

201419063A

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業  
(感覚器障害分野)

日本人常染色体劣性網膜色素変性症の  
遺伝子診断法に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 誠志

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業  
(感覚器障害分野)

日本人常染色体劣性網膜色素変性症の  
遺伝子診断法に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 誠志

平成27(2015)年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

日本人常染色体劣性網膜色素変性症の遺伝子診断法に関する研究----- 1

加藤誠志

### II. 分担研究報告

1. *EYS* 遺伝子による網膜色素変性の遺伝疫学に関する研究 -家系解析- ----- 7

岩波将輝

2. 変異 *EYS* を発現している変性視細胞モデルの作出に関する研究 ----- 16

世古裕子



# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業 感覚器障害分野）

総括研究報告書

日本人常染色体劣性網膜色素変性症の遺伝子診断法に関する研究

研究代表者 加藤誠志

国立障害者リハビリテーションセンター研究所 研究所長

研究要旨

本研究の目的は、我々が最近明らかにした日本人の常染色体劣性網膜色素変性症（arRP）の主要原因遺伝子である *EYS* について、遺伝子診断法を確立し、予後予測や治療法の手がかりを得ることである。昨年度までに、当センター病院眼科を受診した RP 患者並びに京都大学病院眼科を受診した arRP 患者のゲノム DNA を用い、日本人特有の 3 種の創始者変異 p. S1653Kfs\*2 (EYS-JM1)、p. Y2935\* (EYS-JM2)、p. G843E (EYS-JM3) の一次スクリーニングを行った結果、約 30% の陽性患者を同定できることが示された。今年度は、*EYS* 遺伝子変異を原因にもつ日本人 arRP 患者 (EYS-RP) の遺伝疫学を明らかにするため、EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3 および EYS-JM4 (p. G2186E) を有する 15 家系 38 名の遺伝学的解析を行い、これら変異の病原性に関する信頼性について検討を行った。その結果、これらの変異のいずれについても、表現型と一致する遺伝子変異型が分離され、矛盾がないことが示された。従って、いずれの変異についても、病原性変異である可能性が強く示唆された。また、arRP 患者由来のヒト皮膚繊維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによる網膜細胞への分化誘導法を検討した結果、4 種の転写因子遺伝子を導入することによって視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子並びに *EYS* 遺伝子を発現する視細胞様細胞に分化誘導できることが示された。arRP 患者が保有する *EYS* 遺伝子の変異の種類によって、変性視細胞モデルにおける *EYS* 遺伝子の転写産物に違いが見られた。この成果は、RP 患者の予後予測や網膜の変性機構の解明、さらには診断法・治療法の開発に役立つことが期待される。

研究分担者

西田朋美	国立障害者リハビリテーションセンター病院 眼科医長
岩波将輝	国立障害者リハビリテーションセンター病院 眼科医師
青井則之	国立障害者リハビリテーションセンター病院 非常勤医師
世古裕子	国立障害者リハビリテーションセンター研究所 視覚機能障害研究室長
宮本潔子	国立障害者リハビリテーションセンター研究所 感覚機能系障害研究部 派遣研究員

研究協力者

仲泊 聡	国立障害者リハビリテーションセンター病院 第二診療部部長
小牟田縁	国立障害者リハビリテーションセンター研究所 感覚機能系障害研究部

流動研究員

吉村長久 京都大学医学部医学研究科眼科学  
教授

大石明生 京都大学医学部医学研究科眼科学  
助教

荻野 顕 京都大学医学部医学研究科眼科学  
助教

## A. 研究目的

国立障害者リハビリテーションセンターの病院と自立支援局を訪れる視覚障害者の約 1/3 が網膜色素変性症 (RP) に罹患している。日本人では、通常 4,000 人から 8,000 人に 1 人程度の発症と推定され、全体の約 50% を家族に発症を認めない孤発例が占める。RP は、夜盲に始まり、徐々に視野狭窄、視力低下が起こる進行性の遺伝子疾患であり、現在有効な治療法はない。中途失明により就労が困難となるケースが多く、RP 患者の社会生活を支援するためにも、予後の予測法や抜本的治療法が望まれている。本研究の目的は、我々が最近明らかにした日本人の arRP の主要原因遺伝子である *EYS* について、遺伝子診断法を確立し、予後予測や治療法の手がかりを得ることである。

昨年度までに、当センター病院眼科を受診した RP 患者 230 名並びに京都大学病院眼科を受診した arRP 患者 210 名合計 440 名のゲノム DNA を用い、日本人特有の 3 種の創始者変異 p. S1653Kfs\*2 (EYS-JM1)、p. Y2935\* (EYS-JM2)、p. G843E (EYS-JM3) の一次スクリーニングを行った結果、約 30% の陽性患者を同定できることが示された。また、ヒト皮膚繊維芽細胞に 4 種類の転写因子遺伝子を導入し、視細胞様細胞へ分化誘導することに成功した。

本年度は、日本人特有の *EYS* 遺伝子変異を有する家系の遺伝子解析と arRP 患者の皮膚細胞から直接リプログラミング法によって分化誘導した変異視細胞モデルの発現産物の解析を中心に実施した。

## B. 研究方法

### B-1 *EYS* 遺伝子の変異解析

#### B-1-1 対象

当院眼科を受診した 249 名の arRP 患者 (東日本域)、京都大学を受診した arRP 患者 209 名 (西日本域)、患者総計 458 名および健常者 200 名の血液または唾液からゲノム DNA の精製を行い、塩基配列解析のサンプルとした。

#### B-1-2 *EYS* 遺伝子の変異解析

日本人にのみ見いだされた 3 種類の創始者変異 p. S1653Kfs\*2 (EYS-JM1)、p. Y2935\* (EYS-JM2)、p. G843E (EYS-JM3) について、各変異を含むエクソンを PCR 法により増幅後、サンガー法で塩基配列を決定した。片方のアレルにのみ変異を有する場合は、全エクソンの塩基配列を決定した。もし、もう一方のアレルに変異が見つからない場合には、MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法による欠失・重複変異解析を行った。

#### B-1-3 家系解析

上記大規模コホートにおける arRP 患者 458 名において、*EYS* 遺伝子変異をホモまたはヘテロ接合で有する *EYS*-RP 患者 103 名 (103/440, 23.4%) であったが、これら家系において、家族より遺伝子解析の協力を得られた 15 家系、38 名の親族について、各家系の有する変異についての追加解析を行い、これら遺伝子変異の同定を行った。

## B-2 ヒト皮膚繊維芽細胞の直接リプログラミング

### B-2-1 皮膚繊維芽細胞の採取

正常ボランティア3名の肘から皮膚繊維芽細胞を採取した。1名については、頭部の皮膚からの採取も行った。また、EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3、EYS-JM4をホモあるいはヘテロ接合で有する5名のarRP患者の肘から皮膚繊維芽細胞を採取した。

### B-2-2 ヒト皮膚繊維芽細胞の分化誘導

分担研究者の世古らが開発したヒト虹彩細胞あるいはヒト皮膚繊維芽細胞を視細胞に分化誘導する方法 (Seko et al., PLoS ONE, 2012、Seko et al., Genes Cells, 2014) を応用し、網膜色素変性症患者から採取した皮膚細胞を視細胞に分化誘導する方法を検討した。まず、被験者から採取したヒト皮膚細胞を単離・培養・凍結保存した。これらの細胞に、網膜視細胞への分化誘導を高効率で行うことが出来る転写因子遺伝子 (*CRX*, *NEUROD*, *RAX*, *OTX2*) の混合物を、レトロウィルスベクターを用いて導入し、遺伝子導入した細胞 (誘導視細胞様細胞) と導入していない細胞 (コントロール細胞) それぞれから mRNA を抽出後、RT-PCR による視細胞特異的遺伝子の発現解析、並びに網羅的遺伝子発現解析を行った。また、*EYS* 遺伝子の転写産物の塩基配列解析ならびに、それぞれの細胞から蛋白質を抽出し、抗 *EYS* 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

(倫理面への配慮)

すべての本研究計画は、国立障害者リハビリテーションセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て、その指針を順守し

て行われた。患者と同様に患者家族の解析についても、説明、同意を得てサンプル収集・解析を行った。京都大学との共同研究については、研究の施行と患者検体の移譲に際して京都大学の倫理委員会の承認を得た上で、当施設での解析を行った。

## C. 結果と考察

### C-1 *EYS* 遺伝子の変異解析

#### C-1-1 *EYS*-JM1 と *EYS*-JM2 を有する家系

*EYS*-JM1 をホモ接合で有する1家系と *EYS*-JM2 をホモ接合で有する1家系は、それぞれ表現型と一致する遺伝子変異型が分離され、矛盾がないことが示された。

#### C-1-2 *EYS*-JM3 を有する家系

*EYS*-JM3 を有する10家系について、同様に遺伝子変異型に基づく分離解析を行った結果、これらにおいても矛盾なく表現型と一致する遺伝子変異型が分離された。

今回の大規模コホートにおける arRP 患者 440 名のうち、*EYS* 遺伝子変異をホモまたはヘテロ接合で有する *EYS*-RP 患者は 103 名 (103/440, 23.4%) であったが、これらのうち 35 名 (35/103, 34.0%) が *EYS*-JM3 (p. G843E) を有する患者であった。従って、これら *EYS*-RP 患者の約 3 割を占める *EYS*-JM3 について、家系解析による病原性の可能性が示されたことは、大変に意義深い。

#### C-1-3 *EYS*-JM4 を有する家系

*EYS*-JM4 (c. 6557G>A, p. G2186E) も日本人特有のミスセンス変異である。これを有する3家系について、分離解析を行ったところ、これらにおいても矛盾なく表現型と一致する遺伝子変異型が分離された。したがって、この変異も病原性であ

る可能性が高い。

## C-2 ヒト皮膚繊維芽細胞の直接リプログラミング

### C-2-1 正常ボランティアの皮膚繊維芽細胞の分化誘導

正常ボランティアの肘や頭部の皮膚線維芽細胞を分化誘導した結果、ブルーオプシン、S-antigen、OTX2 など視細胞特異的な遺伝子の発現が見られ、4種の転写因子遺伝子の導入によって、安定的に *EYS* 遺伝子の発現誘導がみられた。この結果から、皮膚線維芽細胞由来網膜視細胞様細胞を用いる本実験系が、*EYS* 遺伝子変異を保有する RP 患者の診断に応用できる可能性が示唆された。

### C-2-2 RP 患者の皮膚繊維芽細胞の分化誘導

arRP 患者由来の皮膚線維芽細胞を分化誘導した結果、上記同様、視細胞特異的な遺伝子の発現が見られた。発現量を定量 RT-PCR で比較した結果、ブルーオプシンと S-antigen に関しては、正常細胞と変性モデル細胞との間で有意な差は認められなかった。網羅的遺伝子発現解析によって、さらに多数の網膜特異的な遺伝子の発現について検討を行った。これらの結果から、多くの網膜視細胞特異的な遺伝子の発現量は、*EYS* 遺伝子変異の有無には依存しない可能性が示唆された。また、この実験系において、誘導視細胞における網膜特異的な遺伝子の発現が、*EYS* 遺伝子の変異の有無ではなく、導入した転写因子の発現量に依存する可能性が示唆された。

### C-2-3 変性モデル細胞における *EYS* 遺伝子の発現

RP 患者由来の皮膚線維芽細胞を分化誘導した結果、視細胞特異的な遺伝子である *EYS* 遺伝子(エ

クソン 8-9) の発現増加が見られた。しかし、*EYS* 遺伝子の発現量は、正常細胞と RP 患者細胞それぞれから誘導した誘導視細胞との間で有意な差は見られなかった。

*EYS*-JM1 をホモ接合で有する RP 患者 1 の皮膚から誘導した視細胞様細胞に発現された *EYS* 遺伝子の転写産物の塩基配列解析の結果、ゲノムに見られた変異と同様の変異 (フレームシフト変異) が見られることが明らかになった。さらに、患者 2 (片側アレルに *EYS*-JM1、もう片側のアレルに *EYS*-JM2 をもつ) でも同様に、*EYS*-JM1 を含む領域 (エクソン 26-27) について増幅を行い、塩基配列を調べた。その結果、変異を保有するアレル由来の転写産物と変異を有しないアレル由来の転写産物のいずれも発現していることが示された。以上の結果は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) が働くことなく *EYS*-JM1 を保有する転写産物が存在し、短縮ポリペプチドが生成されていることを示唆している。

患者 3 は、*EYS* 遺伝子について、片側アレルに M1 変異、もう片側のアレルに M1、M2 以外の変異 (c. 1211dupA、 p. N404Kfs\*3) を保有している。この患者の皮膚線維芽細胞から分化誘導して作成した変性視細胞モデルにおいては、変異を有するアレル由来の転写産物を検出することができなかった。この変異については、NMD が働いている可能性が示唆される。

### C-2-4 変性モデル細胞における *EYS* 蛋白質の生産

両側アレルに M1 変異を保有する患者の皮膚線維芽細胞を用いた場合、抗 C 末端抗体を使用した時のバンドを、正常細胞由来の視細胞モデルと RP 患者由来の変性視細胞モデルとの間で比較すると、300kDa 近傍に広く広がるバンドと 200kDa 近



傍のバンドの濃さが変性視細胞モデルの方が有意に薄くなっているのが観察された。いずれのバンドも、陽性コントロールとして用いた Y79 細胞のバンドと分子量がわずかにずれているが、抗体に対応するペプチドによる吸収も認められたので、EYS 蛋白質である可能性がある。一方で、抗 N 末端抗体を用いた場合、40KDa 近傍に、変性視細胞モデルの方が有意に濃くなっているバンドが観察された。このバンドは、Y79 には存在せず、皮膚に存在するバンドであるが、正常細胞では、4 種類の転写遺伝子を導入して網膜視細胞に分化誘導すると発現が著明に減少する。しかし、RP 患者由来の変性視細胞モデルでは、分化誘導しても発現の減少が見られない。今後、さらなる検討が必要である。

#### D. 結論

EYS-JM1、EYS-JM2、EYS-JM3 および EYS-JM4 (p. G2186E) を有する 15 家系 38 名の遺伝学的解析を行い、これら変異の病原性に関する信頼性について検討を行ったところ、これらの変異のいずれについても、表現型と一致する遺伝子変異型が分離され、矛盾がないことが示された。従って、いずれの変異についても、病原性変異である可能性が強く示唆された。

arRP 患者由来のヒト皮膚繊維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによる網膜細胞への分化誘導法を検討した結果、4 種の転写因子遺伝子を導入することによって視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子並びに *EYS* 遺伝子を発現する視細胞様細胞に分化誘導できることが示された。arRP 患者が保有する *EYS* 遺伝子の変異の種類によって、変性視細胞モデルにおける *EYS* 遺伝

子の転写産物に違いが見られた。この成果は、RP 患者の予後予測や網膜の変性機構の解明、さらには診断法・治療法の開発に役立つことが期待される。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

- 1) Iwanami, M., Ogino, K, Oishi, A., Yoshimura, N., Kato, S. Founder Mutations in the *EYS* Gene in Japanese Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. The 34th World Ophthalmology Congress 2014. Tokyo, Japan, 2014-4-2/4-6.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業 感覚器障害分野）  
分担研究報告書

*EYS* 遺伝子による網膜色素変性の遺伝疫学に関する研究 一家系解析

分担研究者 岩波将輝

国立障害者リハビリテーションセンター病院 第二診療部 眼科医師

## 研究要旨

本研究の目的は、*EYS* 遺伝子変異を原因にもつ日本人常染色体劣性網膜色素変性症 (arRP) 患者 (*EYS*-RP) の遺伝疫学を明らかにするため、日本人特有の *EYS* 遺伝子変異 *EYS*-JM1 (p. S1653Kfs\*2)、*EYS*-JM2 (p. Y2935\*)、*EYS*-JM3 (p. G843E) および *EYS*-JM4 (p. G2186E) を有する 15 家系 38 名の遺伝学的解析を行い、これら変異の病原性に関する信頼性について検討を行うことである。これらの変異のいずれについても、表現型と一致する遺伝子変異型が分離され、矛盾がないことが示された。従って、いずれの変異についても、病原性変異である可能性が強く示唆された。

## A. 研究目的

本研究では、日本人の網膜色素変性症（以下、RP）の主要な原因である *Eyes shut homolog*（以下、*EYS*）遺伝子における遺伝疫学を明らかにすることを目的とし、東日本域 249 名、西日本域 209 名の計 458 名における全国的な患者サンプルの遺伝子解析を行った。本年度はこれら解析結果において、*EYS* 遺伝子変異を有する 15 家系における遺伝学的解析を行い、これら変異の病原性に関する信頼性について検討を行うことを目的とした。

## B. 研究背景

*EYS* 遺伝子は 2008 年に arRP の原因遺伝子として同定され、arRP の約 5–15% を占めることが海外で報告された。我々は、先行研究として日本人 RP 患者 68 名における遺伝学的解析を行い、複数の新規変異を同定した。そして、これら変異を保有する患者は arRP の約 30% を占める高い頻度であった (Iwanami et al. IOVS, 2012)。この結果は、日本民族の抱える遺伝学的背景の特殊性を示唆しているものと推測された。

海外に比べて日本人における頻度が高い理由として、複数家系における各変異の近傍遺伝子座に対するハプロタイプ解析より、日本人に特異な

3つの創始者変異、①c. 4957dupA, p. S1653Kfs\*2、②c. 8805C>A, p. Y2935\*、そして③c. 2528G>A, p. G843E の存在を同定した (Iwanami et al. IOVS, 2012)。これらを日本人 *EYS* 遺伝子における主要な変異 (*EYS*-Japanese major mutation、以下、*EYS*-JM) として、①～③を以下、それぞれ *EYS*-JM1、*EYS*-JM2、そして *EYS*-JM3 と呼称する (表 1)。これら 3 つの変異はそれぞれ独立した複数の家系から同定されたが、それぞれの変異に創始者となる個体が存在し、日本人民族のなかで世代を越えて拡散し、受け継がれてきたことが示唆された。

表 1. *EYS* 遺伝子における日本人で同定された 3 つの創始者変異

変異	エクソン	塩基配列	アミノ酸変異	蛋白ドメイン	変異タイプ
JM1	26	c.4957dupA	p.Ser1653Lysfs*2	Close to coiled-coil	Frameshift
JM2	43	c.8805C>A	p.Tyr2935*	EGF	Nonsense
JM3	16	c.2528G>A	p.Gly843Glu	EGF	Missense

参考文献、Iwanami et al. IOVS, 2012

昨年度までの解析結果から、日本人におけるこれら *EYS*-JM1、*EYS*-JM2、*EYS*-JM3 の各変異は、日本人において比較的頻度の高いことが確認され、これらを用いてスクリーニング法の有用性を検討することは、*EYS* 遺伝子診断の効率化を図る上

で必須と考えられた（平成 24 年度報告）。また、東日本域 249 名、西日本域 209 名の計 458 名の全国的な患者サンプルにおける *EYS* 遺伝子の解析を網羅的に行い、日本人における *EYS* 遺伝子の遺伝疫学の全容を明らかにしてきた（平成 25 年度報告）。

## C. 対象と方法

### C-1 対象と遺伝子解析方法

当院眼科を受診した 249 名の arRP 患者（東日本域）、京都大学を受診した arRP 患者 209 名（西日本域）、および健常者 200 名を対象に遺伝学的解析を行った。患者 458 名および対象となる健常者 200 名の血液または唾液からゲノム DNA の精製を行い、*EYS* 遺伝子の全エクソンおよびそのエクソン-イントロン部を含む領域の直接的塩基配列決定をサンガー法で行った。

### C-2 欠失・重複変異の同定方法

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

### C-3 家系解析

上記大規模コホートにおける arRP 患者 458 名において、*EYS* 遺伝子変異をホモまたはヘテロ接合で有する EYS-RP 患者 103 名 (103/440, 23.4%) であったが、これら家系において、家族より遺伝子解析の協力を得られた 15 家系、38 名の親族について、各家系の有する変異についての追加解析を行い、これら遺伝子変異の同定を行った。

（倫理面への配慮）

すべての本研究計画は、当施設の倫理委員会の承認を得て、その指針を順守して行われた。患者と同様に患者家族の解析についても、説明、同意を得てサンプル収集・解析を行った。京都大学との共同研究については、研究の施行と患者検体の移

譲に際して京都大学の倫理委員会の承認を得た上で、当施設での解析を行った。

## D. 研究結果

arRP 患者 440 名における、遺伝学的な解析結果から、家系解析に協力を得られた 15 家系において、遺伝子変異型に基づく分離解析を行った。これら結果を図 1～図 6 にまとめた。図 1 において、①EYS-JM1 ; c. 4957dupA, p. S1653Kfs\*2 (図 1, M1 変異)、②EYS-JM2 ; c. 8805C>A, p. Y2935\* (図 1, M2 変異) をホモ接合で有する 1 家系をそれぞれ示す。これら家系の構成において、表現型と一致する遺伝子変異型が分離され、矛盾がないことが示された。

続いて、EYS-JM3 ; ③c. 2528G>A, p. G843E (図 2-図 5, M3 変異) を有する 10 家系について、同様に遺伝子変異型に基づく分離解析を行った結果、これらにおいても矛盾なく表現型と一致する遺伝子変異型が分離された。

最後、④c. 6557G>A, p. G2186E (図 6, M4 変異) を有する 3 家系について、分離解析を行った。これらにおいても矛盾なく表現型と一致する遺伝子変異型が分離された。この変異を EYS-JM4 と呼ぶことにする。

## E. 考察

今回の大規模コホートにおける arRP 患者 440 名のうち、*EYS* 遺伝子変異をホモまたはヘテロ接合で有する EYS-RP 患者は 103 名 (103/440, 23.4%) であったが、これらのうち 35 名 (35/103, 34.0%) が EYS-JM3 (p. G843E) を有する患者であった。従って、これら EYS-RP 患者の約 3 割を占める EYS-JM3 について、家系解析による病原性の評価を得ることは、大変に意義深い。

家系解析の結果より、短縮型変異である EYS-JM1 および EYS-JM2 はもちろんのこと、ミスセンス変異である EYS-JM3 (p. G843E)、EYS-JM4 (p. G2186E) 変異、EYS-JM5 (p. I2188T) についても、それぞれの家系の表現型-遺伝型における分離解析において、これら病原性に矛盾する結果は得ら



れなかった。従って、いずれの変異についても、病原性変異である可能性が強く示唆された。

特にミスセンス変異である EYS-JM3 (p. G843E) および EYS-JM4 (p. G2186E) 変異についての病原性を検討する上で、家系解析において矛盾が生じるようであれば、これら変異が病原性ではなく、一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) であることを意味する。そこで、最も健常者における保因者率の高い EYS-JM3 (p. G843E) については、慎重に評価を得るため、10 家系に及ぶ調査を行ったが、いずれも矛盾する結果は得られなかった。

今後、最終的なこれら変異蛋白の病原性の評価には、生化学的な手法も含めた検討も必要となるが、それぞれの変異を反映する患者モデル視細胞、モデル動物等を用いた分子レベルでの病態メカニズム解析についても、検討を進める必要がある。

## F. 結論

EYS 遺伝子変異を有する 15 家系における遺伝学的解析を行った。EYS-JM1, EYS-JM2, EYS-JM3 および EYS-JM4 (p. G2186E) 変異のいずれについても、表現型と一致する遺伝子変異型が分離され、矛盾がないことが示された。従って、いずれの変異についても、病原性変異である可能性が強く示唆された。

今回の大規模コホートにおける arRP 患者 440 名のうち、EYS 遺伝子変異をホモまたはヘテロ接合で有する EYS-RP 患者は 103 名 (103/440, 23.4%) であったが、これらのうち約 3 割を占める 35 名 (35/103, 34.0%) が EYS-JM3 (p. G843E) を有する患者であった。EYS-JM3 変異を有する 10 家系に及ぶ遺伝学的解析によって、さらなる病原性の信頼性が得られたことから、EYS-JM3 の遺伝子診断における重要性が改めて確認された。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

## 2. 学会発表

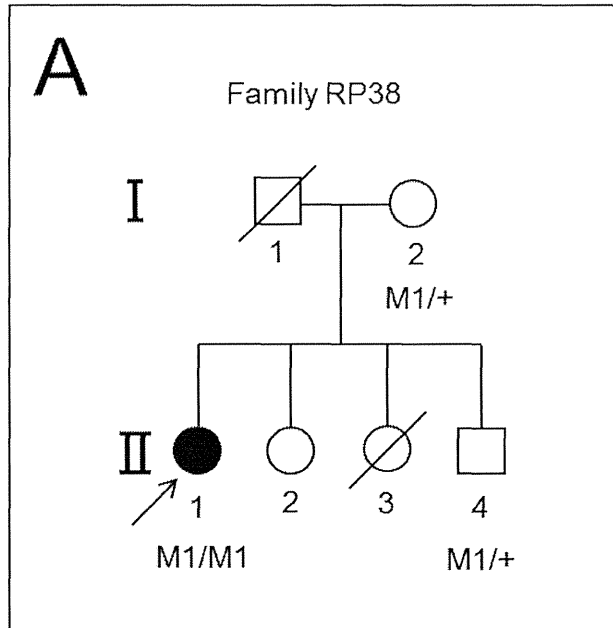
1) Iwanami, M., Ogino, K, Oishi, A., Yoshimura, N., Kato, S. Founder Mutations in the *EYS* Gene in Japanese Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. The 34th World Ophthalmology Congress 2014. Tokyo, Japan, 2014-4-2/4-6.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

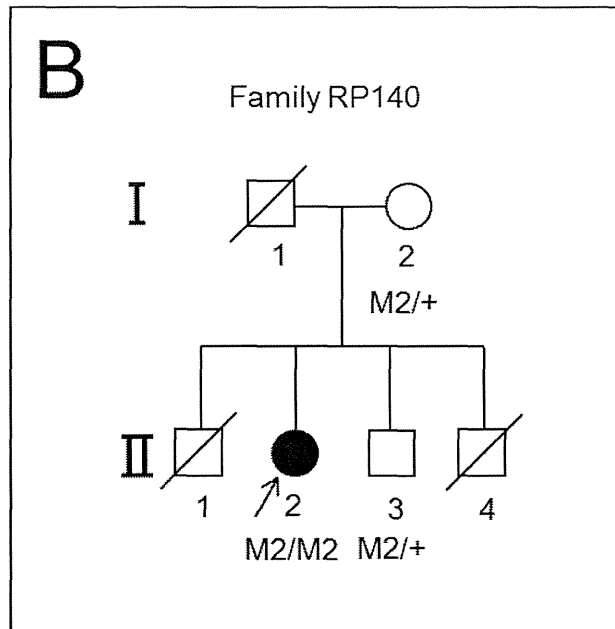
なし。

図1 M1, M2 変異に関する家系解析

- 男性
- 女性
- 罹患男性
- 罹患女性
- ↗ 発端者

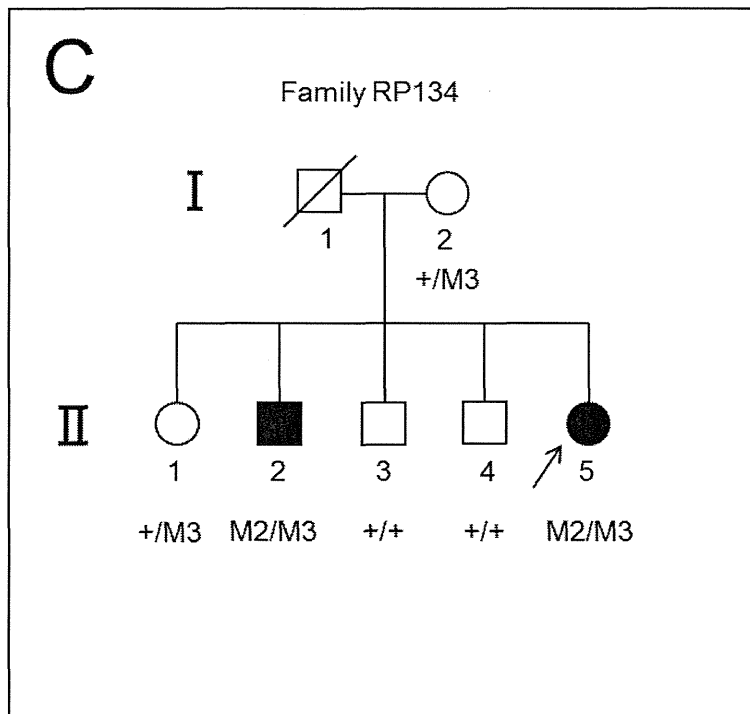
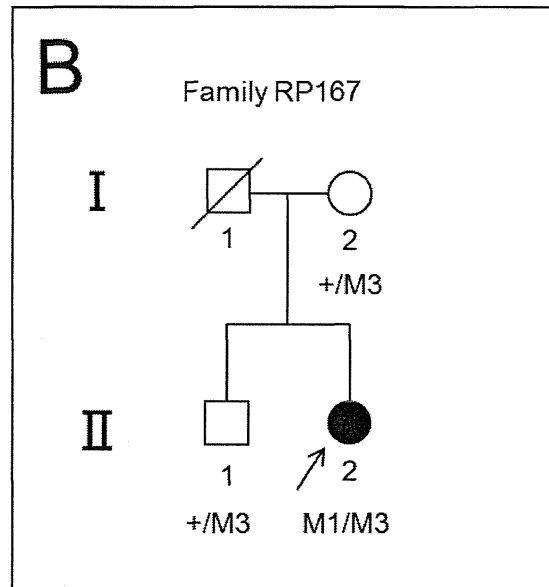
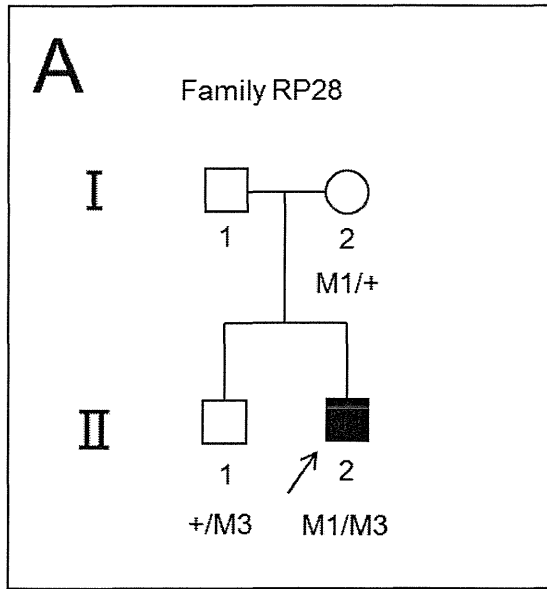


M1; p.S16653Kfs\*2



M2; p.Y2935\*

図2 M3 変異に関する家系解析①



M1; p.S16653Kfs\*2

M2; p.Y2935\*

M3; p.G843E

図3 M3 変異に関する家系解析②

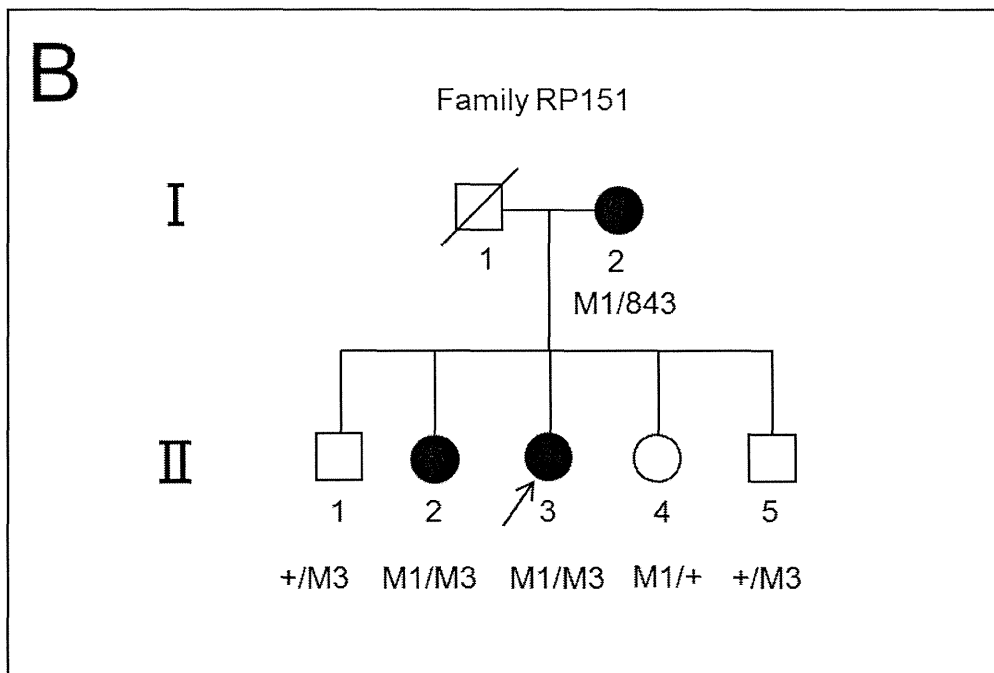
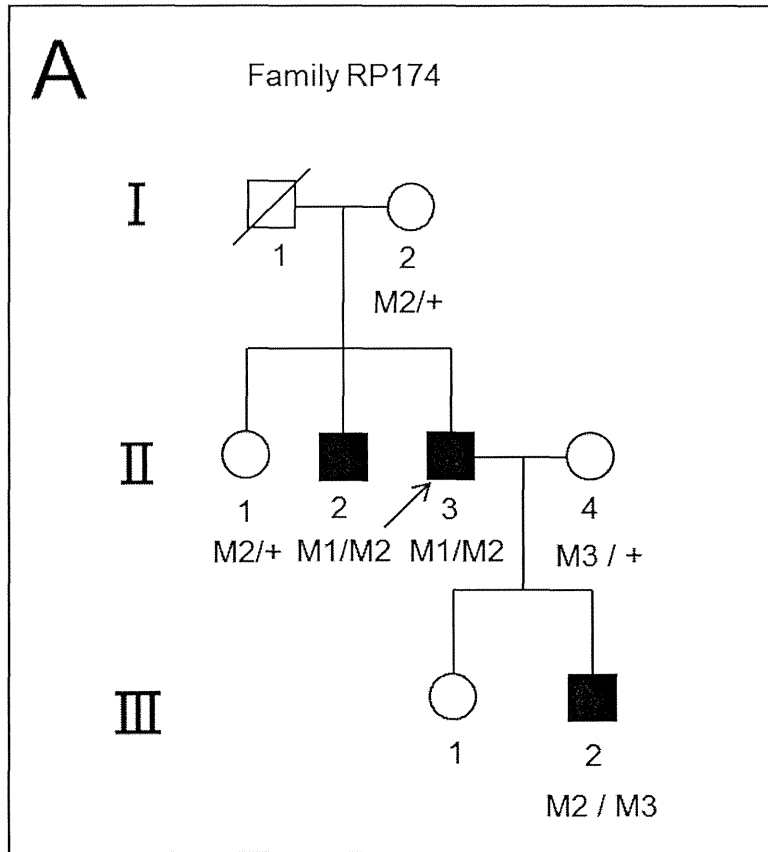
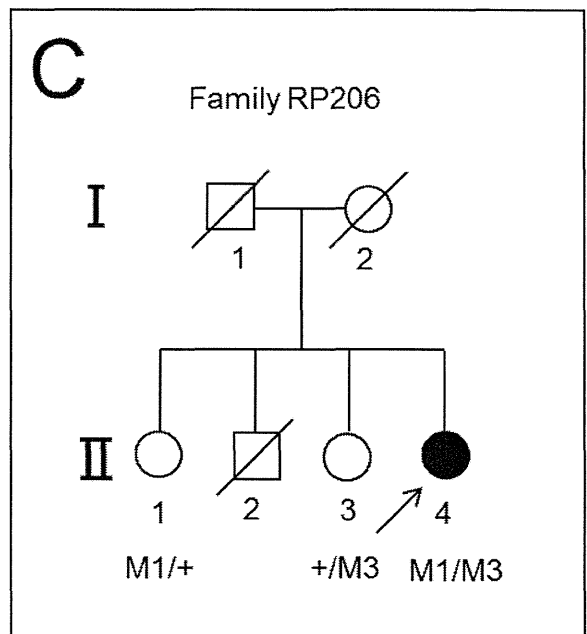
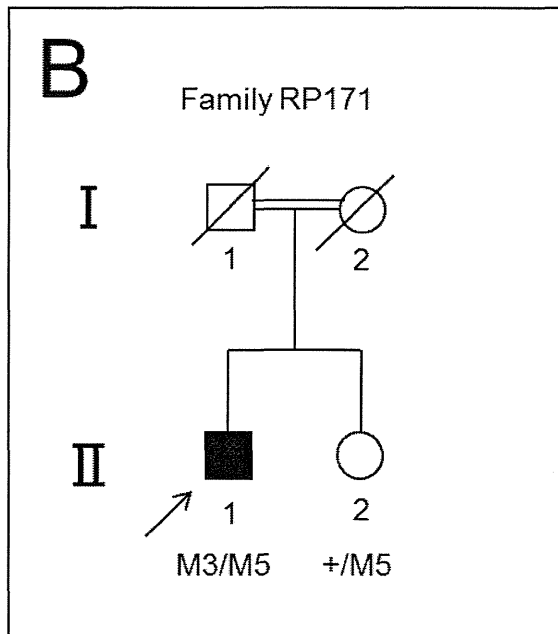
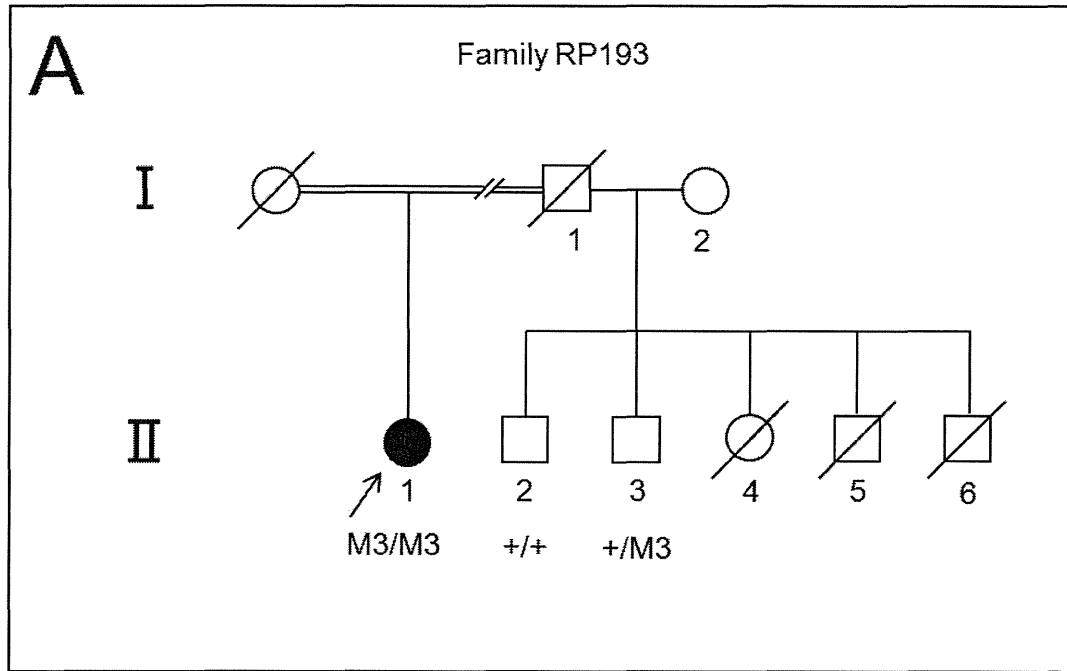




図4 M3 変異に関する家系解析③

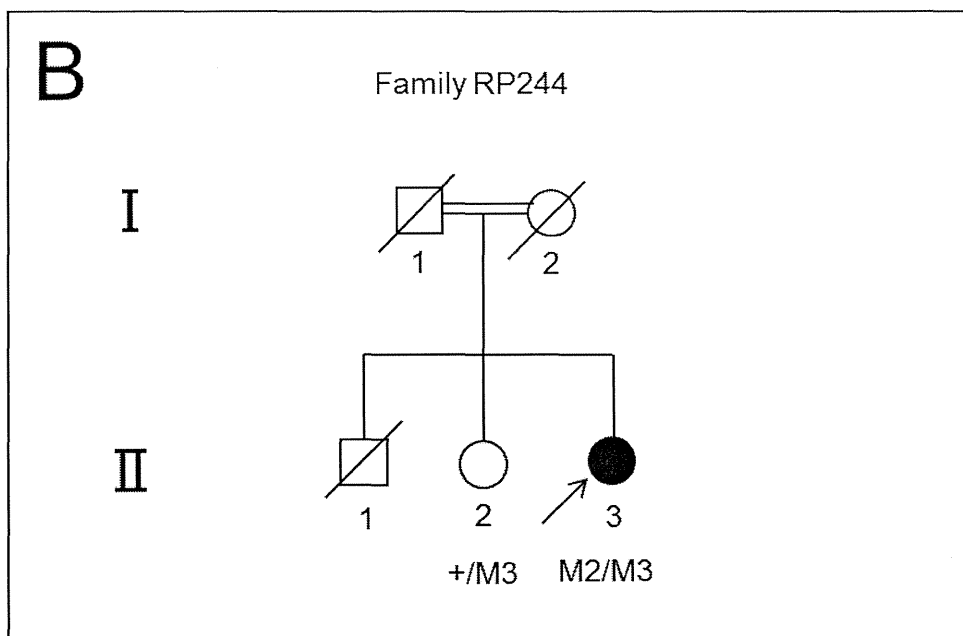
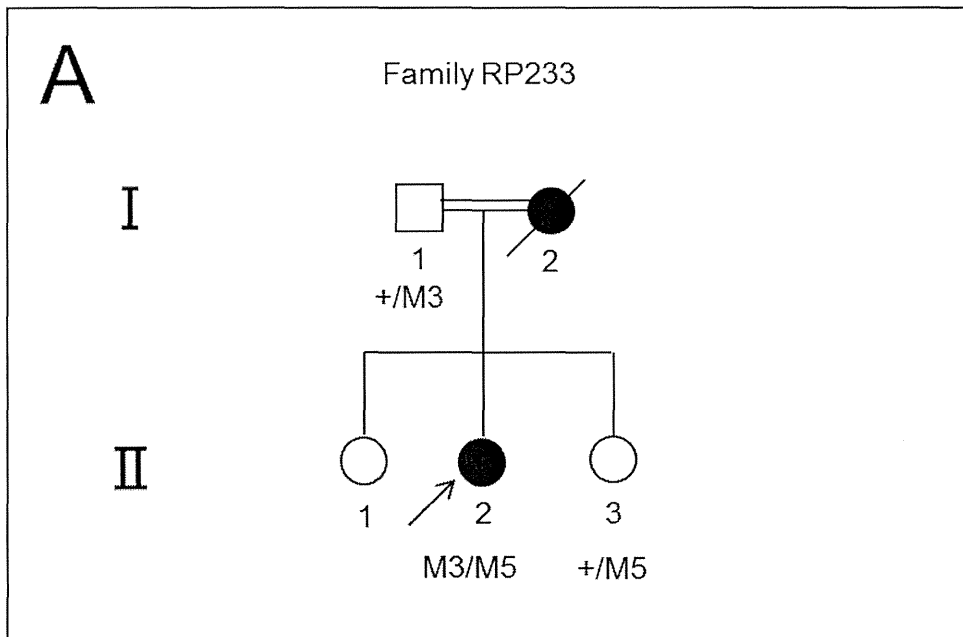


M1; p.S16653Kfs\*2

M3; p.G843E

M5; p.I2188T

図5 M3 変異に関する家系解析④

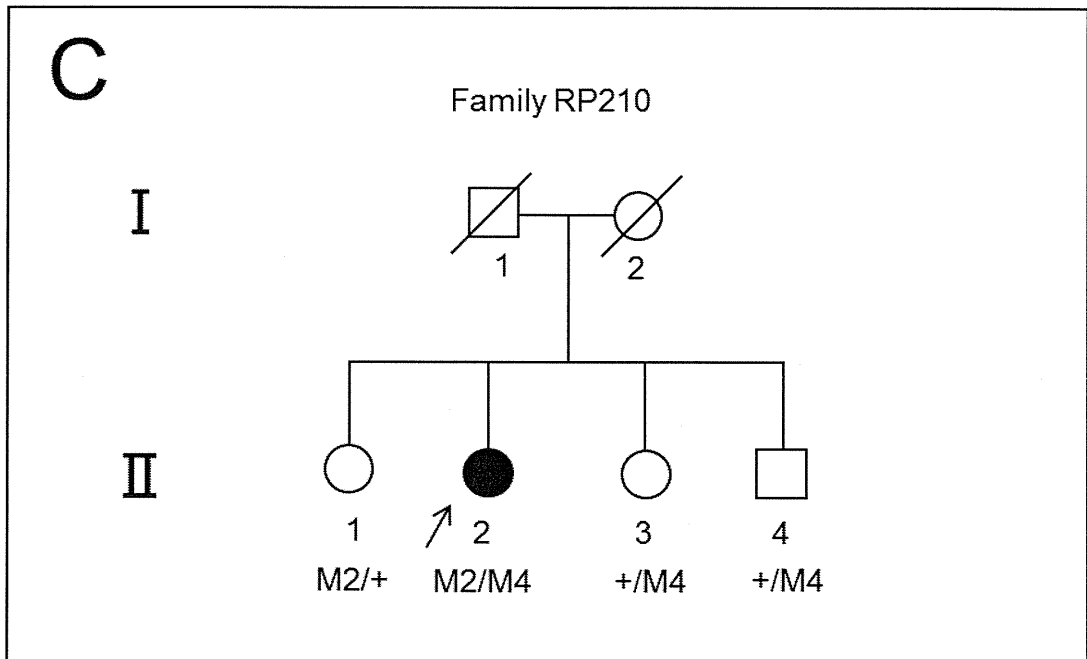
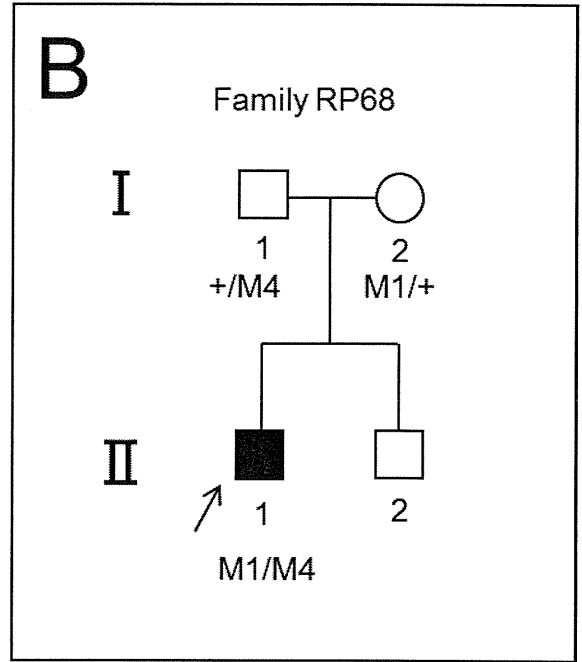
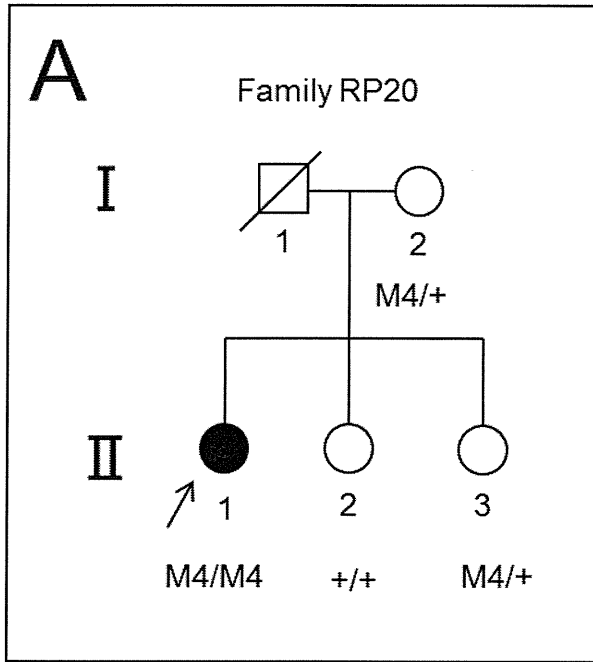


M2; p.Y2935\*

M3; p.G843E

M5; p.I2188T

図6 M4 変異に関する家系解析



M1; p.S16653Kfs\*2

M2; p.Y2935\*

M4; p.G2186E

分担研究報告書

変異 *EYS* を発現している変性視細胞モデルの作出に関する研究

研究分担者 世古裕子 国立障害者リハビリテーションセンター研究所  
感覚機能系障害研究部 視覚機能障害研究室長

研究要旨

本研究の目的は、網膜色素変性症（以下、RP）患者の体細胞を視細胞に分化誘導し、変性視細胞モデルを作出し解析することである。平成 24 年度から平成 25 年度にかけて、市販のヒト皮膚線維芽細胞から直接プログラミングによって網膜細胞へと分化誘導する実験を行った。その結果、ヒト皮膚線維芽細胞から、視細胞特異的な *EYS* 遺伝子や光トランスダクションに関わる遺伝子が発現し光応答のある視細胞様細胞に分化することがわかった。さらに、倫理審査委員会の承認を得て、平成 24 年度には正常ボランティアの、平成 25 年度には 3 名、平成 26 年度には 2 名の RP 患者の皮膚採取を実施した。正常ボランティアと RP 患者由来皮膚線維芽細胞から視細胞に分化誘導し、それぞれに発現する遺伝子と蛋白の解析を行った。RP 患者が保有する *EYS* 遺伝子の変異の種類によって、変性視細胞モデルにおける *EYS* 遺伝子の転写産物に違いが見られた。この成果は、RP 患者の予後予測や網膜の変性機構の解明、さらには診断法・治療法の開発に役立つことが期待される。

研究協力者：

青井 則之（国立障害者リハビリテーションセンター病院 非常勤医師）

宮本 潔子（国立障害者リハビリテーションセンター研究所 感覚機能系障害研究部 派遣研究員）

小牟田 縁（国立障害者リハビリテーションセンター研究所 感覚機能系障害研究部 流動研究員）

抜本的治療法が望まれている。一方で2008年には、非定型網膜色素変性症の一つであるLeber先天性黒内障において遺伝子治療による視機能の回復が報告され、将来的にRPの治療法として遺伝子治療を含めた個別化医療が行われることが期待されている。

RPの原因となる遺伝子変異は患者毎に様々であるが、いずれの場合も最終的には視細胞の変性を引き起こす。視力を失う前に視細胞の変性を抑え、病気の進行自体を止めることが望まれている。遺伝性疾患における個別化医療では、根本的な治療を行うためにはまず原因となる遺伝子の変異が判っていることが前提条件であり、さらにその変異によって発症へと至るメカニズムが明らかになっ

A. 研究の背景と目的

網膜色素変性症（以下、RP）は、夜盲に始まり、徐々に視野狭窄、視力低下が起こる進行性の遺伝子疾患であり、現在有効な治療法はない。中途失明により就労が困難となるケースが多く、RP患者の社会生活を支援するためにも、予後の予測法や