* (X染色体性若年網膜分離症)、*RP11* (オカルト黄斑ジストロフィ：三宅病)、*PRPH2*、*PROM1*、*CRX*、*GUCY2D*、*GUCA1A*、*RPGR*、*KCNV2*、*RDH5* 等、多くの遺伝子が報告されている。

AF は網膜の異常を検出するための感度は非常に高いものの、上記の疾患群を分類するための特異度は決して高くない。このため AF を黄斑ジストロフィの診断に用いる目的は、一般に黄斑部に異常があるか否かの判定 (スクリーニング)、病巣の空間的広がり の把握、進行程度 の評価などが中心となる。

黄斑ジストロフィにおける AF 読影の基本は、他の疾患と大きな違いはない。すなわち、初期の病変においては過蛍光となり、網膜色素上皮機能の低下とともに自発蛍光が低下し、完全な萎縮に至ると蛍光は消失する。特に進行期においては正常領域と病的領域の境界が過蛍光となり、黄斑部を取り囲む輪状の高輝度病変を呈することが多い。

本稿では、黄斑ジストロフィのなかから、特にスターガルト病、ベスト病を取り上げ、AF 画像を提示する。またそれ以外に、AF が診断に有効である黄斑ジストロフィ症例について紹介する。

\* Kazushige TSUNODA, Kaoru FUJINAMI 東京医療センター・臨床研究センター (感覚器センター) 視覚研究部 (東京都目黒区)

Key words : fundus autofluorescence, macular dystrophy, Stargardt disease, Best disease

視力低下を訴える 66 歳女性で、検眼鏡的所見、蛍光眼底造影所見に異常がみられない。全視野 ERG では杆体系、錐体系ともに正常反応で、黄斑部局所 ERG の反応が消失しておりオカルト黄斑ジストロフィと診断される。RP1L1 遺伝子には原因と考えられる変異が認められなかった。OCT における異常所見は中心小窩でみられる ISe ラインの部分欠損のみであり、RP1L1 遺伝子変異をもつ症例の OCT 所見とは明らかに異なっている。電気生理学的に診断されるオカルト黄斑ジストロフィには、病因を異にする複数の疾患が関与している可能性が考えられる。



## まとめ

オカルト黄斑ジストロフィは、眼底所見および全視野 ERG が正常であるため、多くの患者が原因不明の視神経疾患、弱視、非器質性（心因性）視力障害などと診断されてきた。黄斑部の機能低下は多局所 ERG や黄斑部局所 ERG によって容易に検出できるが、一般眼科においてそれらを施行することは困難と思われる。ただし、フリーエドメイン OCT を観察することで黄斑部の異常を容易に検出できるため、早期から正確な診断に近

づける可能性は格段に高くなったと思われる。

## 文献

- 1) Miyake Y, Ichikawa K, Shiose Y et al : Hereditary macular dystrophy without visible fundus abnormality. *Am J Ophthalmol* 108 : 292-299, 1989
- 2) Miyake Y, Horiguchi M, Tomita N et al : Occult macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 122 : 644-653, 1996
- 3) Akahori M, Tsunoda K, Miyake Y et al : Dominant Mutations in RP1L1 Are Responsible for Occult Macular Dystrophy. *Am J Hum Genet* 87 : 424-429, 2010
- 4) Tsunoda K, Usui T, Hatase T et al : Clinical characteristics of occult macular dystrophy in family with mutation of RP1L1 gene. *Retina* 32 : 1135-47, 2012
- 5) Kabuto T, Takahashi H, Goto-Fukuura Y et al : A new mutation in the RP1L1 gene in a patient with occult macular dystrophy associated with a depolarizing pattern of focal macular electroretinograms. *Molecular vision* 18 : 1031-1039, 2012
- 6) Ahn SJ, Cho SI, Ahn J et al : Clinical and genetic characteristics of Korean occult macular dystrophy patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54 : 4856-4863, 2013
- 7) Davidson AE, Sergouniotis PI, Mackay DS et al : RP1L1 variants are associated with a spectrum of inherited retinal diseases including retinitis pigmentosa and occult macular dystrophy. *Hum Mutat* 34 : 506-514, 2013
- 8) Fujinami K, Tsunoda K, Hanazono G et al : Fundus Autofluorescence in Autosomal Dominant Occult Macular Dystrophy. *Arch. Ophthalmol* 129 : 597-602, 2011

## MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

<眼科臨床エキスパート>

# 所見から考えるぶどう膜炎

シリーズ編集 吉村長久・後藤 浩・谷原秀信・天野史郎

編集 園田康平・後藤 浩

●B5 頁308 2013年  
定価：本体15,000円＋税  
ISBN978-4-260-01738-1

眼科診療のエキスパートを目指すための新シリーズの1冊。ぶどう膜炎の診断には、患者背景の把握や様々な検査結果の解釈に加え、眼所見を正確に評価し、その所見を診断に結びつける洞察力が重要である。本書ではぶどう膜炎の診断に直結するような所見につき、実際の症例写真を多数提示し、「この所見をみた時は何を考えるべきか」「どのような疾患を疑うべきか」にポイントを置いた。すべての眼科医必携のテキスト&アトラス。

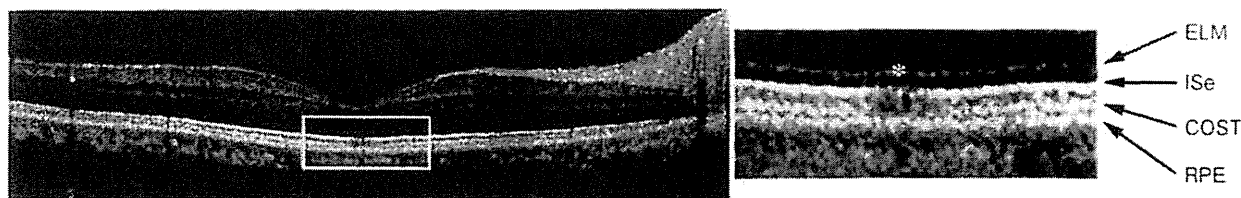


図3 *RP1L1* 変異のない、孤発例のオカルト黄斑ジストロフィ (66歳、女性)  
 症状経過および電気生理学的検査所見からオカルト黄斑ジストロフィと診断されるが、OCTにおける異常所見は中心小窩における ISe ラインの部分欠損のみであり、優性遺伝の典型例とは異なっている。*RP1L1* 変異のない症例の OCT 所見には、このほかにもいくつかのパターンがみられる。

われ、オカルト黄斑ジストロフィには *RP1L1* 遺伝子を原因とするタイプの他に、異なる原因による疾患群が含まれていると考えられる。

## Practice

### オカルト黄斑ジストロフィの検査所見

#### ① 自覚的検査

矯正視力は、通常は運転免許の取得に問題の生じる 0.7 未満に低下してから受診するが多い。他の黄斑ジストロフィと異なり網膜色素上皮の萎縮をきたすことがないため、最終視力が 0.1 を下回るケースはない。80 歳の時点でも 1.0 の視力を維持している患者もおり、進行には大きな個体差がある<sup>4)</sup>。

視野検査では中心比較暗点が検出されるが、Goldmann 動的視野計でも進行例を除いて異常を検出できないことも多い。軽症例では、Humphrey 自動視野計「中心 30-2」でも中心比較暗点が明瞭に検出できず、「中心 10-2」でようやく暗点が検出される例も多い。黄斑部以外の周辺視野は進行例でも正常に保たれている。

#### ② 他覚的検査

検眼鏡的所見 (図 1a)、フルオレセイン蛍光眼底造影、インドシアニングリーン蛍光眼底造影ともに正常である。眼底自発蛍光は正常であることが多いが (図 1b)、近視の強い症例や長期間罹患している症例では中心小窩に軽度の過蛍光を認めることがある<sup>5)</sup>。ただし、他の黄斑ジストロフィ、

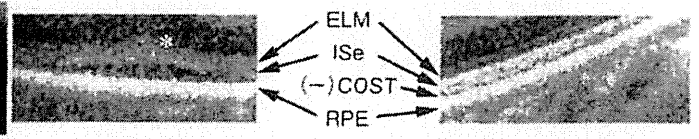
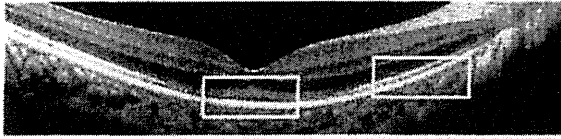
錐体・杆体ジストロフィ、Stargardt 病などに特徴的な強い過蛍光や低蛍光などの異常所見はみられない。

全視野 ERG では、杆体系、錐体系反応ともに正常に記録されるが、黄斑部局所 ERG あるいは多局所 ERG で黄斑部の反応が減弱しており、これがオカルト黄斑ジストロフィの確定診断となる。

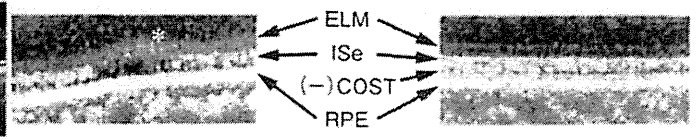
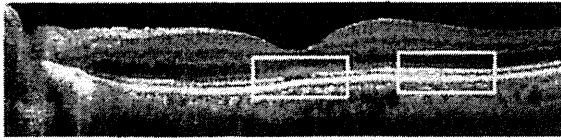
遺伝子検査で診断が確定したオカルト黄斑ジストロフィでは、OCT で特徴的な黄斑部の網膜外層構造異常が観察される (図 1c)<sup>4)</sup>。すなわち、黄斑部に限局した錐体視細胞外節先端部 (cone outer segment tip: 以下、COST) ラインの消失、視細胞内節 ellipsoid ライン (ISe ライン; 別称 IS/OS 接合部ライン) の不明瞭化などである。また、OCT の所見は発症から長期間経過するにつれて次第に変化していく (図 2)<sup>4)</sup>。すなわち、発症から 10~20 年ほどまでは中心窩の COST ラインの消失、および ISe ラインの境界不明瞭化 (厚く、膨潤したように見える) がみられるものの、中心窩網膜厚はほぼ正常である。さらに長期間経過すると、中心窩で ISe ラインの分断がみられるようになり、外顆粒層は徐々に菲薄化していく。一方、黄斑部以外の視細胞構造は長期間経過しても正常である (図 2)。ただし COST ラインについては、高度近視、光量不足、固視不良など測定条件が悪い場合、正常者でも明瞭に観察されないことがあるので注意が必要である。

一方、家族歴のない孤発例のオカルト黄斑ジストロフィには、上記と全く異なる OCT 所見を示す症例も多い。図 3 は両眼にゆつくりと進行する

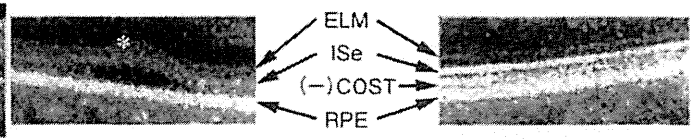
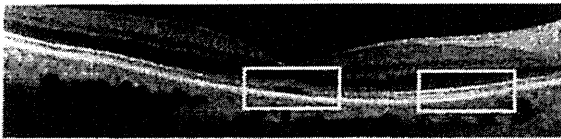
①自覚症状出現から 10 年 (57 歳女性)



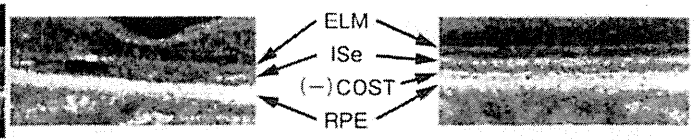
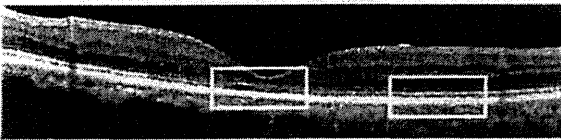
②自覚症状出現から 26 年 (81 歳女性)



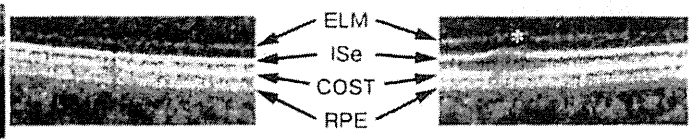
③自覚症状出現から 41 年 (69 歳男性)



④自覚症状出現から 63 年 (83 歳男性)



a



b

健常者 (22 歳, 女性)

図 2 *RP1L1* 変異を有するオカルト黄斑ジストロフィ患者 (*RP1L1*, p.Arg45Trp, heterozygous) (a) における、推定罹患期間 (視力低下を自覚し始めてからの期間) による OCT 所見の違い

発症から 20 年ほどまでは、中心窩の COST ラインの消失および ISe ラインの境界不明瞭化がみられるものの、中心窩網膜厚はほぼ正常である。さらに長期間経過すると、中心窩で ISe ラインの分断がみられるようになり、外顆粒層が菲薄化していく。一方、黄斑部以外の視細胞構造は長期間経過しても正常である。中心窩と黄斑部周囲の画像を右に拡大で示した。

b: 健常者 (22 歳, 女性) の所見。

ていく。両眼がほぼ同時に進行する例が多いが、自覚症状の出現や視力低下の進行が左右眼で数年以上異なるケースもある。根本的な治療法はないが、ほとんどの患者は拡大鏡などを用いることにより日常の読み書きをこなしている。周辺視野は末期でも正常に保たれるため、歩行時に大きな困難はきたさない。



### 三宅病の原因は？

2010 年に東京医療センターを中心とした研究グループにより、優性遺伝タイプのオカルト黄斑ジストロフィの原因遺伝子として 8 番短腕に位

置する *RP1L1* が同定された<sup>3)</sup>。その後、国内外においても同様の遺伝子異常の報告がなされている<sup>5~7)</sup>。ヒトにおける *RP1L1* の機能はいまだ完全に解明されていない。これまでの研究では、霊長類では錐体および杆体視細胞の特に内節に発現しており、視細胞内節・外節の構造維持、細胞内輸送に大きな役割を果たしていると考えられている。当院におけるこれまでの調査では、優性遺伝家系のオカルト黄斑ジストロフィにおいてはほぼ全例で *RP1L1* 遺伝子の変異が確認できる。ただし、孤発例の症例のなかには *RP1L1* 遺伝子に異常がみられない症例や、後述するように OCT 所見が典型的なタイプと異なる症例も含まれる。すな

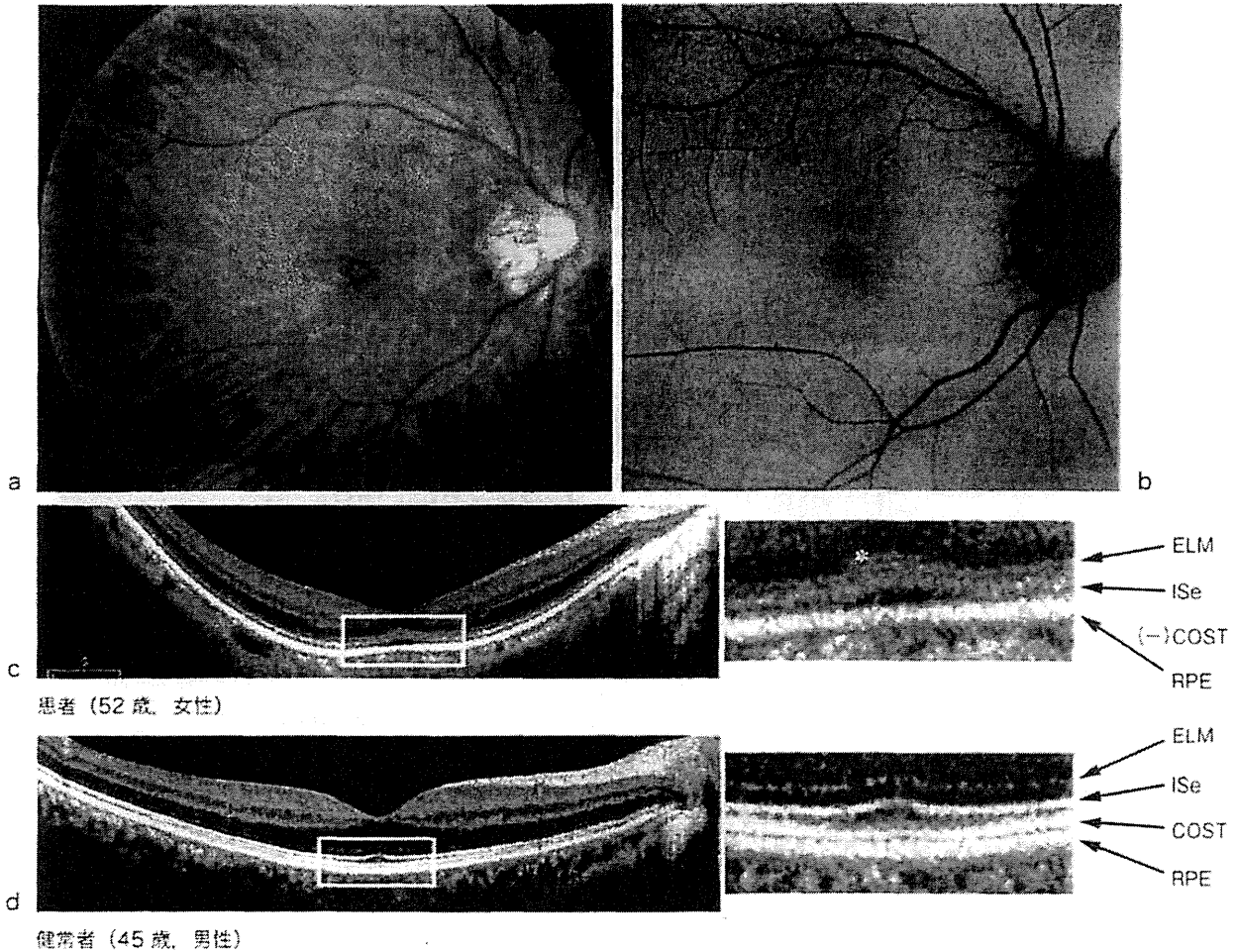


図 1 オカルト黄斑ジストロフィの所見

オカルト黄斑ジストロフィ患者 (52 歳, 女性, *RP1L1* p.Arg45Trp heterozygous) の眼底写真 (a), 眼底自発蛍光 (b) および OCT 所見 (c)。矯正視力は左右とも 0.15。d は健常者 (45 歳, 男性) の OCT 所見。眼底写真および眼底自発蛍光では異常を認めない。OCT では, 黄斑部で COST ラインが消失し, さらに中心窩の ISe ラインが不明瞭となっている (\*)。網膜色素上皮は正常である。なお, この患者は -9.0D 程度の高度近視のため, COST ラインは後極部全体で不明瞭となっている。



### オカルト黄斑ジストロフィの症状 および経過

オカルト黄斑ジストロフィとは, 1989 年に名古屋大学の三宅養三<sup>1)</sup>によって「眼底所見に異常の見られない家族性黄斑症」として初めて紹介された疾患である。その後, 正常な眼底所見によって網膜の異常が隠されていることから, オカルト (occult = 目に見えない) 黄斑ジストロフィと命名された<sup>2)</sup>。さらに発見からほぼ 20 年を経過した 2010 年には, 本疾患の原因遺伝子として 8 番染色

体短腕に *RP1L1* (retinitis pigmentosa 1 like-1) が特定された<sup>3)</sup>。現在では発見者の名前から「三宅病 (Miyake's disease)」と呼ばれることもある。

黄斑部, 特に中心窩の視細胞機能が局所的に低下するため, 視力低下および中心比較暗点が主な症状である。視力障害は徐々に進行し, 最終的に 0.1~0.2 程度まで低下することがある<sup>4)</sup>。羞明を訴える患者も多い。進行は非常にゆっくりであるため, 自覚症状の出るかなり以前から黄斑部の機能低下は始まっていると考えられる。自覚症状を訴える時期は 10 歳ごろ~60 歳以上までと非常に幅があり, 両眼の視力がきわめてゆっくりと低下し

# 何が見える？ 何がわかる？

# OCT

Series  
**2**  
応用編

責任編集：寺崎浩子 (名古屋大学)

編集：本誌編集委員会

第 16 回

## オカルト黄斑ジストロフィ (三宅病) の OCT 所見

角田和繁 東京医療センター

### Point

- オカルト黄斑ジストロフィは検眼鏡的所見に異常がなく、しばしば視神経疾患などと間違われる。
- 詳細な ERG 検査によって確定診断が可能である。
- OCT を用いると、黄斑部視細胞層構造の異常がほぼ全例で確認できる。

### Basic Lecture



### 眼底検査で異常が見つからない網膜疾患

視力不良を訴える患者において前眼部検査や眼底検査で異常が見つからないとき、通常は視神経疾患、頭蓋内疾患、弱視、あるいは非器質性（心因性）視力障害などを疑い、さらに詳細な検査を行うことが多い。しかし、検眼鏡的所見に異常がみられない網膜疾患は決して稀ではなく、初診時に網膜疾患を除外してしまうと最終診断を誤る可能性が非常に高くなる。具体的には、一部の錐体ジストロフィ、初期の網膜色素変性、先天性停止

性夜盲症、急性帯状潜在性網膜外層症 (acute zonal occult outer retinopathy: AZOOR)、初期の癌関連網膜症、悪性黒色腫関連網膜症、回復期の網膜血管閉塞症、一部の薬剤性網膜障害（ジゴキシン、タモキシフェン、クロロキン）など、多岐にわたる。これらの疾患の多くは杆体系あるいは錐体系 ERG (electroretinogram) において何らかの異常をきたすことが多いが、なかでも全視野 ERG に全く異常がみられず診断が困難であるのがオカルト黄斑ジストロフィである。

### OCT Findings in Occult Macular Dystrophy, Miyake's Disease

Kazushige Tsunoda 東京医療センター・臨床研究センター（感覚器センター）視覚研究部

別刷請求先：角田和繁（つのだ・かずしげ）〒152-8902 東京都目黒区東が丘 2-5-1 東京医療センター・臨床研究センター（感覚器センター）視覚研究部



## Footnotes and Financial Disclosures

---

Originally received: January 11, 2013.

Final revision: April 17, 2013.

Accepted: April 17, 2013.

Available online: June 12, 2013.

Manuscript no. 2013-68.

<sup>1</sup> UCL Institute of Ophthalmology, London, United Kingdom.

<sup>2</sup> Moorfields Eye Hospital, London, United Kingdom.

<sup>3</sup> National Institute of Sensory Organs, National Tokyo Medical Center, Tokyo, Japan.

<sup>4</sup> Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

Financial Disclosure(s):

The author(s) have no proprietary or commercial interest in any materials discussed in this article.

Supported by grants from the National Institute for Health Research Biomedical Research Center at Moorfields Eye Hospital NHS Foundation Trust and UCL Institute of Ophthalmology, Foundation Fighting Blindness Columbia, MD, Fight For Sight, Moorfields Eye Hospital Special Trustees, Macular Disease Society, Suzuken Memorial Foundation, Mitsukoshi Health and Welfare Foundation, and Daiwa Anglo-Japanese Foundation. M.M. is supported by a Foundation Fighting Blindness Career Development Award. The sponsor or funding organizations had no role in the design or conduct of this research.

Correspondence:

Andrew R. Webster, MD, FRCOphth, UCL Institute of Ophthalmology, 11-43 Bath St., London EC1V 9EL, United Kingdom. E-mail: andrew.webster@ucl.ac.uk.

5. Allikmets R, Singh N, Sun H, et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997;15:236–46.
6. Cremers FP, van de Pol DJ, van Driel M, et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene *ABCR*. *Hum Mol Genet* 1998;7:355–62.
7. Rozet JM, Gerber S, Souied E, et al. Spectrum of *ABCR* gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *Eur J Hum Genet* 1998;6:291–5.
8. Fishman GA, Stone EM, Grover S, et al. Variation of clinical expression in patients with Stargardt dystrophy and sequence variations in the *ABCR* gene. *Arch Ophthalmol* 1999;117:504–10.
9. Lewis RA, Shroyer NF, Singh N, et al. Genotype/phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, *ABCR*, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 1999;64:422–34.
10. Briggs CE, Rucinski D, Rosenfeld PJ, et al. Mutations in *ABCR* (*ABCA4*) in patients with Stargardt macular degeneration or cone-rod degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2229–36.
11. Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, et al. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene *ABCR* [letter]. *Nat Genet* 1998;18:11–2.
12. Burke TR, Fishman GA, Zernant J, et al. Retinal phenotypes in patients homozygous for the G1961E mutation in the *ABCA4* gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:4458–67.
13. Burke TR, Tsang SH. Allelic and phenotypic heterogeneity in *ABCA4* mutations. *Ophthalmic Genet* 2011;32:165–74.
14. Schindler EI, Nylen EL, Ko AC, et al. Deducing the pathogenic contribution of recessive *ABCA4* alleles in an outbred population. *Hum Mol Genet* 2010;19:3693–701.
15. Zernant J, Schubert C, Im KM, et al. Analysis of the *ABCA4* gene by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:8479–87.
16. Fishman GA, Stone EM, Eliason DA, et al. *ABCA4* gene sequence variations in patients with autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Arch Ophthalmol* 2003;121:851–5.
17. Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, et al. Mutations in the *ABCA4* (*ABCR*) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am J Hum Genet* 2000;67:960–6.
18. Rivera A, White K, Stohr H, et al. A comprehensive survey of sequence variation in the *ABCA4* (*ABCR*) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 2000;67:800–13.
19. Simonelli F, Testa F, Zernant J, et al. Genotype-phenotype correlation in Italian families with Stargardt disease. *Ophthalmic Res* 2005;37:159–67.
20. Cella W, Greenstein VC, Zernant-Rajang J, et al. G1961E mutant allele in the Stargardt disease gene *ABCA4* causes bull's eye maculopathy. *Exp Eye Res* 2009;89:16–24.
21. Aguirre-Lamban J, Gonzalez-Aguilera JJ, Riveiro-Alvarez R, et al. Further associations between mutations and polymorphisms in the *ABCA4* gene: clinical implication of allelic variants and their role as protector/risk factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6206–12.
22. Wiszniewski W, Zaremba CM, Yatsenko AN, et al. *ABCA4* mutations causing mislocalization are found frequently in patients with severe retinal dystrophies. *Hum Mol Genet* 2005;14:2769–78.
23. Maugeri A, van Driel MA, van de Pol DJ, et al. The 2588G>C mutation in the *ABCR* gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of *ABCR* mutations in patients with Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 1999;64:1024–35.
24. Westeneng-van Haaften SC, Boon CJ, Cremers FP, et al. Clinical and genetic characteristics of late-onset Stargardt's disease. *Ophthalmology* 2012;119:1199–210.
25. Rosenberg T, Klie F, Garred P, Schwartz M. N965S is a common *ABCA4* variant in Stargardt-related retinopathies in the Danish population. *Mol Vis* [serial online] 2007;13:1962–9. Available at, <http://www.molvis.org/molvis/v13/a221/>. Accessed April 7, 2013.
26. Shroyer NF, Lewis RA, Lupski JR. Complex inheritance of *ABCR* mutations in Stargardt disease: linkage disequilibrium, complex alleles, and pseudodominance. *Hum Genet* 2000;106:244–8.
27. Fukui T, Yamamoto S, Nakano K, et al. *ABCA4* gene mutations in Japanese patients with Stargardt disease and retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2819–24.
28. Simonelli F, Testa F, Zernant J, et al. Association of a homozygous nonsense mutation in the *ABCA4* (*ABCR*) gene with cone-rod dystrophy phenotype in an Italian family. *Ophthalmic Res* 2004;36:82–8.
29. McBain VA, Townend J, Lois N. Progression of retinal pigment epithelial atrophy in Stargardt disease. *Am J Ophthalmol* 2012;154:146–54.
30. Tsunoda K, Watanabe K, Akiyama K, et al. Highly reflective foveal region in optical coherence tomography in eyes with vitreomacular traction or epiretinal membrane. *Ophthalmology* 2012;119:581–7.
31. Sergouniotis PI, Holder GE, Robson AG, et al. High-resolution optical coherence tomography imaging in *KCNV2* retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2012;96:213–7.
32. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, et al. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol* 2009;118:69–77.
33. Bach M, Brigell MG, Hawlina M, et al. ISCEV standard for clinical pattern electroretinography (PERG): 2012 update. *Doc Ophthalmol* 2013;126:1–7.
34. Lois N, Holder GE, Bunce C, et al. Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol* 2001;119:359–69.
35. Jaakson K, Zernant J, Kulm M, et al. Genotyping microarray (gene chip) for the *ABCR* (*ABCA4*) gene. *Hum Mutat* 2003;22:395–403.
36. O'Sullivan J, Mullaney BG, Bhaskar SS, et al. A paradigm shift in the delivery of services for diagnosis of inherited retinal disease. *J Med Genet* 2012;49:322–6.
37. Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3812–4.
38. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations [letter]. *Nat Methods* 2012;7:248–9.
39. Biswas EE, Biswas SB. The C-terminal nucleotide binding domain of the human retinal ABCR protein is an adenosine triphosphatase. *Biochemistry* 2000;39:15879–86.
40. Molday RS, Zhong M, Quazi F. The role of the photoreceptor ABC transporter *ABCA4* in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791:573–83.

(1.08 and 2.0), type 3 fundus appearance, type 3 AF pattern, and ERG group 3.

Patient 4, homozygous for p.Glu905fsX916, showed a severe phenotype: age of onset (5 years), visual acuity loss (1.0 for both eyes), type 2 fundus appearance, type 2 AF pattern, and ERG group 3. Patient 13, homozygous for p.Arg1300X, had a very severe disease, with early onset (8 years), visual acuity loss (1.3 and 1.0), type 3 fundus appearance, type 2 AF pattern, and ERG group 3. A severe phenotype also was observed in patient 14, homozygous for c.4253+4C>T, with early onset (8 years), visual acuity loss (1.0 both eyes), type 2 fundus appearance, type 2 AF pattern, and ERG group 3. Four patients (patients 15, 16, 17, and 18), homozygous for p.Gln2220X, from 2 families demonstrated a severe phenotype: early onset (<10 years) in 3 patients, visual acuity (1.0–3.0), type 1 fundus appearance with vessel attenuation or type 3 fundus appearance, and ERG group 3.

## Discussion

This study assessed the detailed phenotypic features of a cohort of patients with homozygous *ABCA4* alleles, allowing a detailed clinical assessment of the effect of each individual allele on retinal structure and function. The effects of 8 variants are reported in the homozygous state for the first time in this study (Table 4, available at <http://aaojournal.org>).

Patients with homozygous missense variants had variable phenotypes, ranging from very severe and early onset to relatively mild and later onset. Three patients, homozygous for p.Gly1961Glu, had localized dysfunction confined to the macula with no evidence of generalized retinal dysfunction, consistent with previous reports.<sup>12,20</sup> Burke et al<sup>12</sup> reported that patients homozygous for p.Gly1961Glu usually have milder disease, with severe phenotypes linked to the presence of additional *ABCA4* variants. The 2 previously reported variants (p.Asn96Lys and p.His1838Asp) in complex with p.Gly1961Glu that were associated with a very severe phenotype were not detected in our patients.<sup>12</sup> We observed a particularly late-onset mild disorder, with numerous flecks and foveal sparing, associated with p.Leu2027Phe, suggesting primary disease of the parafoveal RPE with preservation of foveal structure, a “foveal sparing” phenotype. This supports previous reports of p.Leu2027Phe in heterozygous patients.<sup>14,23</sup> Of note, p.Gly1961Glu and p.Leu2027Phe are both situated in the nucleotide-binding domain 2 subunit, shown to be the site of adenosine triphosphatase activity (Fig 5, available at <http://aaojournal.org>).<sup>39,40</sup>

Subjects homozygous for p.Arg212Cys had phenotypes of moderate severity, and these findings are generally in keeping with previous reports.<sup>19</sup> Patient 5, homozygous for p.Val931Met and p.Arg1705Gln in complex, and subjects 6 and 7, homozygous for p.Cys1488Arg, had “typical” Stargardt's disease fundus and AF findings with macular atrophy surrounded by flecks with electrophysiologic evidence of generalized rod and cone system dysfunction.

A very severe phenotype was observed in 2 patients with homozygous missense variants in this study. Patient 3, homozygous for p.Leu541Pro and p.Ala1038Val, had a very early onset associated with severe disease. These findings are similar to genetically identical patients reported

by Wiszniewski et al.<sup>22</sup> A very severe phenotype also was observed in patient 8 (p.Arg1640Trp), in keeping with the severe findings of genetically identical subjects, homozygous for p.Arg1640Trp, in a previous report by Briggs et al.<sup>10</sup>

In contrast, patients with homozygous null variants consistently showed a very severe phenotype: 6 of 7 had early-onset disease (<10 years), and all 7 had electrophysiologic evidence of generalized rod and cone system dysfunction. These findings support previous familial reports<sup>6,10,27</sup> and highlight the fact that generalized functional loss (ERG) precedes fundus or AF abnormalities, as observed in 5 pediatric patients.

Haplotype analysis in 2 probands homozygous for p.G1961E and 2 homozygous for p.Gln2220X suggested a founder effect for these mutations in these consanguineous families from South Asia, although some of the screened variants were not rare. Concordance in phenotypic features between patients with an identical disease-causing variant was observed in individuals homozygous for p.Arg212Cys, p.Cys1488Arg, p.Gly1961Glu, and p.Gln2220X, suggesting that few modifiers exist.

In conclusion, 2 patients were homozygous for 2 variants previously reported as associated with disease (patient 3, p.Leu541Pro and p.Ala1038Val; patient 5, p.Val931Met and p.Arg1705Gln; Table 4, available at <http://aaojournal.org>). However, p.Ala1038Val and p.Val931Met were present in a relatively high number of chromosomes on the Exome Variant Server database and were predicted to be tolerant by Sorting Intolerant from Tolerance analysis. It remains to be seen whether these variants are merely neutral polymorphisms in cis with disease-causing ones or these families have 2 independently damaging missense variants. These data help to provide insight into the retinopathy caused by specific *ABCA4* alleles in this clinically variable disorder and may guide clinicians in the selection of patients for therapeutic clinical trials for *ABCA4*-related retinal disease in the future.

**Acknowledgments.** The authors thank Naushin Waseem, Bev Scott, Genevieve Wright, Sophie Devery, and Ravinder Chana for help in assembling DNA samples from a large panel of patients with *ABCA4*-related retinal disease presenting to the clinics at Moorfields Eye Hospital; Christopher Lloyd and Graeme Black for referring patient 3; and Arundhati Dev Borman, Rajarshi Mukherjee, Eva Lenassi, and Yozo Miyake for data collection and insightful comments.

## References

1. Stargardt K. Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges. Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol 1909;71:534–50.
2. Webster AR, Heon E, Lotery AJ, et al. An analysis of allelic variation in the *ABCA4* gene. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42:1179–89.
3. Michaelides M, Hunt DM, Moore AT. The genetics of inherited macular dystrophies. J Med Genet 2003;40:641–50.
4. Fujinami K, Akahori M, Fukui M, et al. Stargardt disease with preserved central vision: identification of a putative novel mutation in ATP-binding cassette transporter gene [letter] [report online]. Acta Ophthalmol 2011;89:e297–8.

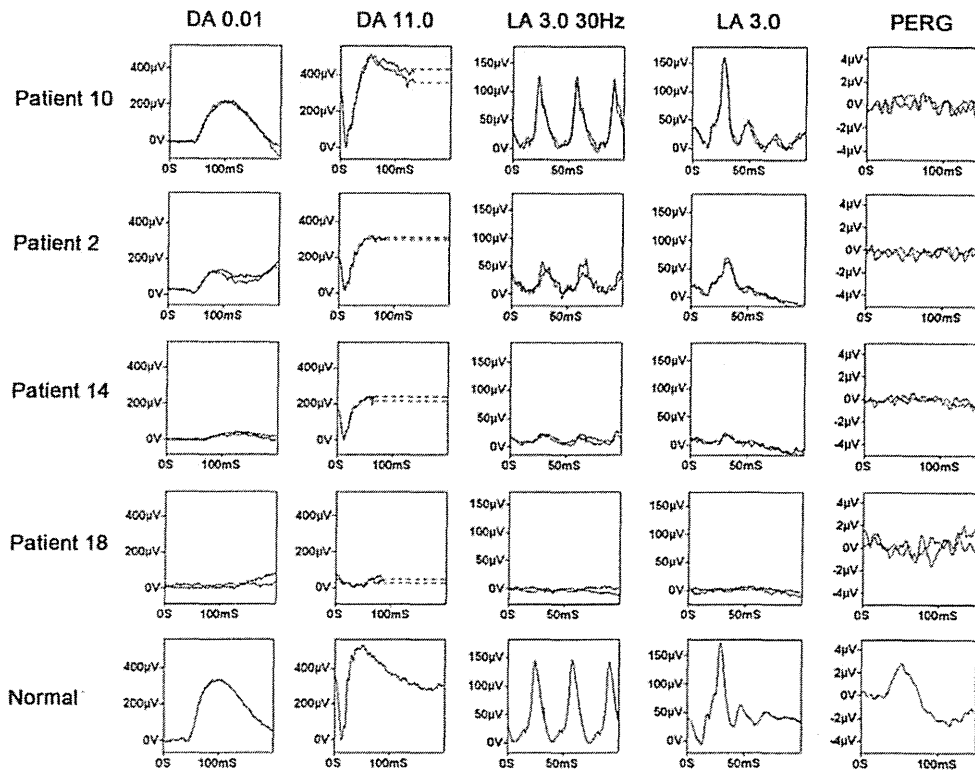


Figure 4. Full-field electroretinograms (ERGs) and pattern ERGs (PERGs) from 4 representative cases of Stargardt's disease harboring homozygous *ABCA4* alleles (patients 10, 2, 14, and 18). Patient 10 demonstrates undetectable PERG and normal full-field ERGs, consistent with ERG group 1. Patient 2 has undetectable PERG and abnormal responses in light-adapted (LA) single flash ERG (LA 3.0) and LA 30 flicker ERG (LA 3.0 30 Hz), whereas responses in dark-adapted (DA) dim flash ERG (DA 0.01) and DA bright flash ERG (DA 11.0) are slightly abnormal. Patient 14 has undetectable PERG, subnormal DA ERGs (DA 0.01 and DA 11.0), and mildly delayed and markedly subnormal LA ERGs (LA 3.0 and LA 3.0 30 Hz). Patient 18 demonstrates undetectable responses in PERG and full-field ERGs. The electrophysiologic findings of patients 2, 14, and 18 are classified into group 3. Normal traces are shown in the bottom row for comparison.

To define the chromosomal haplotype for the alleles detected in this study, 9 *ABCA4* polymorphisms were examined in probands from 10 families (Table 5, available at <http://aaojournal.org>). In 8 of 10 probands, all variants were homozygous, suggesting autozygosity and defining the haplotype for these polymorphisms (Table 5, available at <http://aaojournal.org>). Two probands harbored heterozygous changes: patient 5 from family 4 with no known consanguinity and patient 12 from family 9 with no consanguinity. Three heterozygous changes were found in patient 12, suggesting that the p.Leu2027Phe had occurred recurrently on 2 distinct chromosomal backgrounds. In patient 5, 1 of 9 polymorphisms was heterozygous, c.1356+5delG, 29.7 kb from the disease-causing variant (p.Val931Met). Further genotyping might determine whether the mutation occurred recurrently or c.1356+5delG occurred on an ancient common haplotype.

### Genotype-Phenotype Association

The phenotype severity associated with each variant and concordance between patients with identical disease-causing variants was investigated (Tables 2–4, available at <http://aaojournal.org>). Two missense alleles were associated with a mild phenotype, and 3 missense alleles were linked to a moderate phenotype (Table 4, available at <http://aaojournal.org>). A severe phenotype was associated with 2 missense alleles and 4 null alleles (Table 4, available at <http://aaojournal.org>).

Three patients from 2 families (patients 9, 10, and 11), homozygous for p.Gly1961Glu, showed similar mild findings: adult onset (17–30 years), type 1 fundus appearance, type 1 or 2 AF pattern, and ERG group 1 but variable visual acuity and OCT findings. A very mild phenotype was observed in patient 12, homozygous for p.Leu2027Phe, with late onset (44 years), well-preserved visual acuity (0.18 and 0.0 for each eye), type 2 fundus appearance, type 2 AF pattern with spared AF signal at the fovea, and normal full-field ERGs (group 1).

Two siblings (patients 1 and 2), homozygous for p.Arg212Cys, showed a similar moderate findings: age of onset (11 years), log-MAR visual acuity (1.0), type 2 fundus appearance, type 2 AF pattern, and atrophic change at the fovea on OCT, but ERG grouping was discordant (group 1 and 3). Patient 5, homozygous for both p.Val931Met and p.Arg1705Gln, had moderate findings: age of onset (10 years), visual acuity (1.0 and 1.08 for each eye), type 2 fundus appearance, type 2 AF pattern, and ERG group 3. Two siblings (patients 6 and 7), homozygous for p.Cys1488Arg, also had a similar moderate findings: age of onset (10 years), type 2 fundus appearance, type 2 AF pattern, and ERG group 3 but variable visual acuity.

Patient 3, homozygous for both p.Leu541Pro and p.Ala1038Val, showed a very severe phenotype: age of onset (3 years), visual acuity (1.2 for both eyes), type 2 fundus appearance, type 2 AF pattern, and ERG group 3. Patient 8, homozygous for p.Arg1640Trp, had severe disease but of adult onset: visual acuity