

変異のアレル頻度について

arRP 患者 440 名における EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3 の各創始者変異の出現個体の頻度を検討すると、EYS-JM1 (63/440, 14.3%, ホモ 16, ヘテロ 47)、EYS-JM3 (56/440, 12.7%, ホモ 5, ヘテロ 51)、そして EYS-JM2 (39/440, 6.9%, ホモ 3, ヘテロ 33) の順に多く観察された。同様に各変異のアレル頻度 (n=880 染色体あたり) は、EYS-JM1 (88/880, 10.0%)、EYS-JM3 (61/880, 6.9%)、そして EYS-JM2 (45/880, 5.1%) の順に多く観察された (図 7)。

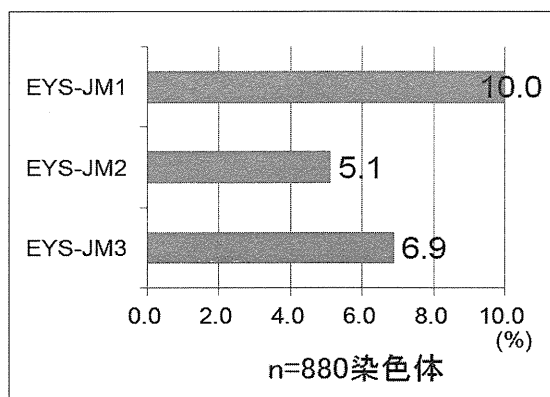


図 7. arRP 患者 440 名における 3 つの創始者変異のアレル頻度 (%)

次いで健常者 200 名における EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3 の各創始者変異のアレル頻度を示す (図 8)。EYS-JM3 のみ、ヘテロ接合の保因者の存在が観察され、そのアレル頻度は 1.25% (5/400) であった。EYS-JM3 のホモは健常者 200 名において観察されなかった。

5. EYS-JM3 (ミスセンス変異、p. G843E) の病原性変異としての信頼性の検討

上述のようにミスセンス変異 p. G843E については、健常者における保因者が、2.5% (5/200) の頻度で認められることから、病原性変異としての詳細な検討が必要と考えられた。そこで、以下の 4 項目についての検討を行ったが、いずれの結果も、p. G843E の病原性を示唆する結果であった。

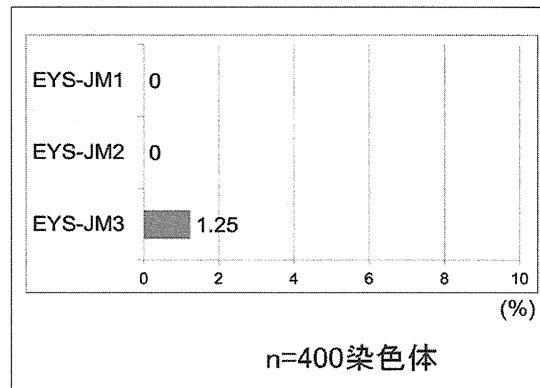


図 8. 健常者 200 名における 3 つの創始者変異のアレル頻度 (%)

(a) 843 番目アミノ酸の EYS 蛋白質-EGF ドメインにおける保存性の検討

EYS 蛋白質がもつ 18 個の EGF-like ドメインにおける G843 相当のアミノ酸部位の相同性を比較すると、EGF ドメイン 1-18 の順に、G/G/G/D/G/G/G/G/G/G/G/G/G/G/G (太字下線が G843 に相当) と、EGF-like ドメイン内において、極めて保存されたアミノ酸部位であることが確認された。EGF-like ドメインの 2 次元構造と保存されたアミノ酸配列 (黒丸) G843 相当のアミノ酸部位を矢印で示す (図 9、矢印)。

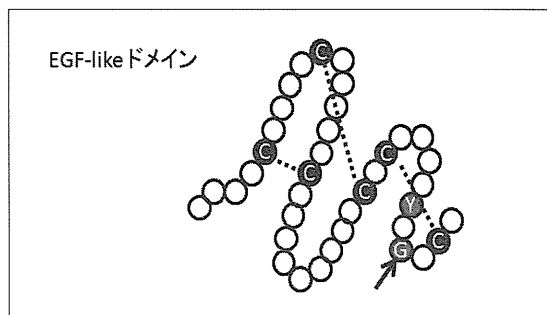


図 9. EGF-like ドメインの構造図

(b) 843 番目アミノ酸の EYS 蛋白質における生物種間での保存性

Human/Orangutan/Marmoset/Horse/Dog/Opossum/Platypus/Chicken/Zebrafish/Drosophila の順に、G843 アミノ酸に相当する部位の検討を行った。結果、G/G/G/G/G/G/G/A/G とほぼ生物進化上も

よく保存されたアミノ酸であることが確認された。

(c) 予測ソフトウェアツールを用いた p. G843E の病原性解析

病原性を予測する 4 種類の解析ツール SIFT, PolyPhen-2, PMut, SNAP を用いて、p. G843E 変異の病原性を予測した。すべての結果において、「病原性」との予測結果を得た (図 10)。

Computational prediction	Results
SIFT	Damaging Score 0.00 (<0.05)
PolyPhen2	Probably Damaging Score 1.00
PMut	Pathological
SNAP	Non-Neutral

図 10. 予測ソフトウェアツールを用いた p. G843E の病原性解析

(d) 家系解析における病原性の検討

ミスセンス変異 p. G843E における表現型と遺伝型の家系における分離解析を行った。代表的な家系解析の 2 例を示す (図 11)。

RP206 家系 (EYS-JM1 (p. S1653Kfs*2) と EYS-JM3 (p. G843E) の複合ヘテロ接合体、および RP134 家系 (EYS-JM2 (p. Y2935*) と EYS-JM3 (p. G843E) の複合ヘテロ接合体のいずれにおいても、罹患者と非罹患者において表現型と遺伝型の関係が矛盾なく一致することが確認された。他、7 家系の解析においても、同様に一致することから、ミスセンス変異である p. G843E の病原性を示唆する結果を得た。

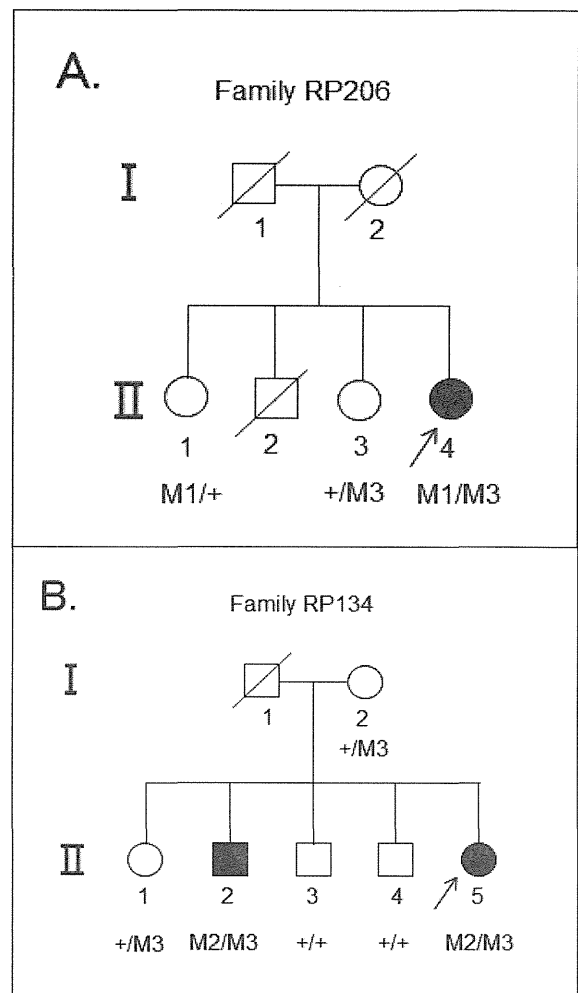


図 11 p. G843E 変異を有する家系解析

(A) RP206 家系、(B) RP134 家系

M1: 変異 p. S1653Kfs*2 (EYS-JM1),

M2: 変異 p. Y2935* (EYS-JM2)

M3: 変異 p. G843E (EYS-JM3)

□男性, ○女性, ■罹患男性, ●罹患女性, 矢印 (→) 発端者を示す。

また他の短縮型変異 (p. S2428*, p. W2640* など) と複合ヘテロ接合体で同定されることもこれらを支持する結果であり、EYS-RP 患者 92 名のうち 24 家系が、短縮型変異と EYS-JM3 (p. G843E) の複合ヘテロ接合体であった。

6. EYS-JM3 (ミスセンス変異、p. G843E) における保因者率の推定

図 8 に示すように、健常者 200 名における EYS-JM3 (p. G843E) の保因者 (ヘテロ接合) は、5 名 (5/200, 2.5%) であった。つづいて、日本人の健常者のデータベース HGV より、

p. G843E(rs74419361) アレルのデータを参照すると、健常者 1134 名のうち、保因者（ヘテロ接合）は 51 名 (51/1134, 4.5%)、ホモ接合は 1 名 (1/1134, 0.08%) であった。これら合計を表 2 に示す。

表 2. EYS-JM3 (p. G843E) の保因者数

健常者 解析	母数 (人数)	健常者(p; +) +/+	保因者 p.G843E/+	ホモ(q; p.G843E) p.G843E/p.G843E
1. 当施設	200	195	5	0
2. HGV	1134	1082	51	1
合計	1334 名	1277 名	56	1

両解析における各遺伝型の観測人数を合わせると、母数は 1334 名 (200+1134) となり、保因者とホモ接合を除いた健常者 (p) : 保因者（ヘテロ接合） : ホモ接合 (q) は、それぞれ 1277 名 (1277/1334, 95.7%) : 56 名 (56/1334, 4.1.9%) : 1 名 (1/1334, 0.07%) となった。これら観測値にもとづき保因者率の推定をハーディ・ワインベルク平衡の仮定（方法参照）にもとづいて検討を行った（表 3）。

表 3. EYS-JM3 (p. G843E) の保因者率の推定

表現型	遺伝子型	頻度	計算値
健常者(p)	+/+	0.957 (1277/1334)	0.964 (p ²)
保因者 ヘテロ接合	p.G843E/+	0.0419 (56/1334)	0.0394 (2pq)
EYS-RP(q)	p.G843E/	0.00007 (1/1334)	0.0004 (q ²)
ホモ接合	p.G843E		

Hardy-Weinberg 法則より、健常者 (p) の遺伝子型頻度は 0.98、またホモ接合 (q) の遺伝子型頻度は 0.02 と計算された。

結果、観測された頻度より算出される健常者 (p) の遺伝子型頻度は 0.98、またホモ接合 (q) の遺伝子型頻度は 0.02 (RP 発症) に近似され、保因者の頻度は $2pq=2 \times 0.98 \times 0.02=0.0392=1/25.5$

と計算された。すなわち、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、 $q^2=0.0004=1/2500$ 、すなわち EYS-RP は 2500 人あたりに 1 人の発症となることが推定された。

他の EYS-JM1、EYS-JM2 変異についても、HGV データを参照すると、それぞれの保因者（ヘテロ接合）の存在は、EYS-JM1 (5/729)、EYS-JM2 (7/730) であり、いずれもホモ変異体は認めなかった。EYS-JM3 と同様に保因者率を推定すると、ほぼ 0 と推定される結果となった。

7. 創始者変異 (EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3) 以外に同定された変異

arRP 患者 440 名における EYS 遺伝子の解析結果から、EYS-JM1、EYS-JM2、および EYS-JM3 を除き、複数名の患者より同定された変異を頻度順 (4 番目以降) に表 4 にまとめた。これら以外に 1 個体でのみ検出された低頻度の変異は全部で 13 種類あり、すべて合わせると 21 種類の変異が同定された。これらのうち少なくとも 10 種類は未報告の新規変異であり、すべての変異が EGF 様ドメインや Laminin G ドメイン内、または coiled-coil ドメインすぐ近傍に存在した。

表 4. arRP 患者 440 名から同定された EYS 遺伝子変異

(EYS-JM1 から JM3 に続く頻度 4 番目以降の変異を示す)

No.	エクソン	塩基配列	アミノ酸変異	変異タイプ	アレル頻度
4	32	c.6557G>A	p.G2186E	Missense	12/880
5	32	c.6563T>C	p.I2188T	Missense	6/880
6	4	新規	新規	Frameshift	3/880
7	8	c.1211dupA	p.N404Kfs*3	Nonsense	2/880
8	11	新規	新規	Nonsense	2/880

8. 遺伝子変異型-表現型における臨床重症度の評価

arRP 患者 440 名における EYS 遺伝子の解析結果から同定された 92 名の EYS-RP 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。

まず、短縮型変異（機能欠失変異体あるいはC末端欠失変異体）をホモ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プロットした（図12）。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。

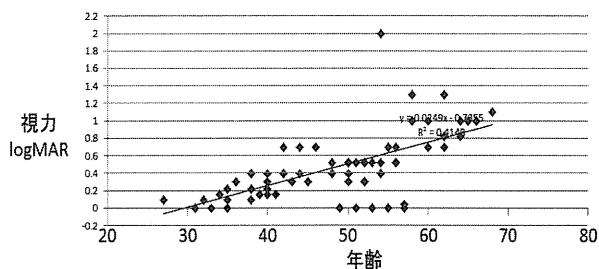


図12 短縮型変異をホモまたは複合ヘテロ接合で2つ有する個体群（n=15）

つづいて短縮型変異とミスセンス変異（異常蛋白質を生じる変異）を複合ヘテロ接合で有する個体群についても同様に解析を行った（図13）（n=14、平均観察期間8.9年±4.4年）。これら短縮型変異とミスセンス変異の個体群においては、60歳代において小数視力0.1（logMAR1.0）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。

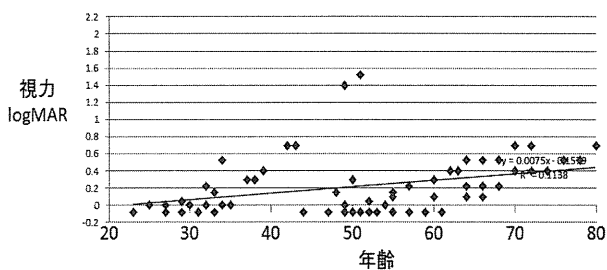


図13 短縮型変異とミスセンス変異を複合ヘテロ接合で2つ有する個体群（n=14）

E. 考察

1. EYS 遺伝子診断法の検討

arRP患者440名におけるEYS遺伝子の詳細な解析結果から、EYS遺伝子変異を有する患者は142

名、出現率は32.3%（142/440）であった。このうち、EYS-JM1、EYS-JM2、およびEYS-JM3の3つの創始者変異を有する割合は92.9%（132/142）であった。さらに、EYS-JM1、EYS-JM2、およびEYS-JM3に加えて、これらに続いて頻度の高いエクソン32の2つの変異（p.G2186E, p.I2188T）を有する患者を含めた場合、陽性が5名増えて137名、96.4%（137/142）となった。従って、EYS-JM1（エクソン26）、EYS-JM2（エクソン43）、EYS-JM3（エクソン16）、およびp.G2186E, p.I2188T（エクソン32）の変異を用いて一次スクリーニングを実施した場合、このスクリーニング法の感度は31.1%（137/440）、特異度は97.5%（195/200）となった。一方で、本解析において、このスクリーニング法によって検出が不能と判断された5名（5/142, 3.6%）については、エクソン10、35、39、40における低頻度の変異であり、全エクソンの解析を要するものが含まれていることから、この簡易的な一次スクリーニング方法はEYS-RPの患者群において、96.4%の陽性率を持つと同時に3.6%の偽陰性を持つことが示唆された。今後、これら精度の向上を可能とする詳細な検討が求められる。

EYS遺伝子変異を有する患者142名のうち、EYS遺伝子変異の両側アレルからの検出によるRPと診断に至ったEYS-RP患者は、全体（n=440）の20.9%にあたる92名であったが、これらEYS-RP患者における3つの創始者変異を有する割合は94.6%（87/92）であった。しかしながら、EYS-JM1、EYS-JM2、およびEYS-JM3のみの同定では、EYS-RP患者92名うち70名（70/92, 76.0%）の両側アレルの同定にしか至らず、加えて全エクソンにおける変異同定を行うことで、84名（84/92, 91.3%）の診断を得る結果であった。そして、残る片側アレルからのみ変異の同定された58名におけるMLPA解析により、8名（8/92, 8.7%）の欠失または重複変異を同定した。従って、片側アレルからのみ変異の同定された症例においては、13.7%（8/58）の割合で欠失または重複変異が同定されることが示唆された。従って、全43エクソンの

解析後に、片側アレルからのみの変異の検出に留まる場合において、積極的に MLPA 解析を行う必要性が示唆された。また、arRP 患者 440 名おける欠失または重複変異の頻度についても今後の検討課題となった。

また、本解析において、最終的に片側アレルからのみの変異の検出に留まった 50 名については、他の既に報告されているスプライシングバリエーション領域にも変異は認められず、今後は *EYS* 遺伝子の 5' -UTR、3' -UTR、および今回の解析対象以外のイントロン領域における変異候補の同定を進めていく必要がある。

2. *EYS*-JM3 (ミスセンス変異、p. G843E) の病原性変異としての信頼性

EYS 遺伝子変異の主要な 3 つの創始者変異の 1 つである *EYS*-JM3 を有する *EYS*-RP 患者は、*EYS*-RP 患者 92 名のうち 32 名 (32/92, 34.7%) を占め、そのうち 5 名はホモ接合変異体であった。このように *EYS*-JM3 は、*EYS*-RP の約 3 割を占める主要な変異である一方で、他の短縮型変異である *EYS*-JM1、*EYS*-JM2 とは異なるミスセンス変異 (p. G843E) であるため、この変異の病原性については慎重に判断をする必要がある。また、*EYS*-JM1、*EYS*-JM2 では、健常群 200 名においてこれら変異の検出を認めないものの、*EYS*-JM3 においては 5 名の保因者を認めた。従って、これら主要な創始者変異の中でも、最も頻度が高いことが想定され、疾患の有病率を想定する上でも鍵になるものと考えられる。

EYS-JM3 (ミスセンス変異、p. G843E) の病原性については、①蛋白質ドメインにおける変異アミノ酸部位の保存性、②生物種間での変異アミノ酸部位の保存性、③予測ソフトウェアツールを用いて解析した変異アミノ酸部位の病原性の可能性といった *EYS* 蛋白質における構造特性において、いずれも強く病原性を示唆する結果となった。また、*EYS*-JM3 を有する 9 家系の分離解析においても、罹患者と非罹患者における表現型と遺伝型の関係は矛盾なく一致することが確認された。これ

らの結果は、いずれもミスセンス変異 (p. G843E) の病原性を強く支持するものであった。今後、変性視細胞モデル (分担研究 世古 参照) およびモデル動物におけるこれら変異蛋白質の生化学的な活性評価を行うことが求められる。

3. *EYS* 遺伝子変異の保因者に関する遺伝疫学

EYS 遺伝子において、日本人に特異な 3 つの創始者変異 (*EYS*-JM1、*EYS*-JM2、*EYS*-JM3) の同定は、海外における RP の遺伝疫学とはその内容が大きく異なることを示唆している。過去の海外報告において RP 原因遺伝子における創始者変異の報告はあるものの、その頻度と規模は日本人と比較すると小さい。一方、我々の *EYS* 遺伝子における解析結果から、日本人では RP 患者 440 名のうち 132 名 (30.0%) と約 3 割の出現率となり、明らかに頻度の高い結果であった。

これら遺伝学的背景には、常染色体劣性の遺伝疾患における保因者の存在が大きく関与していることが推測された。特に 3 つの創始者変異それぞれの保因者の頻度の推定が、疾患の頻度を考える上で重要となる。我々の健常者 200 名における解析結果から、*EYS*-JM1 および *EYS*-JM2 変異の保因者は認められなかった。しかしながら、*EYS*-JM3 変異のみ 5 名から検出され、健常者の 2.5% の割合で保因者が同定された。

そこで、最近公開された日本人健常者における遺伝子データベースである HGV の各遺伝型の観測人数を合わせた母数 1334 名 (200+1134) を用いて、これら観測値にもとづき保因者率の推定をハーディ・ワインベルグ平衡の仮定 (方法参照) にもとづいて検討を行った結果、健常者 (p) の遺伝子型頻度は 0.98、またホモ接合 (q) の遺伝子型頻度は 0.02 と計算された。すなわち、健常者の 25~26 人に 1 人、約 4% の保因者率と推定された。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、 $q^2=0.0004=1/2500$ 、すなわち *EYS*-RP は 2500 人あたりに 1 人の発症となることが推定された。RP の疫学においては、海外の調査にもとづいて一般に 4000 人に 1 人の発症と推定されており、

1/2500 は一般的な推計を上回る結果となった。

この推計値の信頼性については、日本人における疫学調査の裏付けが必要と考えられるが、一方で、EYS-JM3 (p. G843E) のホモ接合個体における浸透率 (penetrance)、表現度 (expressivity)、発症年齢についても詳細に解析を行う必要がある。arRP 患者 440 名において同定されたホモ接合変異体は 5 名であったが、これら個体の臨床データを上記の視点で今後詳細に検討する必要がある。

4. *EYS* 遺伝子における遺伝子型-表現型関連の解析

遺伝子型-表現型による病態の理解は、臨床で遭遇する個体間における病気の進行の差異を理解する上での一助になることが期待される。また、遺伝子診断後の遺伝子カウンセリングにおいても必須の情報となる。*EYS* 遺伝子変異が同定された 23 名 (平均年齢 52.0 歳、経過観察期間平均 7.3 年) について夜盲の自覚年齢、診断時年齢、視力、視野などの臨床所見に基づいた解析を行った。*EYS* 遺伝子変異をもつ患者臨床像は、夜盲の自覚が 20 歳代に最も多く、診断時年齢は平均 39.0 歳と中年期に進行を認める典型的な遅発型 RP をもつことが示唆された (岩波ら、2013 年、臨床眼科)。遺伝子型-表現型における解析では、短縮型変異をホモまたは複合ヘテロ接合で 2 つ有する個体群 (n=15) と、短縮型変異を 1 つ有し他方にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異を複合ヘテロ接合でもつ個体群 (n=14) の比較において、前者で重症化する傾向が観察された。また、まだ解析数は少ないが、ミスセンス変異をホモまたは複合ヘテロ接合でもつ個体群についても臨床データを蓄積し、詳細な遺伝子型-表現型の解析を行う予定である。

F. 結論

1. *EYS* 遺伝子変異を有する患者の出現率は 32.3% (n=440) であった。*EYS* 遺伝子変異による RP 診断に至ったのは全体の 20.9% (n=440) であった。*EYS*-RP 患者における 3 つの創始者変異を有

する割合は 94.6% であった。

2. *EYS*-JM1 (エクソン 26)、*EYS*-JM2 (エクソン 43)、*EYS*-JM3 (エクソン 16)、および p. G2186E、p. I2188T (エクソン 32) の変異を用いての一次スクリーニングを検討した場合、このスクリーニング法の感度は 31.1% (137/440)、特異度は 97.5% (195/200) となった。この簡易的な一次スクリーニング方法は 96.4% の陽性率を持つと同時に 3.6% の偽陰性を持つことが示唆された。

3. *EYS*-JM3 (ミスセンス変異、p. G843E) の病原性について検討を行った。①蛋白質ドメインにおける変異アミノ酸部位の保存性、②生物種間での変異アミノ酸部位の保存性、③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解析といった *EYS* 蛋白質における構造特性において、いずれも強く病原性を示唆する結果となった。また、*EYS*-JM3 を有する 9 家系の家系解析においても、罹患者と非罹患者における表現型と遺伝型の関係は矛盾なく一致することが確認され、これらの結果は、いずれもミスセンス変異 (p. G843E) の病原性を強く支持するものであった。

4. 日本人に特異な 3 つの創始者変異 (*EYS*-JM1、*EYS*-JM2、*EYS*-JM3) における各アレル頻度から推定される保因者率は 1/25 であった。また、*EYS*-RP の発症率は 1/2500 と推定された。今後これら数値の妥当性については、*EYS*-RP 患者の各遺伝型における臨床所見と遺伝疫学といった様々な角度から詳細な検証が必要と考えられた。

5. 遺伝子型-表現型における解析では、短縮型変異をホモまたは複合ヘテロ接合で 2 つ有する個体群 (n=15) と、短縮型変異を 1 つ有し他方にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異を複合ヘテロ接合でもつ個体群 (n=14) の比較において、前者で重症化する傾向が観察された。今後、さらに解析数を増やすことで、これら遺伝子型-表現型による病態の理解は、臨床で遭遇する個体間における病気の進行の差異を理解する上での一助になることが期待される。また、遺伝子診断後の遺伝子カウンセリングにおいても必須の情報となる。

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. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし。

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

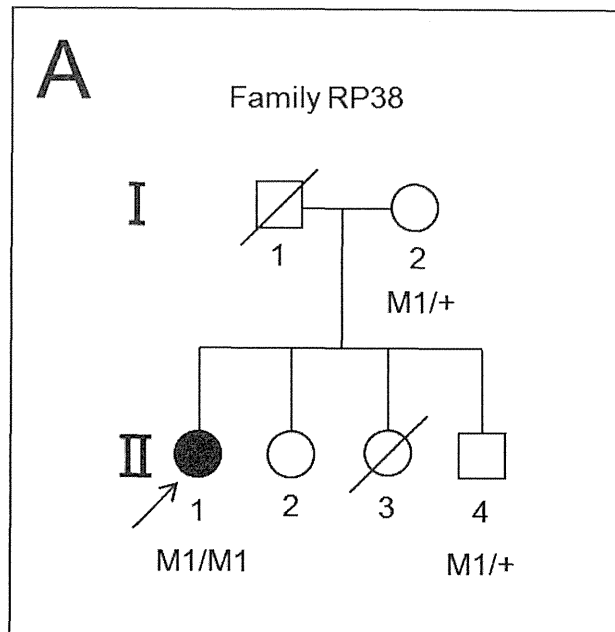
1) Iwanami, M., Ogino, K, Oishi, A., Yoshimura, N., Kato, S. Founder Mutations in the *EYS* Gene in Japanese Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. The 34th World Ophthalmology Congress 2014. Tokyo, Japan, 2014-4-2/4-6.

H. 知的財産権の出願・登録状況

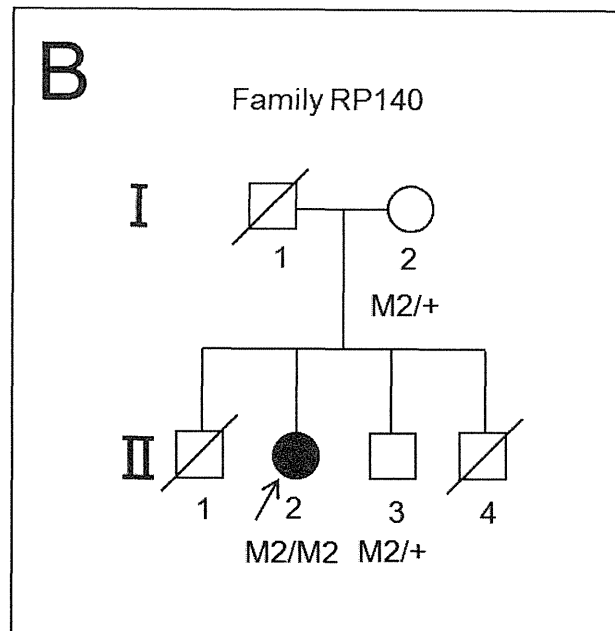
なし。

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

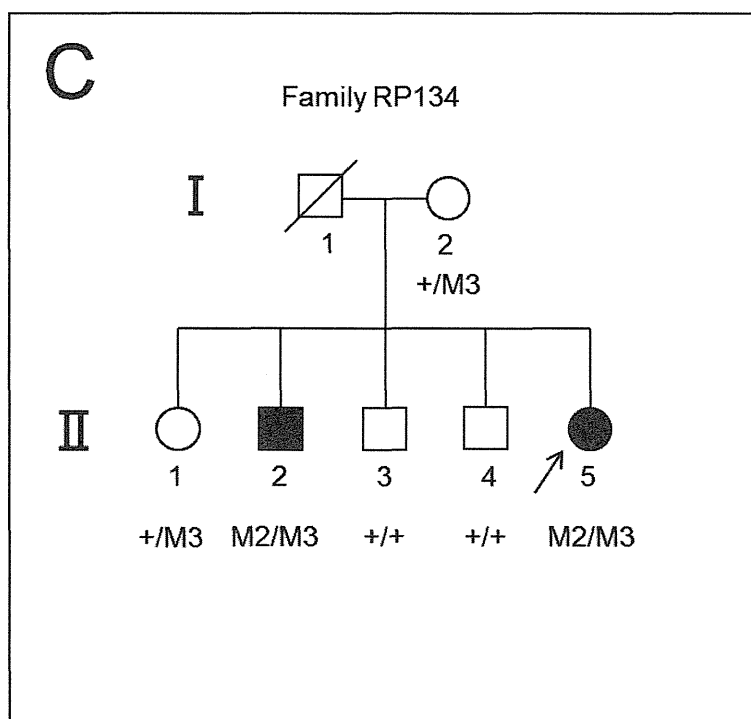
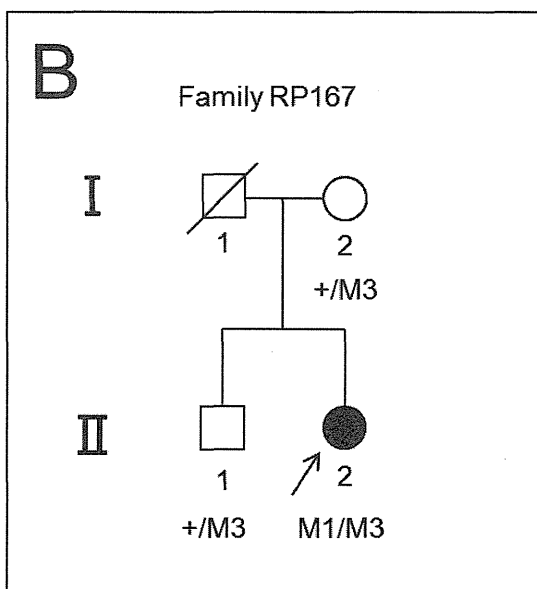
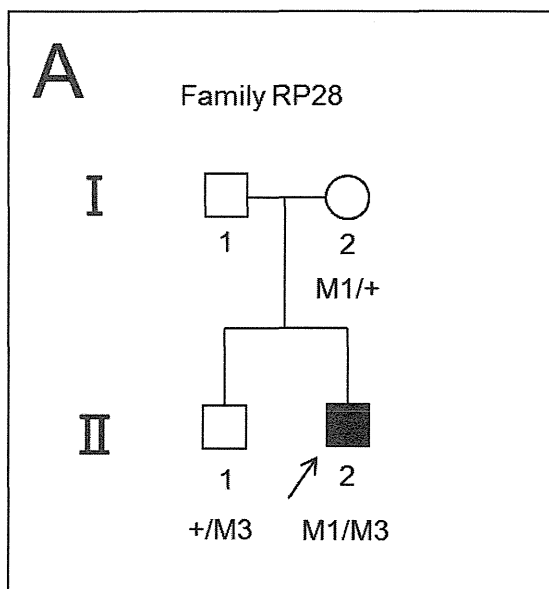


M1; p.S16653Kfs*2



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

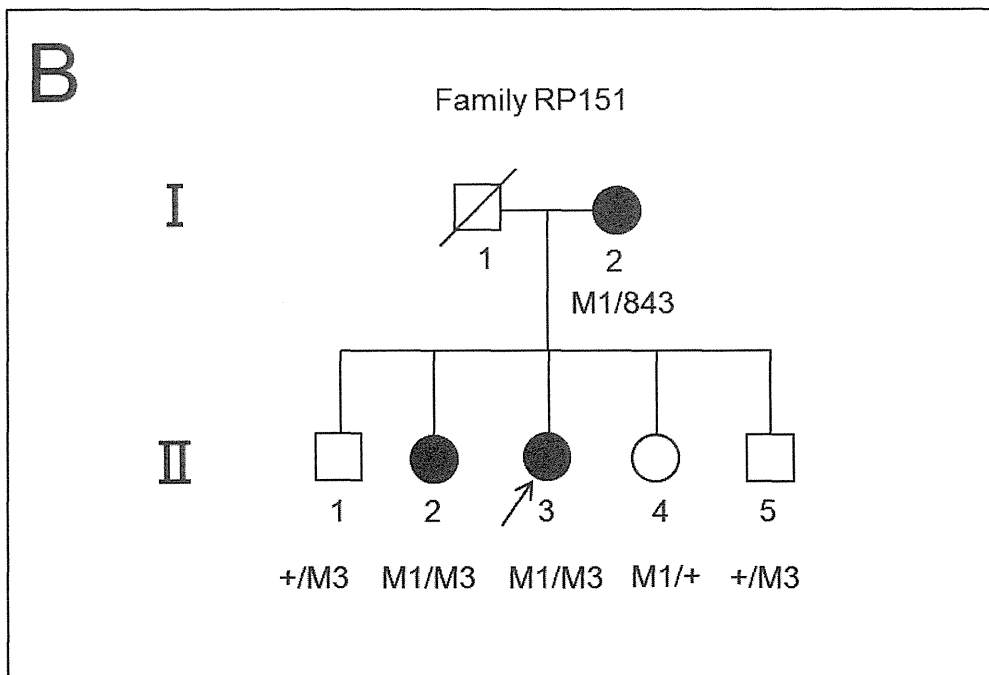
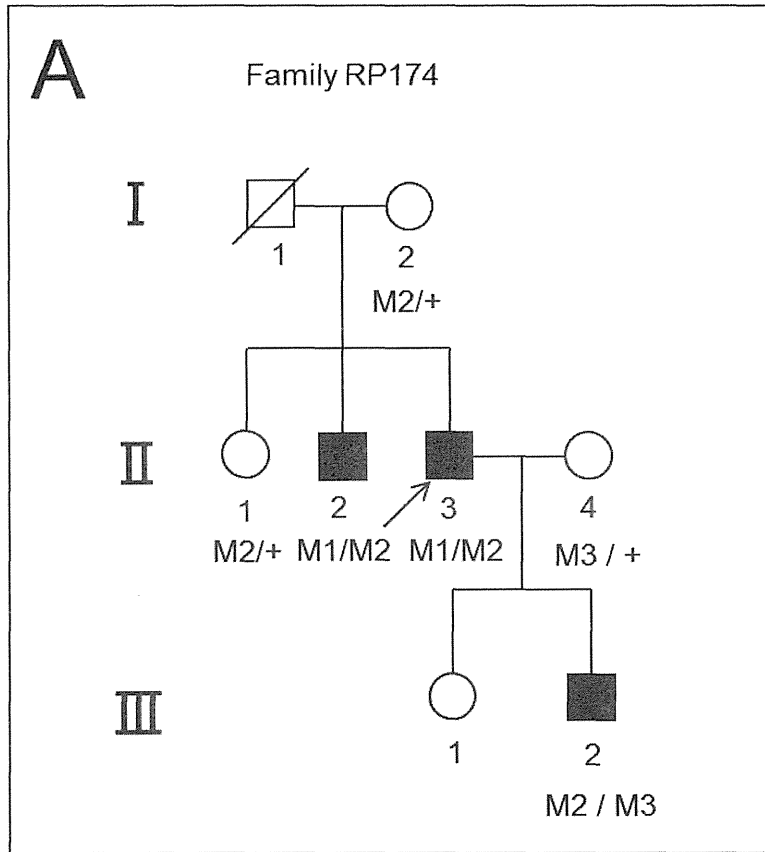
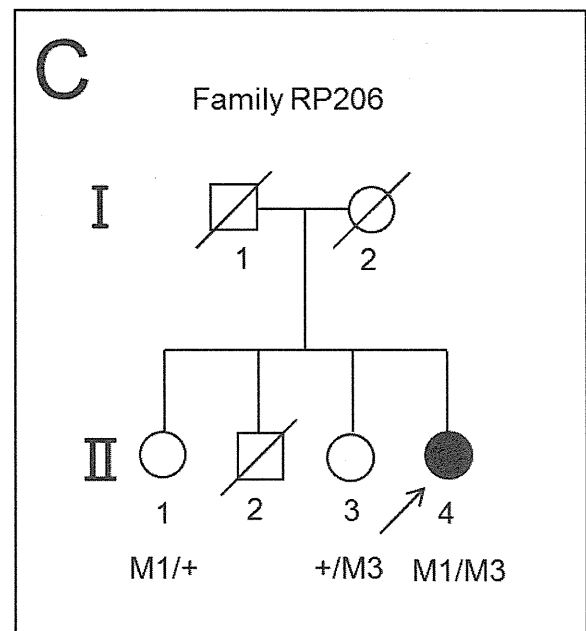
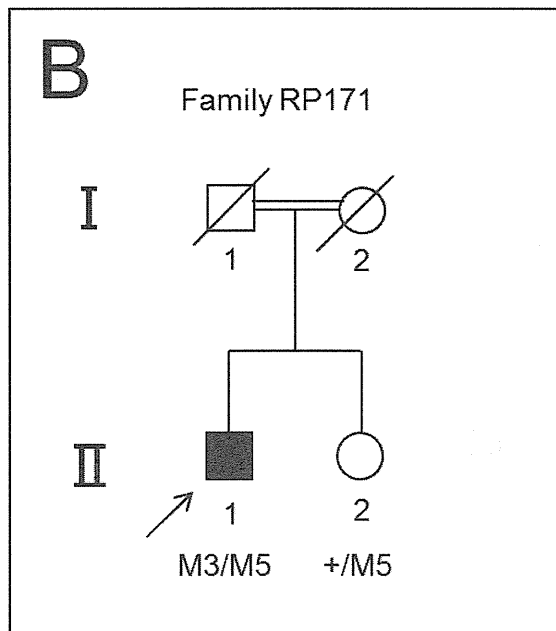
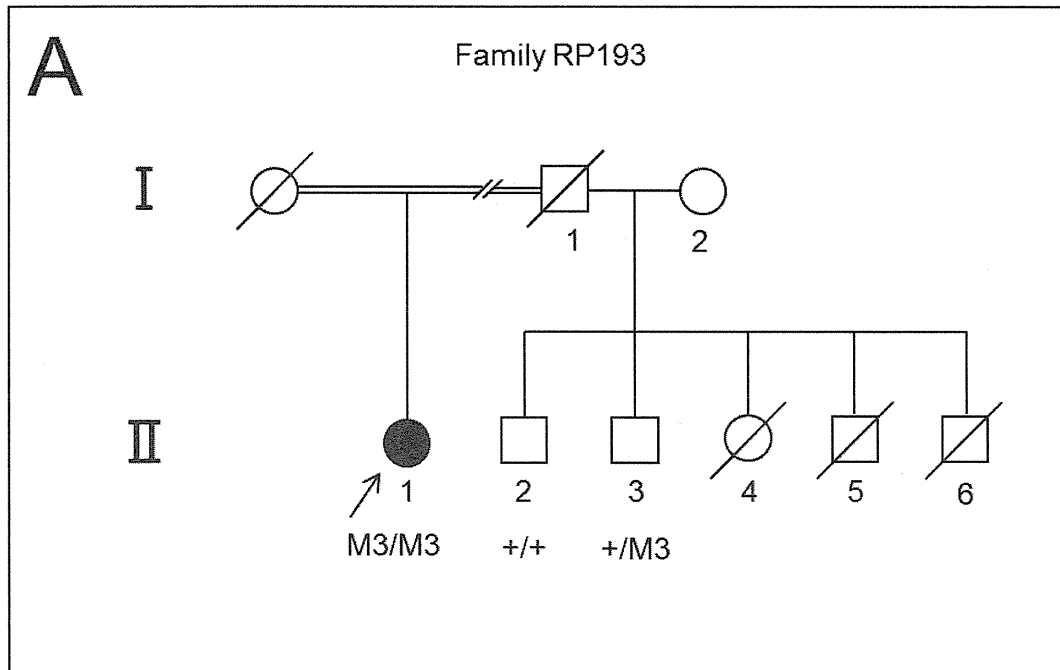


図4 M3 変異に関する家系解析③

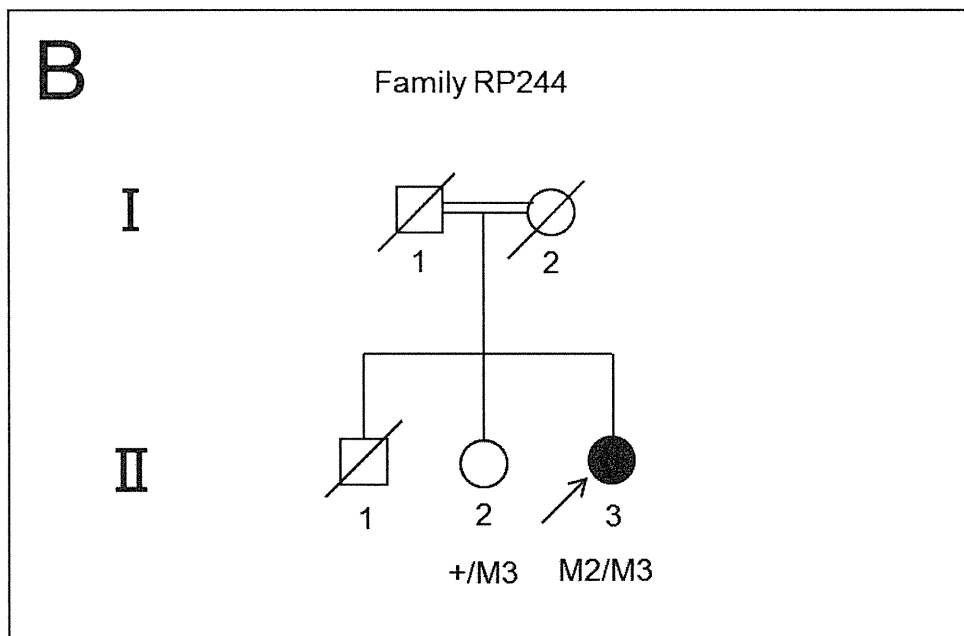
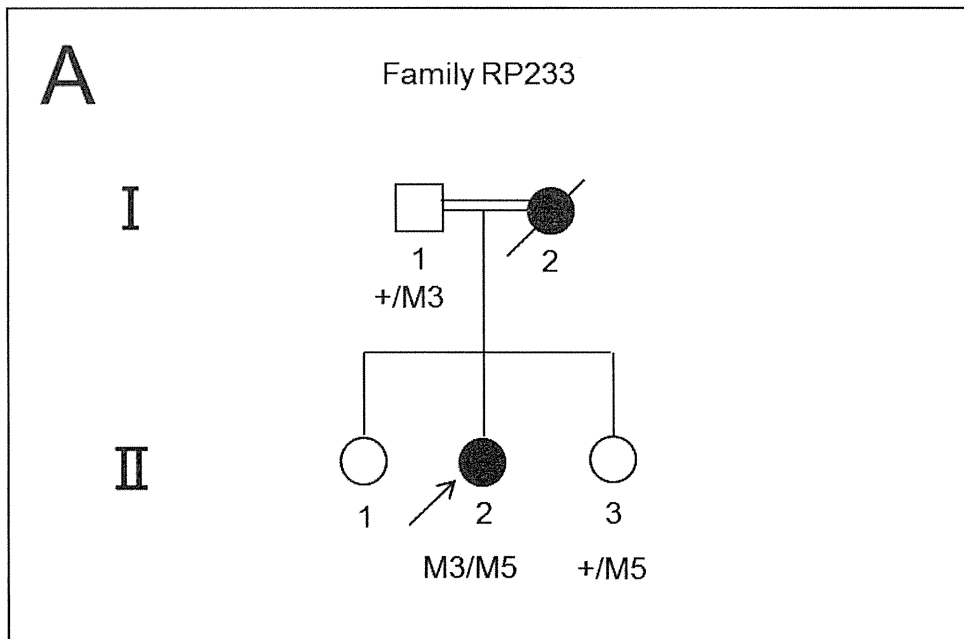


M1; p.S16653Kfs*2

M3; p.G843E

M5; p.I2188T

図5 M3 変異に関する家系解析④

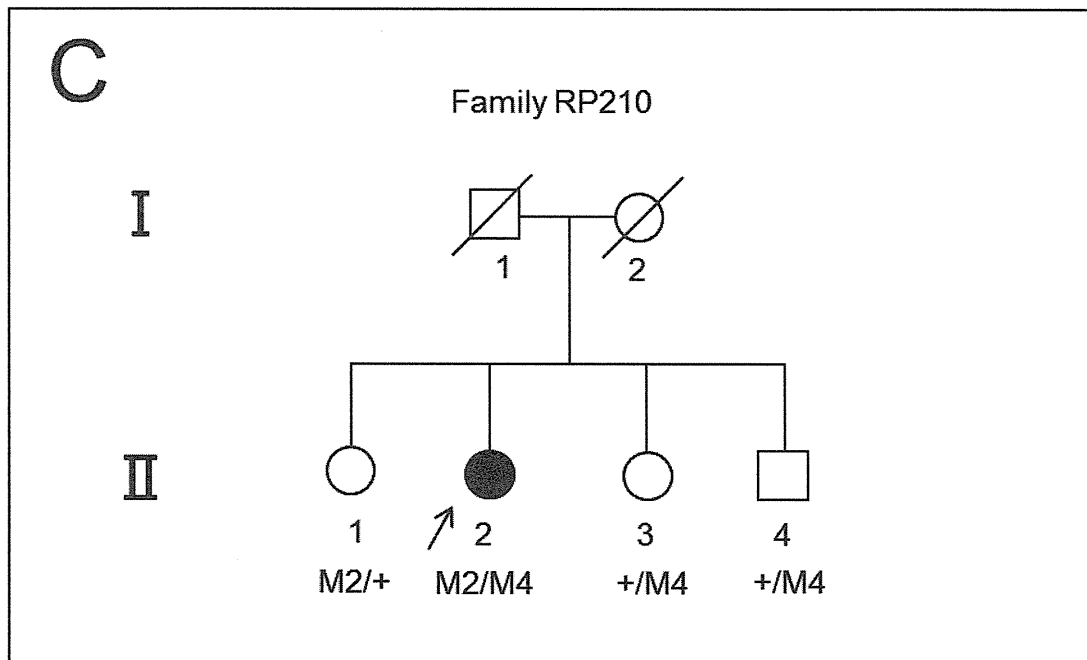
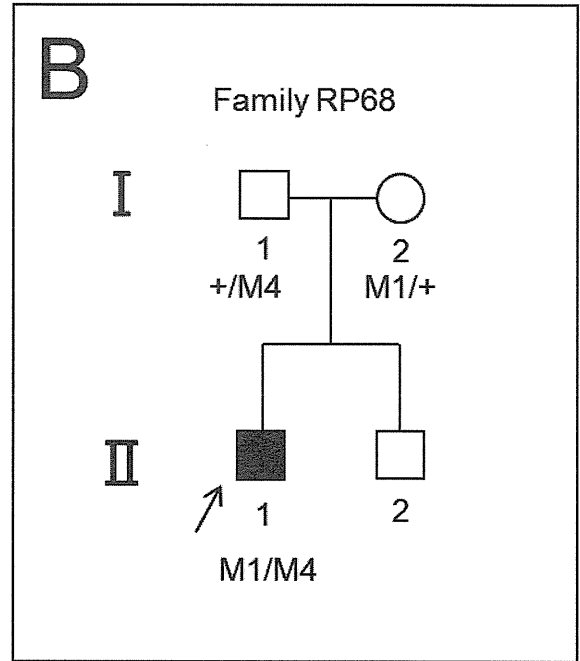
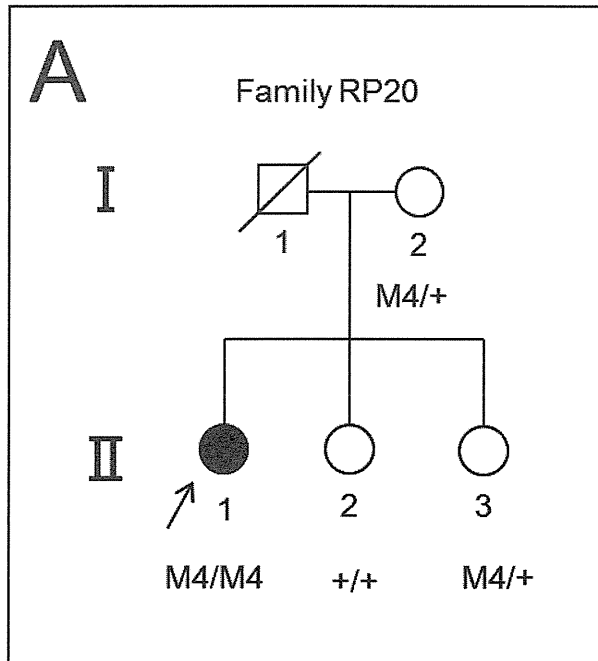


M2; p.Y2935*

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 その1

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、市販のヒト皮膚繊維芽細胞から直接リ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、ヒト皮膚繊維芽細胞から、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名の網膜色素変性症患者の皮膚採取を実施した。直接リプログラミングによって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、発現遺伝子の解析を行った。その結果、これらの細胞においても *EYS* 遺伝子や光トランスダクションに関わる遺伝子の発現が認められた。したがって、患者由来の視細胞様細胞の発現解析による新しい遺伝子診断法の開発ができる可能性が示唆された。

A. 研究目的

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。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た、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ていることが必須となる。

EYS 遺伝子は2008年に常染色体劣性RP (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。当研究所において、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)。

EYS 遺伝子を含めて、網膜色素変性症の原因候補遺伝子の多くは網膜に特異的に発現している。そのため、網膜に発現する遺伝子(mRNA)を解析できれば、全ゲノムを解析するよりも効率がよい。世古らは、ヒト体細胞(虹彩細胞)から直接リプログラミングによってヒト網膜細胞に分化誘導することに成功している(Seko et al., PLoS ONE, 2012)。この分化誘導の方法を応用し、患者から採取可能な皮膚や血液由来の細胞から網膜細胞へと分化誘導できれば、*EYS* 遺伝子を初めとした網膜のみに発現するRPの原因候補遺伝子のmRNAを解析することが可能となる。これまでの遺伝子解析の中心であったゲノム解析ではなく、より効率が低いと考えられているcDNAをもとにした解析が可能となる。

本研究では、患者由来の分化網膜を用い、日本人の arRP の主要原因遺伝子であることが明らかとなった *EYS* 遺伝子について、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が最終目的である。

B. 研究方法

すでに論文化された、分担研究者の世古らが開発したヒト虹彩細胞を視細胞に分化誘導する方法(Seko et al., PLoS ONE, 2012)を応用し、より一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚線維芽細胞を視細胞に分化誘導する方法を、市販されたヒト皮膚線維芽細胞を用いて検討した。

具体的には、ヒト皮膚線維芽細胞を培養後、*CRX*, *NEUROD*, *RAX*, *OTX2* 遺伝子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、RT-PCR、網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、それぞれの細胞を用いて、暗黒下にてパッチクランプを行い、光応答を調べた。

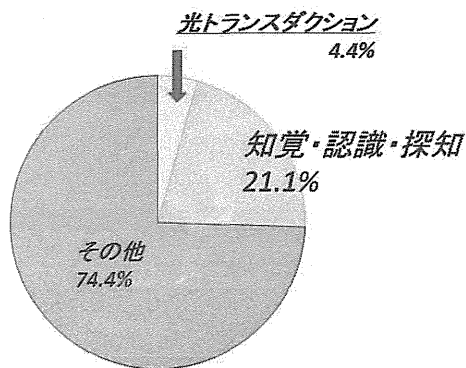
変性視細胞モデルの作製については、平成24年度に倫理申請が受理され、平成24年度には3名の正常ボランティアの皮膚採取を、平成25年度には3名のRP患者の皮膚採取を実施し、それぞれの皮膚線維芽細胞の単離・培養・凍結を行った。それぞれの細胞を培養し、分化誘導を行い、上記転写因子の遺伝子導入して分化誘導を行った後、誘導細胞からmRNAを抽出、RT-PCRを行った。なお、RP患者のゲノム解析ならびRP患者の非眼球組織から網膜細胞を分化誘導する研究計画(「患者由来分化誘導細胞を用いた網膜変性疾患の新規診断法の開発」)については、国立障害者リハビリテーションセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会においてすでに審査を受け承認を得た。

また、市販ヒト網膜mRNAから我々の独自技術であるベクターキャッピング法(kato et al., DNA Res., 2005)を用いて完全長 cDNAライブラリーを作製した。

C. 研究結果

①市販のヒト皮膚線維芽細胞を用いて、直接リプログラミングによって網膜細胞へ分化誘導した結果、視細胞特異的な光トランスダクション関連遺伝子の発現誘導がみられ(図1)、作製された誘導視細胞様細胞において、光応答(過分極反応)がみられた(図2)。

網羅的遺伝子発現解析
(GO解析)



各種網膜視細胞特異的遺伝子を発現

図1：網羅的遺伝子発現解析の結果

CRX, NEUROD, RAX, OTX2 遺伝子を導入し、作製した誘導網膜視細胞様細胞において発現誘導された遺伝子を GO 解析した。

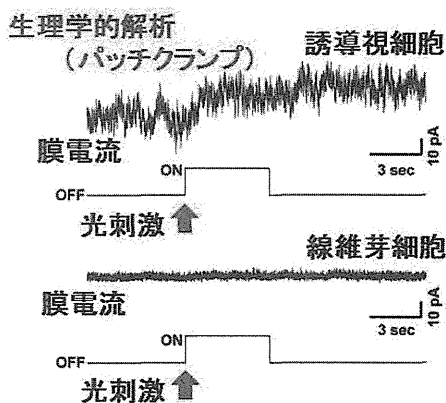


図2：パッチクランプによる光応答

CRX, NEUROD, RAX, OTX2 遺伝子を市販されているヒト皮膚線維芽細胞に導入し作製した誘導網膜視細胞様細胞において、暗黒化でパッチクランプを行った。光刺激による外向き電流（過分極）が観察された。

②正常ボランティア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

子の発現増加が見られた (図3)。

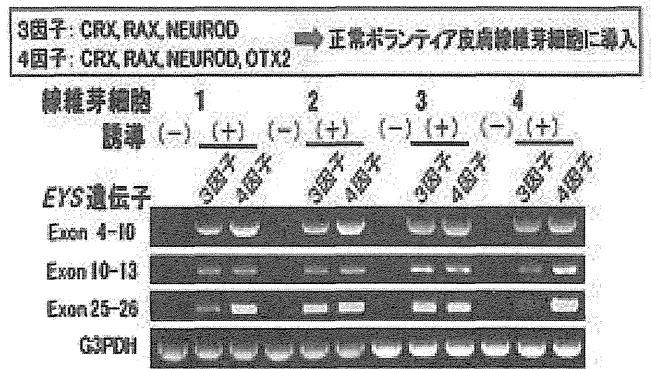


図3：正常ボランティアの皮膚線維芽細胞由来網膜視細胞様細胞における EYS 遺伝子の発現

3名のボランティアから採取した4種類の線維芽細胞の結果。線維芽細胞1は、ボランティア1の肘から採取。線維芽細胞2は、ボランティア1の頭部から採取。線維芽細胞3 & 4は、ボランティア2 & 3の肘から採取。4因子の導入によって、安定的に EYS 遺伝子の発現誘導がみられた。

③arRP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である EYS 遺伝子の発現増加が見られた。

④網膜色素変性症患者由来の皮膚線維芽細胞から誘導された視細胞様細胞に発現された EYS 遺伝子 (cDNA) の解析の結果、ゲノム解析で得られた短縮型変異 (EYS-JM1) と一致した変異が見られた。その他の変異については現在解析中である。

⑤市販ヒト網膜mRNAからベクターキャッピング法を用いて完全長 cDNAライブラリーを作製できた。96クローンの5' 端塩基配列を解析した結果、完全長含有率は67%であった。

D. 考察

なし

一般的なヒト体細胞であるヒト皮膚線維芽細胞に複数の転写因子遺伝子を導入すると視細胞特異的な *EYS* 遺伝子の発現が早期に誘導されること、ゲノムに見られる短縮型変異が誘導視細胞における cDNA にも同様に見られることは、我々が初めて見つけた新知見であり、低コストの迅速診断法の開発に貢献できる可能性がある。今後は、cDNA の解析に加えて蛋白質レベルでの解析まで進める予定である。

E. 結論

変性視細胞解析が、網膜色素変性症の迅速診断法の開発、病態の解明に有用であることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2. 学会発表

1) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)