

201419063B

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24年度～26年度 総合研究報告書

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24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 加藤 誠志

平成27(2015)年3月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 日本人網膜色素変性症患者の <i>EYS</i> 遺伝子の変異スペクトラム解析 -----	9
加藤誠志、岩波将輝	
2. <i>EYS</i> 遺伝子診断におけるスクリーニング法に関する研究 -----	27
岩波将輝	
3. <i>EYS</i> 遺伝子による網膜色素変性の遺伝疫学に関する研究 -----	33
岩波将輝	
4. <i>EYS</i> 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- ----	45
岩波将輝	
5. 変異 <i>EYS</i> を発現している変性視細胞モデルの作出に関する研究 その1 --	55
世古裕子	
6. 変異 <i>EYS</i> を発現している変性視細胞モデルの作出に関する研究 その2 --	59
世古裕子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	69
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	71

I. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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。当センター病院眼科を受診した RP 患者 262 名並びに京都大学病院眼科を受診した arRP 患者 209 名合計 471 名のゲノム DNA を用い、*EYS* 遺伝子のエクソンの塩基配列を解析することによって、約 30% の患者が、日本人に特有の 5 種の変異、EYS-JM1 (p. Ser1653Lysfs*2)、EYS-JM2 (p. Tyr2935*)、EYS-JM3 (p. Gly843Glu)、EYS-JM4 (p. Gly2186Glu)、EYS-JM5 (p. Ile2188Thr) をホモ接合やヘテロ接合で有していることが明らかになった。このことから、arRP 患者の遺伝子診断にあたっては、これら 5 種の変異スクリーニングを行うのが効率的であることが示された。3 種のミスセンス変異 EYS-JM3、EYS-JM4、EYS-JM5 については、生物種間の保存性、家系解析等により、病因変異であることが強く示唆された。遺伝子変異型と臨床重症度との関係を調べたところ、短縮型変異をホモ接合や複合ヘテロ接合で 2 つ有する患者群の方が、短縮型変異とミスセンス変異を複合ヘテロ接合で有する患者群より、視力低下の進行が早い傾向が見られた。また、患者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 (*CRX*、*NEUROD*、*RAX*、*OTX2*) 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 患者由来の誘導視細胞様細胞において、変異を有する *EYS* 遺伝子の発現産物が同定できたことから、この手法が新しい遺伝子診断法や治療法の開発につながることを期待できる。

研究分担者

岩波将輝 国立障害者リハビリテーションセンター病院 眼科医師
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

京都大学医学部医学研究科眼科学
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

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

荻野 顕 京都大学医学部医学研究科眼科学助教

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

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 視覚機能系障害研究部 派遣研究員

A. 研究目的

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。

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。日本全国では約 3~4 万人の RP 患者がいると推定されている。RP は、夜盲に始まり、徐々に視野狭窄、視力低下が起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。

研究代表者の加藤は、平成 14 年~15 年度の厚生労働省研究費 (感覚器障害) の交付を受けて、国リハ病院眼科に来院した 68 名の RP 患者について変異スクリーニングを実施し、複数の病因変異候補を同定した (Ando et al., Mol. Vis., 2007 他)。最近、研究分担者の岩波は、同一試料を用いて *EYS* の変異スクリーニングを実施した結果、arRP 患者の 1/3 において日本人特有の 3 種の主要変異、*EYS*-JM1 (p. Ser1653Lysfs*2, M1)、*EYS*-JM2

(p. Tyr2935*, M2)、*EYS*-JM3 (p. Gly843Glu, M3) を見いだした (Iwanami et al. IOVS, 2012)。また、同厚生労働省研究費によって、独自の完全長 cDNA 合成技術 (ベクターキャッピング法) を開発し (Kato et al. DNA Res., 2005; 日本・米国・欧州特許取得)、この技術で作製したヒト網膜細胞由来の完全長 cDNA クローン 16 万個を理研バイオリソースセンターに寄託・公開した (Oshikawa et al. IOVS, 2011)。もう一人の研究分担者である世古は、最近、複数の転写因子を導入することにより、ヒト虹彩細胞を視細胞様細胞へ分化誘導することに成功した (Seko et al. PLoS ONE, 2012)。

具体的な目標は、(1) 日本人 RP 患者 (目標 400 名) について、*EYS* 遺伝子の変異スペクトラムを求める、(2) ヒト皮膚細胞を視細胞に分化誘導する方法を開発する、(3) 健常者並びに RP 患者皮膚細胞を視細胞に分化誘導して変性視細胞モデルを作出し、発現遺伝子の解析を行う、(4) RP 患者由来の変性視細胞モデルを用いる診断法を開発することである。得られた成果は、予後予測や網膜の変性機構の解明、さらには治療法の開発に役立つことが期待される。

B. 研究方法

B-1 *EYS* 遺伝子の変異スクリーニング

B-1-1 対象と DNA サンプル収集

当センター病院眼科を受診した RP 患者 262 名

から網膜の臨床像と血液を収集し、血液から白血球ゲノム DNA を抽出した。対照として健常者 105 名から血液の提供を受け、ゲノム DNA を調製した。また、京都大学病院眼科から、関西圏の arRP 患者 209 名のゲノム DNA の提供を受けた。家系解析を実施する際は、親族から血液や唾液の提供を受けた。さらに健常者 100 名分の日本人由来 B 細胞株の DNA を (財) ヒューマンサイエンス振興財団のヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。

B-1-2 塩基配列決定

EYS 遺伝子のプロモータ領域並びに 44 個のエクソンとその前後のイントロン領域を、PCR 法によって増幅した。増幅産物の塩基配列を、DNA シーケンサを用いてサンガー法によって決定した。ハプロタイプは、Clark のアルゴリズムを用いて推定した。

B-1-3 コピー数多型 (Copy number variation, CNV) 解析

病因変異が片側アレルにしか見出されなかった患者サンプルについては、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用い、ゲノム上の欠失・重複の検出を行った。

B-1-4 ミスセンス変異の病原性の予測

ミスセンス変異におけるアミノ酸置換について、その病原性を以下の 4 つの方法で検討した。(a) 蛋白ドメインにおける変異アミノ酸部位の保存性

(b) 生物種間での変異アミノ酸部位の保存性

(c) 予測ソフトウェアツールを用いた変異アミノ酸部位の病原性

(d) 家系解析

(c) の解析ツールとしては、以下のものを用いた。SIFT (<http://sift.jcvi.org/>)

、PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

、PMut (<http://mmb.pcb.ub.es/PMut/>)

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

B-1-5 保因者率の推定

本研究の結果と、日本人の健常者のデータベー

スである Human Genetic Variation Browser (HGV) (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) を参照して、変異アレルの観測値をもとに、健常者(頻度 p)、保因者(ヘテロ接合)、ホモ接合(頻度 q) の頻度を集計した ($q=1-p$)。任意交配が成立しているメンデル集団において、遺伝子型 AA:Aa:aa の存在頻度比が $p^2:2pq:q^2$ となる Hardy-Weinberg 則の仮定にもとづき、 p と q の値を観測値から近似計算し、保因者率 ($2pq$) および疾患発症率 (q^2) を推定した。

B-2 直接リプログラミングによるヒト皮膚繊維芽細胞から視細胞への分化誘導

B-2-1 ヒト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、M1、M2 をホモ接合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から視細胞への分化誘導

被験者から採取したヒト皮膚繊維芽細胞を単離・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た。

B-2-3 発現産物の解析

誘導前後の細胞から mRNA を抽出後、定量 RT-PCR による視細胞特異的遺伝子の発現解析並びにマイクロアレイを用いた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。

B-2-4 薬剤による細胞死の誘導

アポトーシス、ネクローシスあるいはオートファジーを誘導する種々の薬剤を用い、アポトーシスの指標である抗活性型カスパーゼ 3 抗体陽性細胞を指標として、細胞死を起こす薬剤の種類と濃度を検討した。

B-3 倫理面への配慮

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。被験者に文書並びに口頭で十分な説明を行った後、全員からインフォームド・コンセントを文書によって得た。患者と同様に患者家族の解析についても、インフォームド・コンセント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

C-1 *EYS* 遺伝子の変異スクリーニング

C-1-1 主要変異のスクリーニングによる確定診断率

日本人 arRP 患者 471 名について、*EYS* 遺伝子に出現する日本人に特有の 3 種の変異 M1、M2、M3 を有するエクソン領域を PCR により増幅し、直接シーケンスにより塩基配列を決定した結果、M1 が 75 名 (75/471, 15.9%)、M2 が 44 名 (44/471, 9.3%)、M3 が 59 名 (59/471, 12.5%) であった。これらのいずれかの変異を有する患者は合計 142 名となり、これらの変異の出現率は 30.1% であった。これらの患者の中で、3 種の変異をホモ接合、あるいは複合ヘテロ接合で有している患者は、59 名であった。従って、3 種の変異の一次スクリーニングにより、arRP 患者の 12.5% について遺伝子の変異による arRP の確定診断が行えることになる。

C-1-2 主要変異の地域差

主要変異 M1、M2、M3 について、日本国内における地域差があるかどうかを見るために、関東圏の患者が集まる当センターのデータと関西圏の患者が集まる京大のデータを用いてアレル頻度比較した。その結果、M1 は関東圏で 10.9%、関西圏で 8.1%、M2 は関東圏で 4.6%、関西圏で 5.5%、M3 は関東圏で 7.1%、関西圏で 6.2% となった。関東圏で M1 の頻度が高いのは、ホモ接合が多いためである。

C-1-3 塩基配列変異

3 種の主要変異による一次スクリーニングの結果、片方のアレルにのみこれらの変異が見つかった患者については、*EYS* 遺伝子のプロモータ領域

並びに 44 個のエクソンとその前後のイントロン領域の塩基配列を決定した。この過程で、新たに変異が見出された場合は、その変異が存在するエクソンの塩基配列を全サンプルについて決定した。その結果、主要変異を含め総計 185 個の塩基配列変異が見出された。その内訳は、プロモータ領域に 4 個、エクソン内に 78 個、イントロン内に 103 個である(変異の詳細は、分担研究報告 II-1 の Table 1 を参照)。

塩基配列変異の内訳を見ると、一塩基置換が 158 個と最も多く、次いで欠失 15 個、挿入 8 個、indel 置換 4 個であった。MAF(minor allele frequency)が、1%以上の変異は 98 個であり、1 個(Ex43-12)以外はすべて dbSNP に登録されていた。dbSNP に登録されていない新規の塩基配列変化は 49 個あり、うちエクソン内の変異は 25 個であった。MAF が 1%未満の変異のうち、33 個は 1 サンプルにのみ見出される希少変異であった。

C-1-4 アミノ酸配列変異

一塩基置換のうち 62 個がエクソンの翻訳領域内にあり、その内訳は、ミスセンス変異が 43 個、ナンセンス変異が 6 個、サイレント変異が 13 個であった。ミスセンス変異のうち 22 個は、RP サンプルの MAF が 1%以上であり SNP である可能性が高いが、p. Gly843Glu(Ex16-2)、p. Thr2465Ser(Ex37-2)、p. Cys461Tyr(Ex9-1)、p. Gly2186Glu(Ex32-2)は、1000Genome の MAF が 0.2%以下であり、日本人に多く見られた。ミスセンス変異のうち、RP サンプルの MAF が 0.5%以上かつ対照サンプルの MAF より大きく、1000Genome の MAF の 10 倍以上の値の変異の中から病因変異の可能性の高い p. Gly2186Glu(Ex32-2) を M4、p. Ile2188Thr(Ex32-3)を M5 と呼ぶことにした。

欠失や挿入による変異 27 個のうち 13 個がエクソン内にあり、その中の 12 個がフレームシフトにより終止コドンを生成し、1 個がアミノ酸残基の欠失(p. Glu176, Ex4-3)を引き起こした。フレームシフト変異のうち、M1 と p. Asn404Lysfs*3(Ex8-1)と p. Tyr2555*(Ex39-3)以外は、一名の RP 患者サンプルにのみ見出された。

C-1-5 病因変異による診断率

病因変異の可能性が高い変異、すなわち M1 から M5 までの変異と希少フレームシフト変異並びに CNV を有する患者は、101 名(101/471, 21.4%)であった。その内訳を見てみると、両アレルの変異がホモ接合は 28 名(28/471, 5.9%)、複合ヘテロ接合は 59 名(59/471, 12.5%)、複合ヘテロ接合の可能性が高いのは 14 名(14/471, 3.0%)であった。片方のアレルにしか変異が見出せない単一ヘテロ接合は 55 名(55/471, 11.7%)であった。

C-1-6 ミスセンス変異の病原性

M1 と M2 はフレームシフトによる短縮型変異なので、その病原性については疑問の余地がない。しかし、M3 はミスセンス変異であり、健常者にも 2.5%という頻度で見出されるので、病原性かどうか明確でない。そこで、この部位の生物種間での保存性の有無、病原性を予測するソフトウェアツールによる解析、M3 を有する患者の家系解析を行った。その結果、この変異は生物種間でよく保存されており、ソフトウェアツールによっても病原性であることを示唆する結果が得られた。さらに M3 を有する 10 家系について、家系解析を行った結果、すべての家系において表現型と一致する遺伝子変異型が分離され、矛盾のないことが示された。また頻度は低い M4 (9 名)と M5 (6 名)も、生物種間の保存性や家系解析から、病原性である可能性の高いことが示唆された。

C-1-7 M3 の保因者数

M3 は健常者にも見出される。本研究からは 200 名中ヘテロ接合で 5 名が見つかり、HGV データベースには、1134 名中ヘテロ接合が 51 名、ホモ接合が 1 名の登録があった。これらの値に基づき、Hardy-Weinberg 平衡の仮定に基づいて計算すると、健常者の 25~26 人に 1 人、約 4%の保因者率と推定された。また、ホモ接合(q)の遺伝子型頻度 0.02 から疾患頻度を計算すると、EYS-RP は 2500 人あたり 1 人の発症となることが推定された。

C-1-8 遺伝子変異型と臨床重症度との関係

両アレルに EYS 遺伝子の変異が見出された患者のうち、20 歳から 80 歳の間で、2 年以上の長期経過での観察が可能であった患者 29 名の視力データをまとめた。短縮型変異をホモ接合または複合ヘテロ接合で 2 つ有する個体群 (n=15, 平均観

察期間 8.4 年±5.4 年) について、その経過時の良いほうの眼における矯正視力値を解析したところ、60 歳代において小数視力 0.1 (logMAR 1.0) 程度まで低下するものが多く観察された。一方、短縮型変異とミスセンス変異を複合ヘテロ接合で有する個体群 (n=14, 平均観察期間 8.9 年±4.4 年) では、60 歳代において小数視力 0.1 (logMAR 1.0) まで低下するものは少なく、上記の個体群と比較して、より視力低下の進行は緩やかな傾向が観察された。

C-2 直接リプログラミングによるヒト皮膚繊維芽細胞から視細胞への分化誘導

C-2-1 ヒト皮膚繊維芽細胞の分化誘導

以前、世古はヒト虹彩細胞に、4 種類の転写因子 *CRX*, *NEUROD*, *RAX*, *OTX2* 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、直接リプログラミングにより視細胞様細胞に分化誘導できることを示した (Seko et al. PLoS ONE, 2012)。そこでこの方法が皮膚繊維芽細胞にも適用できるかどうかを確かめるために、市販のヒト皮膚繊維芽細胞を用いて実験を行った。誘導前後で RT-PCR により転写産物の解析を行ったところ、ブルーオプシン、リカバリン、PDE6C、S-アンチゲン、CNGB3 などの視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子の誘導が見られた。ついで、正常ボランティアの皮膚繊維芽細胞を用いて、4 種類の転写因子遺伝子導入を行ったところ、市販の細胞と同じ結果が得られた。また、肘から採取した皮膚細胞と頭部から採取した皮膚細胞で、結果に差はなかった。

C-2-2 患者皮膚繊維芽細胞の分化誘導

M1 をホモ接合で有する患者 1 と M1 と M2 の複合ヘテロ接合を有する患者 2 の皮膚繊維芽細胞を用いて、4 因子による分化誘導を行い、変性視細胞モデルを作製した。誘導される網膜特異的遺伝子ブルーオプシンと S-アンチゲンの発現量は、正常細胞と変性視細胞モデル間で有意な差は認められなかった。誘導される遺伝子の発現量は、個体差の影響とともに、導入した転写因子 *OTX2* 遺伝子の発現量に依存することが分かった。

C-2-3 *EYS* 遺伝子の発現

直接リプログラミングによる分化誘導によっ

て、*EYS* 遺伝子の発現が起こるかどうかを調べたところ、正常ボランティア由来の皮膚繊維芽細胞の場合は、*EYS* 遺伝子のエクソン 4-10、エクソン 10-13、エクソン 25-26 いずれの領域も、誘導前の細胞ではほとんど発現が見られないが、誘導後、顕著な発現が見られた。患者由来の皮膚繊維芽細胞を用いた場合も、*EYS* 遺伝子 (エクソン 4-5、エクソン 8-9) の誘導が起こり、その発現量は正常細胞から誘導した細胞と比較して有意な差は見られなかった。

C-2-4 発現産物の塩基配列解析

患者 1 はフレームシフトによる短縮型変異である M1 (p. Ser1653Lysfs*2) のホモ接合を有するので、*EYS* 遺伝子の転写産物は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) により分解されて検出できないことが予想された。しかし、前述のように定量 RT-PCR により発現量を求めたところ、正常細胞を誘導した場合と大きな差はなかった。そこで、転写産物の変異を有する領域の塩基配列を決定したところ、ゲノムの配列と同じ変異 (一塩基 A の挿入) が見られた。

患者 2 は M1 とナンセンス変異である M2 (p. Tyr2935*) を複合ヘテロ接合で有する。転写産物の M2 の変異部位の塩基配列を解析するために、M2 変異を含むエクソン 42-43 の領域を RT-PCR で増幅したところ、誘導前にもこの部位が発現しているという予想外の結果が得られた。しかも、塩基配列を決定したところ、誘導前後で転写産物に M2 変異が存在した。以上のことから、患者 1 と患者 2 では、変異を有する転写産物が、NMD で分解されずに残っていることが明らかになった。一方、患者 3 は M1 とフレームシフト変異 p. N404Kfs*3 を複合ヘテロ接合で有する。この変異はエクソン 8 に存在するので、エクソン 6-11 の領域を増幅して、発現量並びに塩基配列を決定したところ、正常細胞と患者細胞いずれも誘導後に発現が見られ、患者由来の誘導細胞の転写産物には、変異を含む物が見られなかった。したがって、この変異の場合、転写産物は NMD 機構により分解されたことが考えられる。

C-2-5 *EYS* 蛋白質の生産

抗 C 末端抗体を用いた場合、正常細胞では誘導後 300kDa 近傍に幅広いバンドが認められた。一

方、患者1の細胞では、この領域のバンドは薄い。抗N末端抗体を用いた場合、誘導前も40kDa近傍にバンドが見られ、誘導後は正常細胞の方はバンドの濃さが減少したが、患者1では、バンドの減少は見られなかった。

C-2-6 変性視細胞モデルの変性過程解析

正常細胞由来の誘導視細胞モデルを用いて、アポトーシス、ネクローシス、オートファジーを誘導する種々の薬剤の効果を調べたところ、分化させた細胞ではアポトーシス誘導の感受性が上昇し、小胞体ストレスからアポトーシスを起こす機序が形成されていることが示唆された。

D. 考察

以前68名という小さなコホートを対象とした研究で、日本人特有の3種の変異M1、M2、M3を有する患者が3分の1近くになることを示した。今回、関西圏の患者209名を含む合計471名について、これら3種の主要変異の出現率を調べたところ約30%となり、前回の結果を確認する結果が得られた。したがって、日本人arRP患者の原因遺伝子変異を調べるのに、一次スクリーニングとして、これら3種の変異の検索を行うことが有効であることが示された。

これら3種以外に、頻度は低いM4とM5という変異が日本人特有の病因変異である可能性が示された。しかし、他の変異は希少変異の可能性が高く、このような希少変異を特定するためには、全エクソンの塩基配列を決定するしかない。そのためには、全ゲノム解析、全エクソーム解析、EYS遺伝子の全ゲノム解析、EYS遺伝子の全エクソン解析などが考えられるが、arRPの遺伝子診断という観点から見た場合、解析のやり易さとコストを考えると、全エクソーム解析がもっとも効率的と思われる。

3種の変異M3、M4、M5は、生物種間の保存性や家系解析の結果から病原性があると推測されるが、それを確かめるためには、これらの変異を有する細胞を使って、変性に関与しているかどうかを調べることが望まれる。

片側アレルに3種の主要変異の一つを含んでいるが、もう片方のアレルにEYS遺伝子の全エクソン解析によっても、変異が見つからない患者も多

く見られた。その中の何例かは、CNVで説明がついたが、欠失・重複が見つからない例もあった。残された可能性は、シーケンスしていないイントロン部位の変異が原因であるか、EYS遺伝子以外の遺伝子に変異がある場合である。

EYS遺伝子に変異がある場合、細胞変性のメカニズムを考える上で重要なのは、どのような発現産物が出来るのかを知ることである。そのためには、RP患者の視細胞でEYS遺伝子の発現産物を調べることが必要である。しかし、RP患者から視細胞を採取するのは非現実的であり、すでに変性によって視細胞が消失している場合も多い。そこで本研究で設定したもう一つの目標は、RP患者の皮膚繊維芽細胞から視細胞様細胞を作出し、その中で発現しているEYS遺伝子の転写産物やEYS蛋白質の性質を調べることであった。iPS細胞を使えば、このことは可能になるが、iPS細胞の作製や視細胞への分化には長期間を要する。そこで、直接リプログラミングによる分化誘導を試みた。

以前見出した虹彩細胞から直接リプログラミング法によって視細胞様細胞に分化させる手法を用いることによって、皮膚繊維芽細胞からも視細胞特異的な遺伝子を発現する視細胞様細胞を作出することが出来ることを明らかにした(発表論文2)。光応答電流を生成することから、光トランスダクション関連遺伝子が発現し機能していることが推察される。したがって、患者細胞を直接リプログラミング法によって、視細胞様細胞に分化させ、これを変性視細胞モデルとして用いる道が開けてきた。さらに、誘導によってEYS遺伝子が発現することが示されたので、EYS遺伝子の転写産物やEYS蛋白質の構造を調べることが可能になった。

M1とM2変異を有する患者の皮膚繊維芽細胞から誘導した変性視細胞モデルは、当初の予想に反して、転写産物は途中で終止コドンが出現するにもかかわらず、NMD機構による分解を受けることなく、変異をもったまま存在することが示された。変異の種類によっては、分解を受ける例もあることがわかり、分解されるかどうかは個々の変異に依存するものと思われる。片側アレルにしかEYS遺伝子の変異が見つからなかった患者についても、変性視細胞モデルを用いて、もう一方のアレ

ルから転写された *EYS* 遺伝子の産物を調べることに
により、より詳しい情報が得られることが期待で
きる。

もう一つ予想外の結果は、エクソン 42-43 の領
域が誘導前の皮膚繊維芽細胞にも発現している
ことである。*EYS* 遺伝子の転写産物に複数のアイ
ソフォームがあることは、Y79 のトランスクリ
プトーム解析を行った結果（発表論文 3）からも
予想されるが、今回得られたような、*EYS* 蛋白質
の C 末端側だけをコードしているような転写産物
のアイソフォームの存在はまだ報告されていな
い。今回、抗 *EYS* ペプチド抗体を用いてウェス
タンブロットを行ったが、まだ確実なことを言
えるデータは得られていない。変性視細胞モデル
で発現している *EYS* 遺伝子の様態と変性との
関係は、今後に残された課題である。

E. 結論

日本人 arRP 患者 471 名について、*EYS* 遺伝子の
エクソンの塩基配列を解析することによって、約
30% の患者が、日本人に特有の 5 種の変異、
EYS-JM1（p. Ser1653Lysfs*2）、*EYS*-JM2
（p. Tyr2935*）、*EYS*-JM3（p. Gly843Glu）、*EYS*-JM4
（p. Gly2186Glu）、*EYS*-JM5（p. Ile2188Thr）をホ
モ接合やヘテロ接合で有していることが明らか
になった。このことから、arRP 患者の遺伝子診
断にあたっては、これら 5 種の変異スクリーニ
ングを行うのが効率的であると考えられる。

患者の皮膚繊維芽細胞に、4 種類の転写因子遺
伝子（*CRX*、*NEUROD*、*RAX*、*OTX2*）を導入するこ
とにより、視細胞様細胞に分化誘導できることを示
した。得られた誘導細胞を変性視細胞モデルとし
て使うことにより、細胞内で発現している *EYS* 遺
伝子や蛋白質の様態についての手がかりを得る
ことができ、新しい診断法や治療法の開発に利
用できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 岩波将輝. *EYS* 遺伝子変異による網膜色素変性
症. 日本の眼科 85(4), 2014, p. 40-41.

2) Seko, Y., Azuma, N., Ishii, T., Komuta, Y.,
Miyamoto, K., Miyagawa, Y., Kaneda, M.,
Umezawa, A. Derivation of human
differential photoreceptor cells from adult
human dermal fibroblasts by defined
combinations of *CRX*, *RAX*, *OTX2* and *NEUROD*.
Genes Cells. 19(3), 2014, p.198-208.

3) Kato, S. Identification of genuine
alternative splicing variants for rare or
long-sized transcripts. In: DiMaggio S. and
Braschipp E. eds. *New Developments in
Alternative Splicing Research*. New York,
Nova Biomedical. 2013, p.89-108.

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.

2) 岩波将輝, 西田朋美, 中嶋明子, 世古裕子,
仲泊聡, 加藤誠志. 日本人網膜色素変性症の
EYS 遺伝子診断. 第 117 回日本眼科学会総会.
東京国際フォーラム, 東京, 2013-4-4/4-7.

3) Iwanami, M., Nishida, T., Nakadomari, S.,
Nakajima, A., Seko, Y., Kato, S. Three
founder mutations in the *EYS* gene in
Japanese patients with autosomal recessive
retinitis pigmentosa. The 10th
International Workshop on Advanced
Genomics. Tokyo, Japan, 2013-5-21/5-23.

4) 世古裕子, ヒト体細胞から網膜視細胞へのダ
イレクト・リプログラミングによる最終分化.
第 6 回網膜・リサーチ・ミーティング(RRM). JP
タワーホール&カンファランス, 東京,
2013-11-30.

5) 岩波将輝. 網膜色素変性症における遺伝子診
断とその展望. 第 57 回日本人類遺伝学会総会.
京王プラザホテル, 東京, 2012-10-24/10-27.

6) 岩波将輝, 西田朋美, 三輪まり枝, 山田明子,
西脇友紀, 小松真由美, 世古裕子, 加藤誠志,
仲泊聡. 日本人網膜色素変性症における *EYS*
遺伝子変異とその臨床像. 第 66 回日本臨床眼

科学会総会. 京都国際会館・グランドプリンス
ホテル京都, 京都, 2012-10-25/10-28.

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

日本人網膜色素変性症患者の *EYS* 遺伝子の変異スペクトラム解析

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

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

日本人常染色体劣性網膜色素変性症 (arRP) 患者の *EYS* 遺伝子の変異スペクトラムを求め、arRP の効率的な遺伝子診断法を確立することを目的とする。日本人 arRP 患者 471 名について、*EYS* 遺伝子のエクソンの塩基配列を解析することによって、約 3 割の患者が、日本人に特有の 5 種の変異、EYS-JM1 (p. Ser1653Lysfs*2)、EYS-JM2 (p. Tyr2935*)、EYS-JM3 (p. Gly843Glu)、EYS-JM4 (p. Gly2186Glu)、EYS-JM5 (p. Ile2188Thr) をホモ接合やヘテロ接合で有していることが明らかになった。このことから、遺伝子診断にあたっては、これら 5 種の変異スクリーニングを行うのが効率的であることが示された。

研究協力者

吉村長久 京都大学医学部眼科学 教授

大石明生 京都大学医学部眼科学 助教

荻野 颯 京都大学医学部眼科学 助教

A. 研究目的

本研究の目的は、日本人常染色体劣性網膜色素変性症 (arRP) 患者の *EYS* 遺伝子の変異スペクトラムを求めることである。昨年度までに収集した全サンプルについて、日本人 arRP 患者に特異的な 3 種類の変異、EYS-JM1 (p. Ser1653Lysfs*2, M1)、EYS-JM2 (p. Tyr2935*, M2)、EYS-JM3 (p. Gly843Glu, M3) の探索を目的とした一時スクリーニングを実施し、片方のアレルにしかこれらの変異が見つからなかったサンプルについて、全エクソンの塩基配列決定を行った。今年度は、以前 68 名の全エクソン解析によって変異が見つかったエクソンと、今回の全エクソン解析の結果新しく変異が見つかったエクソンについて、全サンプルの塩基配列を決定する。さらに、当センターの患者サンプルについて、可能な限り全エクソンの配列決定を

行う。

B. 方法

B-1 被験者

当センター病院眼科を受診した 262 名の arRP 患者、京都大学病院眼科を受診した 209 名の arRP 患者、対照として健常者 105 名を被験者とした。被験者から血液を採取し、ゲノム DNA を精製した。血液の提供とそれを用いた遺伝子解析に関して、当センター並びに京都大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。被験者に文書並びに口頭で十分な説明を行った後、全員からインフォームド・コンセントを文書によって得た。

B-2 塩基配列解析

EYS 遺伝子のプロモータ領域並びに 44 個のエクソンとその前後のイントロン領域を、PCR 法によって増幅した。増幅産物の塩基配列を、DNA シーケンサを用いてサンガー法によって決定した。ハプロタイプは、Clark のアルゴリズムを用いて推定した。

B-3 コピー数多型 (Copy number variation, CNV) 解析

病因変異が片側アレルにしか見出されなかった患者サンプルの一部については、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用い、ゲノム上の欠失・重複の検出を行った。

C. 結果

C-1 塩基配列変異

表 1 に、*EYS* 遺伝子のプロモータ領域並びに全エクソンとその前後のイントロン領域に見出されたすべての塩基配列変異を示した。総計 185 個の塩基配列変異が見出された。その内訳は、プロモータ領域に 4 個、エクソン内に 78 個、イントロン内に 103 個である。塩基配列変異の内訳を見ると、一塩基置換が 158 個と最も多く、次いで欠失 15 個、挿入 8 個、indel 置換 4 個であった。MAF (minor allele frequency) が 1% 以上の変異は 98 個であり、1 個 (Ex43-12) 以外はすべて dbSNP に登録されていた。MAF が 1% 未満で dbSNP に登録されていない新規の塩基配列変化は 49 個あり、うちエクソン内の変異は 25 個であった。MAF が 1% 未満の変異のうち、33 個は 1 サンプルにのみ見出される希少変異であった。

C-2 アミノ酸配列変異

一塩基置換のうち 62 個がエクソンの翻訳領域内にあり、その内訳はミスセンス変異が 43 個、ナンセンス変異が 6 個、サイレント変異が 13 個であった。ミスセンス変異のうち 22 個は RP サンプルの MAF が 1% 以上であり、SNP である可能性が高いが、p. Gly843Glu (Ex16-2)、p. Thr2465Ser (Ex37-2)、p. Cys461Tyr (Ex9-1)、p. Gly2186Glu (EX32-2) は、1000Genome の MAF が 0.2% 以下であり、日本人に特徴的であった。この中で、p. Gly2186Glu (EX32-2) 以外は、RP サンプルのみでなく対照サンプルでも見られるが、RP サンプルの方が MAF の値は大きい。RP サンプルの MAF が 0.5% 以上で、かつ対照サンプルの MAF より大

きく、1000Genome の MAF の 10 倍以上の値の変異に対して、便宜上以後、p. Gly2186Glu (EX32-2) を M4、p. Ile2188Thr (Ex32-3) を M5、p. Cys461Tyr (Ex9-1) を M6、p. Thr2465Ser (Ex37-2) を M7 と呼ぶことにする。

欠失や挿入による変異 27 個のうち 13 個がエクソン内にあり、その中の 12 個がフレームシフトにより終止コドンを生じ、1 個がアミノ酸残基の欠失 (p. Glu176, Ex4-3) を引き起こした。フレームシフト変異のうち、M1 と p. Asn404Lysfs*3 (Ex8-1) と p. Tyr2555* (Ex39-3) 以外は、一名の RP 患者サンプルにのみ見出された。p. Asn404Lysfs*3 (Ex8-1) は 3 名の RP 患者に、また p. Tyr2555* (Ex39-3) は一名の対照サンプルにも認められた。

C-3 被験者の変異スペクトラム

表 2 に、アミノ酸配列変異と希少塩基配列変異、CNV を有する被験者サンプルのリストを示す。患者 471 名中、239 名 (239/471, 50.7%) の患者にこれらの変異が見られた。M1 が 75 名 (75/471, 15.9%)、M2 が 44 名 (44/471, 9.3%)、M3 が 59 名 (59/471, 12.5%)、M4 が 9 名 (9/471, 1.9%)、M5 が 6 名 (6/471, 1.3%)、M6 が 28 名 (28/471, 5.9%)、M7 が 29 名 (29/471, 6.2%) であった。他のマイナーなフレームシフト変異は、11 名 (11/471, 2.3%) に見られた。M3、M6、M7 は、対照にもそれぞれ 4 名、3 名、4 名見出された。CNV 解析により、エクソンが欠失している患者が 8 名、重複している患者が 1 名見出された。

主要変異 M1、M2、M3 について、日本国内における地域差があるかどうかを見るために、関東圏の患者が集まる当センターのデータと関西圏の患者が集まる京大のデータを用いてアレル頻度を比較した。その結果、M1 は関東圏で 10.9%、関西圏で 8.1%、M2 は関東圏で 4.6%、関西圏で 5.5%、M3 は関東圏で 7.1%、関西圏で 6.2% となった。関東圏で M1 の頻度が高いのは、ホモ接合が多いためである。

病因変異の可能性が高い変異、すなわち M1 から M5 までの変異と希少フレームシフト変異並びに CNV を有する患者は、101 名 (101/471、21.4%) であった。その内訳を見てみると、両アレルの変異がホモ接合は 28 名 (28/471、5.9%)、複合ヘテロ接合は 59 名 (59/471、12.5%)、複合ヘテロ接合の可能性が高いのは 14 名 (14/471、3.0%) であった。片方のアレルにしか変異が見出せない単一ヘテロ接合は 55 名 (55/471、11.7%) であった。

C-4 ハプロタイプ解析

M1、M2、M3 については、それぞれ各領域において同一ハプロタイプ上にあることを以前示した。新たにこれらの変異が見出された患者についても、このことが確認された。M4 と M5 の周辺には適当な SNP が存在しなかったため、ハプロタイプを決めることは出来なかった。M6 と M7 については、それぞれ同じハプロタイプ上にあることが示された。

D. 考察

以前、我々は 68 名の患者について、約 3 分の 1 の患者が *EYS* 遺伝子に病因変異を有することを示したが、今回、被験者数を 471 名まで増やしても、ほぼ同じ割合で変異を有することが示された。別稿で述べる家系解析の結果から、M3、M4、M5 も病因変異である可能性が高いので、これら変異を両アレルにホモ接合、複合ヘテロ接合で有する患者は 78 名で全体の 16.6% となる。さらに、これらを片方のアレルに有するものを含めると 147 名 (147/471、31.2%) となる。したがって、これら 5 個の変異を対象とした一次スクリーニングを実施することにより、約 30% の患者の *EYS* 遺伝子の変異を同定できることになる。

M1、M2、M3 については、以前それぞれ同じハプロタイプにあることを示したが、今回そのことが再確認できた。ただ M4 と M5 については、近傍に SNP が見出せなかったため、ハプロタイプ解析は出来なかったが、家系解析の結果を考慮すると、

それぞれ同じハプロタイプに乗っている可能性が高いと思われる。

M4 (p. Gly2186Glu, Ex32-2) と M5 (p. Ile2188Thr, Ex32-3) は、いずれもラミニン G 様ドメイン 2 内に 1 個アミノ酸残基を挟んで存在する。オラウータン、マーモセット、ウマ、イヌに対応する配列が存在するが、M4 の Gly はこれらの種で保存されており、M5 はマーモセットのみ Val である。従って、いずれも種間で保存されていないアミノ酸残基への変異である。

今回、M6 と M7 という 2 種類のミスセンス変異がいずれも MAF が約 3% という頻度で見出された。両者は対照にも存在し、MAF はそれぞれ 1.5% と 2% であった。1000Genome の MAF は、それぞれ 0.2% と 0.06% なので、日本人に特徴的な変異である。M6 (p. Cys461Tyr, Ex9-1) は、EGF 様ドメイン 5 と EGF 様ドメイン 6 の間に位置し、オラウータンとマーモセットにも対応する配列があるがマーモセットでは Tyr になっている。M7 (p. Thr2465Ser, EX37-2) は、ラミニン G 様ドメイン 3 に存在し、オラウータン、マーモセット、ウマ、イヌ、オポッサム、カモノハシ、ニワトリ、ゼブラフィッシュに対応する配列があるが、ゼブラフィッシュは、Ser になっている。以上のことから、M6 と M7 は、病因変異ではなく日本人に特徴的な SNP と考えた方がよいと思われる。ただ、M6 か M7 を有する患者の約 4 割が、両者を有していた。ただ、両者は 1.55Mb も離れており、連鎖しているとは考え難く、むしろ同一創始者に由来する可能性が考えられる。

このことに関連して、M2 (p. Tyr2935, Ex43-5) と 3' UTR の中に存在する (c. *183, Ex43-12) が、完全に連鎖していることは興味深い。これらは同一創始者に同じ時期に変異が生じた可能性がある。

ナンセンス変異は 6 個見出されたが、M2 と p.Trp2640* (EX41-1) 以外は、1 例ずつのみ見出された。また、フレームシフト変異は 12 個見出されたが、M1 と p. Asn404Lysfs*3 (Ex8-1) 以外は、1

例ずつしかなかった。p.Trp2640*は4例、p.Asn404Lysfs*3は3例見つかったので、いずれも家系が存在する可能性がある。p.Glu176del(Ex4-3)は5例見つかった。その中の4例は、M1、M2、M3のいずれかとの複合ヘテロ接合であったことから、病因変異の可能性が高いと思われる。また、43個のミスセンス変異のうち10個は、MAFが0.5%以下であり1000Genomeにも含まれていないことから、希少病因変異の可能性が高い。これらのことを確かめるためには家系解析が必要である。

プロモータ領域とスプライシング部位に変異は見出せなかったが、イントロン内には多くの変異が見出された。エクソン-イントロン境界近傍にある変異としては、c.1300-3C>T(In8-4)、c.146-5dupT(In9-3)、c.3444-5C>T(In22-1)、c.6571+6T>A(In32-1)などが見られるが、これらがスプライシングに影響を及ぼすかどうかは、検討が必要である。

対照にも病因変異を有する被験者が5名見つかった。4名はM3をヘテロ接合で有しており、1名(CT170)は、短縮型変異p.Tyr2555*を有していた。これらの被験者は、保因者と考えられる。

E. 結論

日本人 arRP 患者の遺伝子診断を行うのに、一次スクリーニングとして *EYS* 遺伝子に見られる日本人に特有の5種類の変異 M1、M2、M3、M4、M5 を調べることが有効であることが示された。約30%の患者がこれら5種の変異のいずれかを有していた。これら以外の変異は、MAFが0.5%以下の希少変異であり、エクソーム解析等による網羅的解析が必要となる。また、片方のアレルにのみこれらの変異が見出された場合は、もう一方に CNV があることもあるので、その有無を検討する必要がある。

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

(予定を含む。)

なし。

Table 1 Sequence variations in EYS gene locus

SV ID	Primer	Region	SNP ID	Nucleotide change	AA change	Minor Allele Frequency			MX
						RP	CT	1000Genome	
Pr1	1R	Promoter	rs9453373	c.-1237G>T		0.0923		T=0.1915/959	
Pr2	1R	Promoter	rs147501078	c.-849_-848insA		0.2680		ins=0.1116/559	
Pr3	1R	Promoter	rs9294647	c.-804C>A		0.3591		A=0.3361/1683	
Pr4	1R	Promoter	rs12660682	c.-648G>T		0.0540		T=0.0272/136	
Ex1-1	1	Exon 1	rs1490127	c.-500A>G		0.0880	0.0809	G=0.1915/959	
In3-1	3	Intron 3	rs13217899	c.-198+83T>A		0.0563		A=0.0950/476	
Ex4-1	4F1/F3	Exon 4	rs112609906	c.334G>C	p.Val112Leu	0.0079	0.0000	A=0.0086/43	
Ex4-2	4F1/F3	Exon 4	rs12193967	c.359C>T	p.Thr120Met	0.3241	0.3100	T=0.1703/853	
Ex4-3	4F3	Exon 4	-	c.525_527delGGA	p.Glu176del	0.0053		-	
Ex4-4	4F3	Exon 4	-	c.632G>A	p.Cys211Tyr	0.0032	0.0000	-	
In4-1	5	Intron 4	-	c.749-136T>A		0.0015		-	
In4-2	5	Intron 4	rs551877761	c.749-132C>T		0.0150		T=0.0004/2	
In5-1	5	Intron 5	rs4710522	c.862+87T>C		0.0646		C=0.0970/486	
In5-2	5	Intron 5	rs4710521	c.862+391A>T		0.0657		A=0.0970/486	
In5-3	6R	Intron 5	-	c.863-94A>G		0.0015	0.0000	-	
Ex6-1	6R	Exon 6	-	c.942de1T	p.Ala315Leufs*24	0.0015	0.0000	-	
Ex6-1	6R	Exon 6	rs80095433	c.1005G>T	p.Glu335Asp	0.0090	0.0153	T=0.0006/3	
Ex7-1	7	Exon 7	rs974110	c.1146T>C	p.Asn382=	0.4610		T=0.4940/2474	
In7-1	7	Intron 7	-	c.1184+124T>G		0.0015		-	
In7-2	7	Intron 7	rs373800075	c.1184+261T>C		0.0030		C=0.0004/2	
Ex8-1	8	Exon 8	-	c.1211dupA	p.Asn404Lysfs*3	0.0032	0.0000	-	
In8-1	8	Intron 8	rs1155668	c.1299+357T>C		0.4872	0.4516	C=0.4006/2006	
In8-2	8	Intron 8	rs1155669	c.1299+457G>A		0.4814	0.4516	A=0.4008/2007	
In8-3	9	Intron 8	-	c.1300-108T>C		0.0000	0.0051	-	
In8-4	9	Intron 8	rs1936439	c.1300-3C>T		0.4441	0.4444	C=0.3488/1747	
Ex9-1	9	Exon 9	rs76754818	c.1382G>A	p.Cys461Tyr	0.0297	0.0152	A=0.0020/10	M6
In9-1	9	Intron 9	rs9453265	c.1459+103C>T		0.2505	0.2806	T=0.2394/1199	
In9-2	9	Intron 9	rs201155768	c.1459+229_1459+230delTA		0.0751	0.0707	del=0.0246/123	
In9-3	10	Intron 9	-	c.1460-5dupT		0.0015	0.0000	-	
Ex10-1	10	Exon 10	-	c.1485_1493delGGTTATTGgainsCGAAAG	p.Val496Gluufs*13	0.0015	0.0000	-	
In10-1	11	Intron 10	rs190462222	c.1600-126T>C		0.0058	0.0100	C=0.001/2	
In10-1	11	Intron 10	rs77096978	c.1600-82A>T		0.0456	0.0500	T=0.0076/38	
Ex11-1	11	Exon 11	rs61753610	c.1712A>G	p.Gln571Arg	0.1146	0.1300	G=0.1242/622	
Ex11-2	11	Exon 11	rs527236072	c.1750G>T	p.Glu584*	0.0021	0.0000	NA	

In11-1	11	Intron 11	rs76148513	c.1766+61A>G		0.0042	0.0050	G=0.041/90	
In11-2	11	Intron 11	-	c.1766+95G>A		0.0021	0.0000	-	
In11-3	12	Intron 11	rs188568438	c.1767-87T>C		0.0121	0.0147	C=0.0016/8	
In11-4	12	Intron 11	-	c.1767-49C>A		0.0000	0.0074	-	
Ex12-1	12	Exon 12	rs9345601	c.1809T>C	p.Val603=	0.0755	0.0882	C=0.4052/2029	
Ex12-2	12	Exon 12	rs9342464	c.1891G>A	p.Gly631Ser	0.0755	0.0882	G=0.4050/2028	
Ex12-3	12	Exon 12	rs17411795	c.1922A>T	p.Glu641Val	0.0740	0.0882	T=0.1042/522	
Ex12-4	12	Exon 12	-	c.1929A>T	p.Asp643=	0.0030	0.0000	-	
Ex12-5	12	Exon 12	rs144430026	c.1985G>T	p.Arg662Met	0.0408	0.1176	T=0.0108/54	
In12-1	12	Intron 12	rs374955689	c.2023+15delT		0.0742	0.0882	NA	
In12-2	13	Intron 12	rs372205279	c.2024-14delCinsTT		0.0245		NA	
In13-1	13	Intron 13	rs185460544	c.2137+40A>C		0.0015		C=0.0002/1	
In13-2	13	Intron 13	rs10455568	c.2137+114C>T		0.0229		T=0.0661/331	
In13-3	13	Intron 13	rs10455567	c.2137+239A>G		0.0245		G=0.0669/335	
In13-4	13	Intron 13	rs117654837	c.2137+320A>G		0.0046		G=0.0044/22	
In13-5	13	Intron 13	rs10455185	c.2137+374T>A		0.0231		A=0.0611/306	
In13-6	13	Intron 13	rs10455566	c.2137+405G>C		0.0231		C=0.0613/307	
In13-7	13	Intron 13	rs9453167	c.2137+412T>A		0.0462		A=0.2995/1500	
Ex14-1	14	Exon 14	-	c.2259C>T	p.Leu753=	0.0046		-	
In14-1	14	Intron 14	rs376045129	c.2259+164delT		0.0000		--=0.1044/523	
In14-2	15	Intron 14	rs9453115	c.2260-76G>A		0.3419	0.2647	A=0.3948/1977	
In15-1	15	Intron 15	rs12196494	c.2381+417T>C		0.1837	0.1912	C=0.1709/856	
In15-2	16	Intron 15	rs9445437	c.2382-26C>G		0.4512	0.3951	G=0.3534/1770	
Ex16-1	16	Exon 16	rs150194717	c.2490T>C	p.Pro830=	0.0021	0.0024	C=0.001/2	
Ex16-2	16	Exon 16	rs74419361	c.2528G>A	p.Gly843Glu	0.0701	0.0122	A=0.0014/7	M3
Ex16-3	16	Exon 16	rs9294631	c.2555T>C	p.Leu852Pro	0.4501	0.3951	T=0.3536/1771	
In16-1	16	Intron 16	rs117137733	c.2641+35A>G		0.0510	0.0829	G=0.0182/91	
In16-2	16	Intron 16	rs10046141	c.2641+198A>C		0.4469	0.3902	A=0.3556/1781	
In16-3	16	Intron 16	rs183476685	c.2641+205G>A		0.0032	0.0024	A=0.0002/1	
In16-4	16	Intron 16	rs67221279	c.2641+254delT		0.4039	0.5320	T=0.3361/1683	
In17-1	17-18	Intron 17	-	c.2739-42T>C		0.0015		-	
In18-1	17-18	Intron 18	rs59518422	c.2846+53_2846+54insTAAT		0.3582		--=0.2867/1436	
In18-2	17-18	Intron 18	rs57706332	c.2846+192A>G		0.1592		G=0.1066/534	
In18-3	19	Intron 18	rs59191409	c.2847-221C>T		0.4924		T=0.2218/1111	
In18-4	19	Intron 18	rs58449017	c.2847-157A>G		0.4924		A=0.2218/1111	
In18-5	19	Intron 18	rs7743515	c.2847-24C>T		0.1057		C=0.1564/783	
Ex19-1	19	Exon 19	-	c.3518C>G	p.Pro994Ala	0.0030		-	
In20-1	20	Intron 20	-	c.3164+296G>A		0.0048		-	

In20-2	20	Intron 20	rs188297913	c.3164+360G>A		0.0095		A=0.0004/2	
In22-1	22	Intron 22	rs9345532	c.3443+160T>G		0.3420		G=0.4201/2104	
In22-2	22	Intron 22	rs56215318	c.3443+253delT		0.1392		--=0.1456/729	
In22-3	23	Intron 22	rs7760032	c.3444-283A>G		0.3614	0.4559	A=0.4123/2065	
In22-4	23	Intron 22	rs558307468	c.3444-274C>A		0.0030	0.0000	A=0.0002/1	
In22-5	23	Intron 22	-	c.3444-149A>G		0.0090	0.0000	-	
In22-6	23	Intron 22	-	c.3444-141C>T		0.0015	0.0074	-	
In22-1	23	Intron 22	rs9445051	c.3444-5C>T		0.2892	0.3284	T=0.228/496	
Ex23-1	23	Exon 23	rs371491059	c.3454G>A	p.Gly1152Arg	0.0015	0.0074	NA	
Ex23-2	23	Exon 23	rs150951106	c.3489T>A	p.Asn1163Lys	0.0030	0.0000	A=0.0018/9	
In23-1	23	Intron 23	rs62415853	c.3568+99C>A		0.2553	0.1194	A=0.0990/496	
In24-1	24	Intron 24	-	c.3684+93G>T		0.0024		-	
In24-2	24	Intron 24	-	c.3684+101T>C		0.0024		-	
In24-3	25	Intron 24	-	c.3685-94T>C		0.0030	0.0000	-	
Ex25-1	25	Exon 25	rs17404123	c.3787A>G	p.Ile1263Val	0.2681	0.1223	G=0.0938/470	
Ex25-2	25	Exon 25	rs368856942	c.3809T>G	p.Val1270Gly	0.0045	0.0000	G=0.0004/2	
In25-1	25	Intron 25	rs139235690	c.3877+18_3877+22delAGATA		0.2681	0.1211	del=0.0911/456	
In25-2	25	Intron 25	rs553365985	c.3877+93delT		0.2470	0.2611	T=0.2396/1200	
In25-3	25	Intron 25	rs16895524	c.3877+112T>C		0.2682	0.1250	C=0.0938/470	
In25-4	25	Intron 25	rs75420781	c.3877+133T>A		0.2682	0.1250	A=0.0938/470	
In25-5	25	Intron 25	rs12661208	c.3877+282G>C		0.2682	0.1169	C=0.0938/470	
In25-6	26F02	Intron 25	rs140222628	c.3878-95G>A		0.0160	0.0050	A=0.0048/24	
In25-7	26F02	Intron 25	rs12663927	c.3878-92C>G		0.2313	0.1050	G=0.0938/470	
In25-8	26F02	Intron 25	rs74621474	c.3878-31C>T		0.0043	0.0000	T=0.0004/2	
Ex26-1	26F02	Exon 26	rs12663916	c.3906C>T	p.His1302=	0.2313	0.1050	T=0.0938/470	
Ex26-2	26F02	Exon 26	rs12662610	c.3936A>G	p.Thr1312=	0.2313	0.1050	C=0.0966/484	
Ex26-3	26F02	Exon 26	rs12663622	c.3973C>G	p.Gln1325Glu	0.2313	0.1050	G=0.0938/470	
Ex26-4	26F02	Exon 26	rs12663619	c.4026C>T	p.Ser1342=	0.2313	0.1050	T=0.0938/470	
Ex26-5	26F02	Exon 26	rs17403955	c.4081A>G	p.Ile1361Val	0.2313	0.1050	G=0.0938/470	
Ex26-6	26F02	Exon 26	rs624851	c.4256T>C	p.Leu1419Ser	0.2468	0.2450	T=0.2185/1094	
Ex26-7	26F02	Exon 26	rs62415828	c.4352T>C	p.Ile1451Thr	0.2313	0.1150	C=0.0940/471	
Ex26-8	26F02/26-4F	Exon 26	rs527236075	c.4387delA	p.Arg1463Glyfs*15	0.0011	0.0000	NA	
Ex26-9	26F02/26-4F	Exon 26	rs527236073	c.4402_4403insTCAAGAGG	p.Asp1468Valfs*13	0.0011	0.0000	NA	
Ex26-10	26-4F	Exon 26	-	c.4455A>G	p.Arg1485=	0.0011	0.0000	-	
Ex26-11	26-4F	Exon 26	rs62415827	c.4543C>T	p.Arg1515Trp	0.2330	0.1111	T=0.0938/469	
Ex26-12	26-4F	Exon 26	rs62415826	c.4549A>G	p.Ser1517Gly	0.2335	0.1111	G=0.0938/470	
Ex26-13	26-4F	Exon 26	rs62415825	c.4593G>A	p.Glu1531=	0.2335	0.1111	A=0.0938/470	
Ex26-14	26-4F	Exon 26	rs77523865	c.4897A>G	p.Lys1633Glu	0.0032	0.0051	G=0.0005/1	