

201442087A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業
(委託業務題目)

遺伝性網脈絡膜疾患の生体試料の収集・管理・提供と病態解明に関する研究

(H26- 委託(難)- 一般-087)

平成26年 委託業務成果報告書

業務主任者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター

臨床研究センター (感覚器センター)

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業
(委託業務題目)

遺伝性網脈絡膜疾患の生体試料の収集・管理・提供と病態解明に関する研究

(H26- 委託(難)- 一般-087)

平成26年 委託業務成果報告書

業務主任者 岩田 岳

独立行政法人国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター (感覚器センター)

平成27(2015)年3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

遺伝性網脈絡膜疾患の生体試料の収集・管理・提供と病態解明に関する研究
岩田 岳 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)

II. 委託業務成果報告（業務項目分担研究報告）

寺崎浩子 名古屋大学大学院医学研究科感覚器障害制御学
上野真治

近藤峰生 三重大学大学院医学系研究科臨床医学系講座眼科学

角田和繁 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター(感覚器センター)・

國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室

林 孝彰 東京慈恵会医科大学眼科学教室

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）
遺伝性網脈絡膜疾患の生体試料の収集と病態解明に関する研究

業務主任者 岩田 岳 国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター 部長

研究要旨：ヒトは情報の約8割を視覚情報に頼っており、これが障害されると通常の生活に著しい影響を及ぼす。特に視細胞が局在する網膜への障害は重篤な視機能低下をもたらす。視細胞が障害される遺伝性網脈絡膜疾患の多くは希少難治性眼疾患であり、進行を遅延あるいは治療することは困難である。遺伝性網脈絡膜疾患には網膜色素変性、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、先天夜盲症などが含まれ、正確な診断には高度な電気生理学的な手法を必要とする。遺伝学的には優性、劣性（ホモ、コンパンドヘテロ）、孤発、ダイジェニックなど様々な形式の遺伝子変異が報告されている。すでに欧米での研究によって90以上の原因遺伝子が明らかにされているが日本での解析はほとんど進んでいない。また、それぞれの原因遺伝子についても発症機序は十分に解明されておらず、治療には結びついていない。

本研究はこのような状況下において、国内に点在する推定5万人ほどの患者を電気生理学的な診断を得意とする全国の眼科施設と連携し、共同で血液・唾液検体と収集し、DNA、iPS細胞などの生体試料を国立病院機構で収集し、これを全国の研究施設で効率的に利用できる生体試料バンクの設立を目的とする。遺伝性網脈絡膜疾患についてこのような試みは初めてであり、欧米に比べて20年ほど遅れている国内のこの分野での活性化をめざす。

我々は平成23年度より「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）」によって遺伝性網脈絡膜疾患のオンライン症例登録システムを構築し、症例情報の収集と900の血液検体を収集した（添付資料参照、登録リスト 2014年2月26日現在）。これにすでに収集した緑内障、加齢黄斑変性、白内障などの眼疾患についての症例情報とDNA検体を合わせると、当施設には合計2,500検体が存在する。この日本最大規模の検体を利用して、加齢黄斑変性の全ゲノム相関解析(Goto, Iwata et al., JOBDI 2009)や日本では初めての網羅的遺伝子解析によるオカルト黄斑ジストロフィーの原因遺伝子が発見された(Akahori, Iwata et al., Am J Hum Genet 2010)。さらに平成23年度からは遺伝性網脈絡膜疾患のエクソーム解析を実施し、約7割の患者で新規遺伝子変異によって発症していることが明らかとなった。

本研究は眼疾患の中でも最も重篤な希少難治性眼疾患である遺伝性網脈絡膜疾患を対象に、精度の高い症例情報と遺伝子情報を整理し、幅広い臨床研究に役立てるための生体試料バンクを設立することを目的とする。診断にあたっては日本臨床視覚電気生理学会の全面的な支援（学会理事全員が分担研究者）を受け、遺伝子拠点研究班との連携による全エクソーム解析と国立遺伝学研究所との連携による遺伝子解析を行う体制となっている。我々はすでに緑内障や加齢黄斑変性の患者から安定的にiPS細胞を樹立することができる(Minogishi, Iwata et al., Hum Mol Genet 2013, Iejima, Iwata et al., J Biol Chem 2014)。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

岩田岳・東京医療センター・部長
池尾一穂・国立遺伝学研究所・准教授
三宅養三・愛知医科大学・理事長
堀口正之・藤田保健衛生大学・教授
山本修一・千葉大学・教授
寺崎浩子・名古屋大学・教授
久瀬真奈美・三重中央医療センター・医長
溝田淳・帝京大学・教授
直井信久・宮崎大学・教授
町田繁樹・岩手医科大学・准教授
島田佳明・藤田保健衛生大学・准教授
中村誠・神戸大学・教授
不二門尚・大阪大学・教授
堀田善裕・浜松医科大学・教授
近藤峰生・三重大学・教授
角田和繁・東京医療センター・部長
國吉一樹・近畿大学、
篠田啓・帝京大学・教授
林孝彰・東京慈恵会医科大学・講師

A. 研究目的

日本ではPCRとサンガーシーケンスによる既知遺伝子の探索が行われてきたが、十分な成果をあげることができていない。その理由は我々が平成23年度より実施してきた遺伝性網脈絡膜疾患のエクソーム解析（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野））によって明らかにされた。患者250家系についてエクソーム解析を実施したところ、日本人患者の多くは新規遺伝子変異によって発症しており、多様な原因遺伝子の関与が明らかになった。同疾患であるにもかかわらず、同一遺伝子を原因とする家系が2つ以上検出されることは稀であり、疾患の原因について全体像を得るには検体数の大幅な増加を必要とする。本研究は眼疾患の中でも最も重篤な希少難治性眼疾患である遺伝性網脈絡膜疾患（網膜色素変性、レーベル先天黒内障、錐体・杆体ジストロフィー、先天性夜盲症（完全型・不全型）、オカルト黄斑ジストロフィー、桿体一色覚、ベスト病、スターガルト病、コロイデレミア、クリスタリ

ン網膜症、レーベル視神経症、優性視神経萎縮症、小口病、白点状眼底、若年性網膜分離症、レチノスキージス、その他黄斑ジストロフィー)を対象に、精度の高い症例情報と遺伝子情報を整理し、幅広い臨床研究に役立てるための生体試料バンクを設立することを目的とする。

日本臨床視覚電気生理学会の全面的な支援(理事全員が分担研究者)を受け、オールジャパン体制で検体収集を行い、遺伝子拠点班、遺伝子解析班と連携して症例情報と遺伝子情報が収集できる体制にある。本研究報告書を作成する段階で、全国の30の眼科教室が本研究班に参加している。これまでに国内で最も患者数の多い緑内障、加齢黄斑変性、ポリープ状脈絡膜血管症、白内障、網膜色素変性などの眼疾患について日本最大規模の約2,500検体を多施設から収集した実績があり、オンライン症例情報収集システム、匿名化システム、倫理書類、情報の暗号化や保管体制が整っている。

我々が発見した遺伝子変異の一部については変異体を発現する遺伝子改変動物を作製する。ゼブラフィッシュ(政井一郎(教授)、沖縄科学技術研究基盤機構(OIST))、マウス(岩田岳(部長)、東京医療センター)、カニクイザル(下澤律浩(主任研究員)、医業基盤研究所霊長類医科学研究センター)での作製がすでに進行しており、病理学的な解析だけでなく、薬効試験に利用できる疾患モデル動物の作製が期待される。

本研究は重篤な視覚障害をもたらす遺伝性網脈絡膜疾患を対象に患者の生体試料を収集・管理・提供を目的に、遺伝子解析、モデル動物の作製、データベース化によって症例情報・遺伝情報が付加された日本で初めての生体試料バンクの整備をめざす。

B. 研究方法

1) 診断と血液検体の収集(三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林、上野)

遺伝性網脈絡膜疾患の臨床診断にあたっては電気生理学的検査を含む視機能検査を包括的に行った。本研究は参加施設の倫理委員会において承認済みであり、患者の書面による同意によって採血された。症例情報はすでに運営されている感覚器ネットワークを用いて暗号化された状態で東京医療センターにオンライン登録され、管理者のみがアクセスできる部屋と症例登録サーバーに暗号化された状態で保存された。

2) エクソーム解析(岩田)

基本的には劣性家系において患者、患者の両親の3検体あるいは兄弟を加えた4検体、優性家系においては3世代8検体の解析を基本

として、約250検体について解析を行った。全エクソムのキャプチャー(Agilent, SureSelect Ver. 5)とエクソームシーケンシング(Illumina, HiSeq2500)を行った。

3) エクソーム配列のマッピングおよび配列の比較(池尾、岩田)

エクソーム塩基配列のレファレンス配列へのマッピングとアミノ酸配列変異の抽出、健常者での検出頻度は国立遺伝学研究所において行った。健常者における検出頻度は1,000人ゲノムプロジェクトのデータベースに加え、日本人1,250人エクソームプロジェクトのデータベースを用いて頻度が低いものを優先的に抽出した。アミノ酸配列への影響はPolyPhen2やPROVEAN2を参考にして絞り込んだ。特に低い頻度で検出されるアミノ酸置換、タンパク質への影響の大きいアミノ酸配列のトランケーション、インサクションに着目した。候補遺伝子については眼疾患を発症する290遺伝子を優先的に検索し、既知遺伝子変異による発症か、未知遺伝子による発症か判断した。

4) タンパク質の構造解析(岩田)

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、一部の原因遺伝子についてはタンパク質の局在、分子モデリングによるタンパク質構造と変異による構造への影響を調べ、病態との関係を検討した。結晶構造が明らかなタンパク質の場合は遺伝子変異によるタンパク質の構造への影響をシュミレーションして判断材料とした。

5) 視細胞株および患者iPS細胞を用いた原因遺伝子の機能解析(岩田)

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、マウス視細胞株(661W)、マウス神経細胞株(RGC5)および患者iPS細胞(リンパ球由来)を作製し(Jin, Iwata, Takahashi et al, PLoS One 2011)、変異体タンパク質の過剰発現、ノックダウンによる細胞機能への影響について解析した。

6) 発症機序の解明とモデル動物の作製と解析(岩田)

遺伝子変異による発症メカニズムを研究するために、原因遺伝子のノックインマウスとノックアウトカニクイザルを作製中である。モデル動物は病理学的な研究に加えて、視機能障害を改善するための治療法開発に利用される。

7) モデル動物を用いた新薬の開発(三宅、

角田、近藤、篠田、國吉、林、岩田)
発症機序の研究結果によって得られた分子経路に基づいて、その経路を抑制あるいは促進する生体分子をモデル動物に投与することによって発症の予防・治療を試みる。国内民間会社との共同研究により新薬開発を支援する。

8) 日本人網膜色素変性の遺伝子変異と臨床情報のデータベース化、診断キットの開発(岩田、三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林、上野)

本研究によって得られる新規遺伝子変異を将来の診断基準に役立てる目的で、個々の患者の遺伝子変異、眼底像、光干渉断層計像、網膜電図、視野検査等の情報をデータベース化して公開する。この公開は京都大学医学研究科付属ゲノム医学センターの松田文彦教授が主任研究者の遺伝性希少難病疾患データベースプロジェクトに分担研究者として参加しており、平成25年度には我々が検出した遺伝子変異が登録される予定である。また診療の現場でも簡単に利用できる診断キットを民間会社と協力して作製する。

9) 民間企業との共同研究

本研究班は国内における疾患別あるいは遺伝子別の情報が集約しており、製薬企業や遺伝子治療を専門とする企業からターゲットになる患者数や分布について情報提供が可能になってきた。積極的に本研究班の活動を宣伝し、民間企業との連携を促進する。

10) 国際協力

本研究班は国内のグループが1つにまとまる国際的にも珍しいケースである。我々の研究体制を見本として米国、インド、中国、オーストラリー、ASEAN諸国との連携によって遺伝性眼疾患のアジア共同体(コンソーシアム)を構築中である(Asian Eye Genetic Consortium, <http://www.aegc.asia>)。コンソーシアムの会長として、今後3年間の期間にアジア圏の協力体制と遺伝子型・病態のデータベースの構築に向けてNational Eye Institute, National Institutes of HealthとeyeGENEデータベースを作成中である。

C. 研究結果

1) 診断と血液検体の収集(三宅、角田、近藤、篠田、國吉、林)

解析対象とする遺伝性網膜疾患について、約300検体を収集した。収集された疾患は主にレーバー先天性黒内障、網膜色素変性、黄

斑ジストロフィー、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィーである。これらの疾患については日本人についての情報が乏しく、遺伝情報はきわめて重要である。これらの患者情報は電気生理学的検査を含む視機能検査と網膜断層解析によって包括的に行われた。

2) エクソーム解析(池尾、岩田)

平成26年度は全250検体のエクソーム解析を行った。エクソーム抽出キットにはAgilent社のSureSelect ver.5、次世代シーケンサー(Illumina社のHiSeq2500)を用いて平均100リード数のシーケンセスを行った。このファイルは国立遺伝研へと送られ、配列の決定、配列のレファレンス配列へのマッピング、1,000ゲノム配列との比較、アミノ酸配列の変異、タンパク質への影響、眼での発現、など複数のフィルターを経て候補遺伝子変異が抽出した。予測される複数の遺伝形式に基づいて候補遺伝子を絞り込み、原因遺伝子変異を決定した。

3) タンパク質構造解析

原因遺伝子がコードするタンパク質と変異体について、コンピュータによるシミュレーションを行い、変異体の異常なタンパク質構造を一部の遺伝子変異によって明らかにし、論文発表を行った。

4) iPS細胞樹立とモデル動物の作製

若年で発症し、黄斑や網膜全体に重篤な症状が観察されたCNGA1遺伝子変異については家系内の患者および健常者のiPS細胞を樹立し、眼杯作製を行っている(Katagiri, Iwata et al., PLOS ONE 2014)。劣性遺伝形式の遺伝子変異で遺伝子がノックアウト状態になる変異についてはノックアウトカニクイザルを作製中である。受精卵から作製されたES細胞においてはゲノムDNAの切断が確認されている。

5) データベース登録と診断キットと新薬の開発

診断キットについては民間企業との研究開発が順調に進んでおり、大手検査会社での導入を交渉中である。今年中には営業に入れると期待される。我々が検出した遺伝子変異の多くはこのキットを用いて、誰でも検査ができるようになる。ただしこのキットでは大きなデリベーションやインサクションなどをともなう遺伝子変異については検出されない。

D. 考察

8施設から約250検体の症例情報とDNA約300検体が収集され、エクソーム解析を行った。既知遺伝子変異を検出することは稀であり、多くの家系は既知遺伝子における未知遺伝子変異による発症が観察された。また一部の家系については新規遺伝子の変異が発見され、これらについて優先的に網膜での発現やタンパク質構造への影響について解析を行っている。ノックアウトマウスがすでに存在する場合は積極的にこれを利用している

(論文投稿中)。新規遺伝子候補は現在25に増加しており、同じ遺伝子に変異がある2家系目の探索を優先的に行っている。

これまで遺伝性網脈絡膜疾患の遺伝子解析が行われてきたが、90遺伝子以上既知遺伝子が存在し、これを網羅的に解析することは困難であった。本研究では全エクソーム解析によって、黄斑ジストロフィー、レーバー先天性黒内障、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、先天性夜盲症、白点状網膜炎、脈絡膜ジストロフィー、輪状網膜変性、遺伝性ドルーゼン、卵黄様黄斑ジストロフィーについて研究予算が許す限り、エクソームシーケンスを行い、一家系でも多くの原因遺伝子を解明した。その結果、既知遺伝子変異は17%の家系で検出され、14%の家系において既知遺伝子内に新規遺伝子変異が発見された。残りは既知遺伝子のエクソン内には遺伝子変異は無いと考えられる。

新規原因遺伝子については平成27年度中鵜に2家系目を発見し、確かな情報としたい。また、これらの新規遺伝子については変異体の機能解析が進める予定である。

E. 結論

日本では網羅的な解析が十分に進んでいない遺伝性網脈絡膜疾患(黄斑ジストロフィー、レーバー先天性黒内障、網膜色についてエクソーム解析を行った。その結果、既知遺伝子変異の検出率は14%であった。日本人は多数の新規遺伝子によって発症していると考えられ、東洋人を対象とした遺伝子解析が必要と考えられる。本研究は次世代シーケンサーを用いた遺伝性網脈絡膜疾患の網羅的エクソーム解析によって希少難治性眼疾患の原因遺伝子を解明し、発症機序および治療法の開発を目的とする国内では初めての試みである。本研究班の情報収集能力によって民家企業との共同研究や遺伝子型-病態データベースの国際的な共同体制を構築中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Tsunoda K, Kusaka S, MD, Shimomura Y, Iwata T. Reduced rod electroretinograms in carrier parents of two Japanese siblings with autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with *PDE6B* gene mutations. *Documenta Ophthalmologica* 2015 in press

Kato Y, Tsunoda K, Fujinami K, Iwata T, Saga M, Oguchi Y. Association of retinal artery and other inner retinal structures with distribution of tapetal-like reflex in Oguchi's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Mar 5. pii: IOVS-14-16198.

Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Noda T, Yuasa S, Fukuda K, Oka C, Iwata T. High-Temperature Requirement A Serine Peptidase 1 Gene is Transcriptionally Regulated by Insertion/Deletion Nucleotides Located at the 3 Prime End of Age-Related Maculopathy Susceptibility 2 Gene in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *The Journal of Biological Chemistry* 2014 Epub ahead of print

Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, Tsuneoka H, Iwata T. RPE65 mutations in two Japanese families with Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genetics* 2014 Epub ahead of print

Katagiri S, Yoshitake K, Sergeev Y, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T. A homozygous PDE6C mutation (E591K) associated with congenital achromatopsia and macular atrophy. *Ophthalmic Genetics* 2014 in press

Katagiri S, Hayashi T, Akahori M, Itabashi T, Nishino J, Yoshitake K, Furuno M, Ikeo K, Okada T, Tsuneoka H and Iwata T. RHO mutations (p.W126L and p.A346P) in two Japanese families with autosomal dominant retinitis

pigmentosa. Journal of Ophthalmology 2014
Epub ahead of print

Kuniyoshi K, Ikeo K, Sakuramoto H, Furuno M, Yoshitake K, Hatsukawa Y, Nakao A, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Novel nonsense and splice site mutations in CRB1 gene in two Japanese patients with early-onset retinal dystrophy Documenta Ophthalmologica. Documenta Ophthalmologica 2014 Epub ahead of print

Gallenberger M, Kroeber M, Koch M, März L, Fuchshofer R, Iwata T, Braunger BM, Tamm ER. Heterozygote Wdr36-deficient mice do not develop glaucoma. Experimental Eye Research 2014 Epub ahead of print

Nakayama M, Iejima D, Akahori M, Kamei J, Goto A, Iwata T. Overexpression of *Htral* and exposure to mainstream cigarette smoke leads to choroidal neovascularization and subretinal deposits in aged mice. Investigative Ophthalmology and Visual Science 2014;55:6514-6523

Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Hayashi T, Kondo M, Ueno S, Tsunoda K, Shinoda K, Kuniyoshi K, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Tsuneoka H, Iwata T. Whole exome analysis identifies frequent *CNGA1* mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. PLoS One 2014;9(9):e108721

Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, Tsuneoka H, Iwata T. Novel *C8orf37* mutations in patients with early-onset retinal dystrophy, macular atrophy, cataracts, and high myopia. Ophthalmic Genetics 2014;12:1-8

Tanito M, Hara K, Akahori M, Harata A, Itabashi T, Takai Y, Kaidzu S, Ohira A, Iwata T. Lack of association of *LOXL1* gene variants in Japanese patients with central retinal vein occlusion without clinically detectable pseudoexfoliation material deposits. Acta Ophthalmologica 2014; Aug 12

Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Funada H, Sasaki K, Minoda H, Iwata T, Mizota A. Pattern visually evoked potentials elicited

by organic electro-luminescence screen. BioMed Research International 2014:606951

Matsumoto CS, Nakagomi R, Matsumoto H, Minoda H, Shinoda K, Iwata T, Mizota A. Binocular interaction of visually evoked cortical potentials elicited by dichoptic binocular stimulation Journal of Vision 2014;14(11). pii4

Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Seki K, Nagasaka E, Iwata T, Mizota A. What monitor can replace cathode ray tube for visual stimulation to elicit multifocal electroretinograms? Journal of Vision 2014;14(9) pii:2

Kobayashi H, Okamoto H, Murakami A, Iwata T. Plasma Proteome Analysis On Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Pedigrees With Early Onset Drusen Formation. Journal of Experimental Animals 2014;63:305-310

Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Yoshitake K, Abe K, Ikeo K, Furuno M, Tsunoda K, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Longitudinal clinical course of three Japanese patients with Leber congenital amaurosis/severe early childhood onset retinal dystrophy with *RDH12* mutation. Documenta Ophthalmologica 2014;128:219-228

Katagiri S, Akahori M, Hayashi T, Yoshitake K, Gekka T, Ideo K, Tsuneoka H, Iwata T. Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the *EYS* gene. Documenta Ophthalmologica 2014;128:211-2117

Ohkuma Y, Hayashi T, Sakai T, Watanabe A, Yamada H, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Noda T, Tsuneoka H. Retinal angiomatous proliferation associated with risk alleles of *ARMS2/HTRA1* gene polymorphisms in Japanese patients. Journal of Clinical Ophthalmology 2014;8:143-8

Iwata T, Animal Models for Eye Diseases, Handbook of Laboratory Animal Science III, (Editor: Hau J and Schapiro SJ) CRC Press 2014:195-217

赤堀正和、岩田岳、黄斑ジストロフィー、特集
ゲノムと網膜関連疾患の関与を探る (編集: 山

城健児)、RETINA Medicine、先端医学社
2014;3:33-37

2. 学会発表

岩田 岳

Optineurin and normal tension glaucoma
World Ophthalmology Congress[®] 2014、東京、
2014. 4. 2~4. 6

家島大輔、岩田岳

滲出型加齢黄斑変性感受性遺伝子 ARMS2-HTRA1
のプロモーターの解析
第37回 日本分子生物学会年会、横浜、
2014. 11. 26

峯岸ゆり子、岩田岳

中国家系 Leber's Congenital Amaurosis の
発症に関わる複合ヘテロ接合形式遺伝子変異の
分子機序解析
第7回 Retinal Research Meeting、東京、
201. 11. 22. (口頭発表/日本語)

Minegishi, Y., Sheng, X., Iwata, T.
Molecular characterization of novel compound
heterozygous mutants associated with Leber
congenital amaurosis in Chinese family. XX
Biennial Meeting of the International Society
for Eye Research. San Francisco, CA, USA. 2014.
7. 22 (ポスター発表/英語)

Minegishi, Y., Sheng, X., Yoshitake, K.,
Sergeev, Y., Furuno, M., Zhuang, W., Liu, Y.,
Rong, W., Ikeo, K., Iwata, T.
Molecular characterization of novel compound
heterozygous mutants associated with Leber
congenital amaurosis in Chinese family. XVI
International Symposium on Retinal
Degeneration RD2014. Pacific Grove, CA, USA.
2014. 7. 13. (ポスター発表/英語)

峯岸ゆり子、岩田岳

オブチニューリンのアミノ酸E50K変異による遺
伝性緑内障の発症機序
第19回東北眼疾患病態研究会、仙台、2014. 5. 19
(招待講演/日本語)

須賀晶子、万代道子、高橋政代、岩田岳

網膜傷害後にみられるミューラーグリア細胞の増
殖とそれに伴う遺伝子発現のマウス系統間での
差
第7回 Retina Research Meeting、東京都、

2014. 11. 22

Nakayama M, Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y,
Akahori M, Noda T, Iwata T
Characterization of HTRA1 promoter in
patients with exudative age-related macular
degeneration and induction of choroidal
neovascularization by overexpression of
Htra1 in aged mice
XVIth International Symposium on Retinal
Degeneration, 2014. 7. 13-18

Nakayama M, Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y,
Akahori M, Noda T, Iwata T
Characterization of HTRA1 promoter in
patients with exudative age-related macular
degeneration and induction of choroidal
neovascularization by overexpression of
Htra1 in aged mice
The International Society for Eye Research
XXI Biennial Meeting, 2014. 7. 20-24

【その他の研究発表会】

家島大輔

滲出型加齢黄斑変性感受性遺伝子 ARMS2-HTRA1
のプロモーターの解析
国立病院機構東京医療センター若手研究者発表
会、東京都、2014、2014. 12. 25

須賀晶子、岩田岳

網膜神経細胞死によるグリア細胞の前駆細胞化
の多様性
国立病院機構東京医療センター若手研究者発表
会、東京都、2014. 12. 25

【招待講演】

岩田 岳

Overview of eye genetics and the way forward
in Asia, XIIth Congress of The South Asian
Academy of Ophthalmology
スリランカ コロンボ 2014. 9. 29~10. 4

岩田 岳

Molecular mechanism of gene associated with
glaucoma and age-related macular
degeneration, アメリカ サンディエゴ大学、
2014. 10. 16~10. 23

岩田 岳

網膜色素変性症の網羅的遺伝子解析と病因・病

態機序の解明

世界網膜の日(神戸)、兵庫県、2014.9.21(研究
助成 1位受賞スピーチ)

岩田 岳

最新の遺伝子解析技術と眼科への応用

第47回日本眼科講演会、東京都、2014.7.26

岩田 岳

「Characterization of gene responsible for
AMD, NTG and hereditary retinal diseases」
International Ophthalmic Genetics Meeting
2014、東京都、2014.4.1

岩田 岳

視覚障害おける原因遺伝子の新たな解明

感覚器シンポジウム 2014、東京都、

2014.3.14

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）
遺伝性網脈絡膜疾患の生体試料の収集と病態解明に関する研究

担当責任者 角田和繁 東京医療センター臨床研究センター 視覚研究部長

研究要旨：様々な遺伝性網膜疾患を有する患者について、眼科的検査を行い、同時に病態解明のための遺伝子検査を行った。対象疾患は、網膜色素変性、錐体杆体ジストロフィ、オカルト黄斑ジストロフィ、スターガルト病、ベスト病、杆体一色覚、コロイデレミア、アッシャー症候群等、多岐にわたっていた。既存の原因遺伝子に変異が見られた症例については臨床的表現型特徴と遺伝学的特徴の対応について考察し、新規遺伝子の関与が示唆された症例については、さらなる家系調査を行った。本年度は全体的な関連遺伝子分布をまとめるとともに、特に錐体杆体ジストロフィ、オカルト黄斑ジストロフィについて有益な知見が得られた。

A. 研究目的

遺伝性網膜疾患について更なる病態の解明、および今後の治療法の確立に向けて各種遺伝性網膜疾患の遺伝学的原因分布を明らかにすること、各疾患における表現型-遺伝子型の関係を明らかにすること、原因不明の疾患については原因遺伝子を特定すること等を目的とした。

B. 研究方法

当院眼科外来を受診した、網膜色素変性、錐体杆体ジストロフィ、オカルト黄斑ジストロフィ、スターガルト病、ベスト病、杆体一色覚、コロイデレミア、アッシャー症候群、先天性停止性夜盲、その他分類不能の黄斑ジストロフィを対象とした。

各症例の発症の経過を詳しく調べる他に、健常者を含めた定期的な眼科ルーチン検査（視力、視野検査等）、電気生理学的検査（全視野網膜電図、局所網膜電図）、画像診断（蛍光眼底造影、光干渉断層計；OCT）などを行い、眼科検査の面から疾患の完全な病態把握を行った。

インフォームドコンセント取得ののちに、患者およびその健常家族から全血採血を行い、東京医療センター分子細胞生物学研究部に検体を提出した。DNAを抽出したのち、Exome シークエンスおよび対象遺伝子のダイレクトシークエンスが施行され、疾患に関連する遺伝子変異を特定した。

C. 研究結果

1) 日本人における遺伝性網膜疾患における関連遺伝子の把握

2008年より本年度までに関連12施設より検体収集された遺伝性網膜疾患、日本人496家系、808症例を対象とした。疾患の内訳は、

網膜色素変性208家系、オカルト黄斑ジストロフィ64家系、レーベル先天盲23家系、錐体杆体ジストロフィ42家系、スターガルト病34家系、その他の黄斑ジストロフィ34家系、先天性停止性夜盲17家系であった。このうち、159家系387症例について、Whole exome sequencingあるいはTageted direct sequencingを行った。

疾患に関連のある変異は、159家系中71家系（44%）において特定された。このうちすでに報告のある変異は29家系（18%）において見られた。さらに、新規遺伝子変異と推定されるものが32家系（20%）において見られた。10家系（6%）においては、これまでに報告のない遺伝子の関与が疑われた。88家系（55%）においては疾患に関連のある変異は特定できなかった。

疾患ごとに見ると、網膜色素変性9/61家系（15%）、オカルト黄斑ジストロフィ11/36例（31%）、レーベル先天盲3/13（23%）において既知の変異が認められた。また、網膜色素変性13/61家系（36%）、オカルト黄斑ジストロフィ6/36例（17%）、レーベル先天盲5/13（38%）において既知遺伝子の新規変異が認められた。さらに、網膜色素変性の5家系およびレーベル先天盲の3家系において新規遺伝子の関与が関与していた。

日本人の遺伝性網膜疾患集団において、44%で遺伝学的病因診断が可能であった。これは米国、ヨーロッパにおける同様の調査とほぼ同等の結果であった。ただし、本研究においては既知遺伝子の新規変異および新規遺伝子の関与が多くの家系において見られており、遺伝学的背景が日本人に特有のものであるためと考えられた。

2) GUCY2D 遺伝子の関与する錐体杆体ジスト

ロフイ

*GUCY2D*は常染色体優性錐体杆体ジストロフィー (AD-CORD) および常染色体劣性 Leber 先天盲の原因遺伝子として知られている。当院では、新規の *GUCY2D* 遺伝子変異が原因と思われた CORD 2 家系を経験した。

(症例 1) 8 才男児。生下時より眼振が見られた。当科初診時 (7 歳)、視力右 (0.15)、左 (0.15)。羞明を自覚するものの、夜盲の自覚はない。Goldmann 動的視野検査 (GP) では軽度の求心性視野狭窄が見られた。両眼の黄斑部に軽度陥凹を伴う境界明瞭な円形萎縮巣を認め、OCT では同部位に網膜外層および色素上皮層の強い萎縮が見られた。全視野 ERG では杆体反応が著明に減弱し、杆体・錐体混合反応は a 波、b 波ともに振幅低下および潜時延長が見られた。錐体反応、30Hz フリッカー反応はともに消失していた。遺伝子解析の結果 *GUCY2D* 遺伝子にヘテロ変異を認めたが、両親には変異を認めなかった。

(症例 2) 10 才男性。3 歳児健診で視力不良を指摘された。当科初診時 (7 歳)、視力右 (0.5)、左 (0.6)。軽度の夜盲を自覚していた。GP はほぼ正常であった。両眼底周辺部の反射はやや不良であったが、黄斑部を含めて明らかな眼底異常は認めなかった。OCT では COST ラインが後極部で広範囲に欠損し、IS-ellipsoid ラインは中心窩で不明瞭であった。全視野 ERG では杆体反応が消失していた他は、症例 1 と同等の所見であった。両親に視力・眼底の異常は見られなかったが、両親ともに錐体反応 b 波の潜時がやや延長していた。遺伝子解析により *GUCY2D* 遺伝子に複合ヘテロ変異が認められ、両親のそれぞれにヘテロ変異が確認された。

眼底所見の異なる CORD の 2 症例で、いずれも *GUCY2D* 変異を認めた。症例 1 では de novo 変異が、症例 2 では常染色体優性変異が同定され、表現型との関連が示された。

3) *RP1L1* 遺伝子の関与するオカルト黄斑ジストロフィー

オカルト黄斑ジストロフィー (OMD) は徐々に視力低下を来し、検眼鏡的所見、蛍光眼底造影所見および全視野刺激 ERG に異常がなく、黄斑部において局所的な ERG の低下が認められる疾患と定義される。2010 年に *RP1L1* 遺伝子と本症との関係が明らかになった。

眼底検査および ERG にて OMD と診断された症例に対して遺伝子検査を行い、光干渉断層計 (OCT)、眼底自発蛍光 (AF) 等を用いて遺

伝学的特徴と臨床的特徴を比較した。

自験例では *RP1L1* 遺伝子変異が 27 例に認められ、いずれも 1 アミノ酸置換であった。全症例にて特徴的な黄斑部の OCT 異常が観察された。すなわち、錐体視細胞外節先端部 (COST) ラインの消失、視細胞内節 ellipsoid (ISe) ラインの不明瞭化、分断、消失、および中心窩 ISe ライン後方の顆粒状高輝度領域などである。ただし、*RP1L1* 遺伝子内の変異の違いによる臨床的所見の違いは明らかにならなかった。また、*RP1L1* 遺伝子に変異を認めなかった 8 症例のうち孤発例 4 例については、上記の形態的特徴は観察されなかった。

優性遺伝の家系においては、全症例で *RP1L1* 遺伝子変異が確認された。また、*RP1L1* 遺伝子変異のない 8 症例のうち、2 家系 4 症例は姉弟および兄弟で発症しており、劣性遺伝が疑われたが、これまでのところ原因遺伝子は確定していない。

本年度において *RP1L1* 遺伝子に複数の新規遺伝子変異が見つかった。また、検眼鏡的所見および電気生理学検査によって OMD と診断される症例には、*RP1L1* 遺伝子異常によるもの、その他の遺伝子異常によるもの、および、その他環境因子を含めた非遺伝学的病態が関与していることが明らかになった。

D. 考察

多施設、多数例症例のまとめにより、網膜疾患の遺伝学的要因に日本人の固有性があることが示唆された。将来的な治療ターゲット疾患の選別、および遺伝子治療を始めとする根本的治療法の導入にあたり、国内における遺伝学的要因をさらに詳細に把握する必要があると考えられた。

E. 結論

多施設間における多数症例の遺伝子解析により、遺伝性網膜疾患の包括的な原因解明に向けて意義のある結果が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kazuki Kuniyoshi, Hiroyuki Sakuramoto, Kazutoshi Yoshitake, Kosuke Abe, Kazuho Ikeo, Masaaki Furuno, Kazushige Tsunoda, Shunji Kusaka, Yoshikazu Shimomura, Takeshi Iwata

Longitudinal clinical course of three Japanese patients with Leber congenital amaurosis/early onset retinal dystrophy with RDH12 mutation
Documenta Ophthalmologica, June 2014, Volume 128, Issue 3, pp 219-228

Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Allikmets R, Michaelides M, Moore AT.
Clinical and Molecular Characteristics of Childhood-Onset Stargardt Disease.
Ophthalmology. 2014 Oct 12. [Epub ahead of print]

Kazuki Kuniyoshi, Kazuho Ikeo, Hiroyuki Sakuramoto, Masaaki Furuno, Kazutoshi Yoshitake, Yoshikazu Hatsukawa, Akira Nakao, Kazushige Tsunoda, Shunji Kusaka, Yoshikazu Shimomura, Takeshi Iwata
Novel nonsense and splice site mutations in CRB1 gene in two Japanese patients with early-onset retinal dystrophy
Documenta Ophthalmologica, 2014 Oct 17 (ahead of print)

Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Hayashi T, Kondo M, Ueno S, Tsunoda K, Shinoda K, Kuniyoshi K, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Tsuneoka H, Iwata T.
Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa.
PLoS One. 2014 Sep 30;9(9):e108721.

Nishikawa Y, Fujinami K, Watanabe K, Noda T, Tsunoda K, Akiyama K.
Clinical course of focal choroidal excavation in Vogt-Koyanagi-Harada disease.
Clin Ophthalmol. 2014 Dec 4;8:2461-5..

Miyake Y and Tsunoda K
Occult macular dystrophy
Japanese Journal of Ophthalmology, 2015, in press

Satoshi Katagiri, Takaaki Hayashi, Kazutoshi Yoshitake, Yuri Sergeev, Masakazu Akahori, Masaaki Furuno, Jo Nishino, Kazuho Ikeo, Kazushige Tsunoda, Hiroshi Tsuneoka, and Takeshi Iwata
Congenital achromatopsia and macular atrophy caused by a novel recessive PDE6C mutation (p.E591K)
Ophthalmic Genetics, Early Online, 1-8, 2015

Risa Yamazaki, Kazushige Tsunoda, Kaoru

Fujinami, Toru Noda, Kazuo Tsubota.
'Fundus autofluorescence imaging in patient with juvenile form of galactosialidosis'
Ophthalmic Surgery Lasers & Imaging Retina. May/June 2014 · Vol. 45, No. 3

Yu Kato, Kazushige Tsunoda, Kaoru Fujinami, Takeshi Iwata, Masamichi Saga, Yoshihisa Oguchi
'Association of retinal artery and other inner retinal structures with distribution of tapetal-like reflex in Oguchi's disease'
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015, in press

2. 学会発表

Toshihiko Hirakata, Kaoru Fujinami, Kazunori Tsunoda, Akito Hirakata, Yozo Miyake
「Case report of Monocular rod-cone dystrophy, which suspected Melanoma associated retinopathy.」
World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology, Tokyo, 4.2-4.6 2014

Ikko Iehisa, Kaoru Fujinami, Natsuko Nakamura, Toru Noda, Kazushige Tsunoda
「Siblings with Childhood-Onset Stargardt Disease Associated with External Limiting Membrane Thickening.」
World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology, Tokyo, 4.2-4.6 2014

Kato Y, Fujinami K, Noda T, Miyake Y, Tsunoda K.
「Fundus Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (Rendu-Osler-Weber Disease).」
WOC 2014 (World Ophthalmic Congress), Tokyo, Japan, April, 2nd-6th, 2014

Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Terasaki H
「Observations of cone photoreceptor by adaptive optics fundus camera in eyes with occult macular dystrophy」
ARVO 2014 Annual Meeting, Orlando, 2014.5.4-8

Toshiaki Hirakata, Yuko Nishikawa, Kaoru Fujinami, Ken Watanabe, Kazushige Tsunoda, Toru Noda, Kunihiko Akiyama.
「Efficacy of Aflibercept in Japanese Patients with Polypoidal Choroidal Vasculopathy

Insensitive to Ranibizumab Treatment (poster).
ARVO 2014 Annual Meeting、Orlando、
2014.5.4-8

Fujinami K, Zernant J, Ozawa Y, Tsubota K,
Robson AG, Holder GE, Webster AR, Alikmets R,
Michaelides M, Moore AT

「Clinical and Genetic Characteristics of
Childhood-onset Stargardt Disease」
ARVO annual meeting 2014 (The Association for
Research in Vision and Ophthalmology), Orlando,
FL, USA, April, 4th-8th, 2014

Kato Y, Fujinami K, Noda T, Akahori M, Iwata T,
Miyake Y, Tsunoda K.

「The case of occult macular dystrophy which
developed local retinal detachment at fovea with
vitreous traction」
ARVO annual meeting 2014, Orlando, FL, USA,
April, 4th-8th, 2014

Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Tsunoda
K, Akahori M, Iwata T, Terasaki H

「Observations of cone photoreceptor by adaptive
optics fundus camera in eyes with occult macular
dystrophy」
ARVO 2014 Annual Meeting、Orlando、
2014.5.4-8

Toshihiko Hirakata, Kaoru Fujinami, Yu Kato,
Natsuko Nakamura, Toru Noda, Akito Hirakata,
Shinji Ueno, Hiroshi Ohguro, Yozo Miyake,
Kazushige Tsunoda

「Unilateral Cone-rod Dysfunction associated
with Electronegative bright flash
Electroretinography」
ISCEV, Boston, 2014/7/20

Fujinami K, Zernant J, Ozawa Y, Tsunoda K,
Tsubota K, Robson AG., Alikmets R, Michaelides
M, Moore AT, Holder GE.

「Clinical and Genetic Characteristics of
Childhood-onset Stargardt Disease.」
ISCEV symposium 2014 (International Society
for Clinical Electrophysiology of Vision), Boston,
MA, USA, July, 21st-24th, 2014

Kato Y, Tsunoda K, Fujinami K, Noda T, Oguchi
Y.

「Novel fundusopic features in patients with
Oguchi's disease.」
ISCEV symposium 2014, Boston, MA, USA, July,
21st-24th, 2014

角田和繁

シンポジウム、「遺伝性網膜疾患、最新の
genotyping」

「オカルト黄斑ジストロフィー」
第 62 回日本臨床視覚電気生理学学会 東京都
墨田区、2014 年 10 月 3 日-10 月 4 日

藤波芳、後藤聡、赤堀正和、小沢洋子、坪田
一男、野田徹、岩田岳、三宅養三、角田和繁
「中心窩機能温存型黄斑ジストロフィ」(ミニ
シンポジウム)

第 62 回日本臨床視覚電気生理学学会 東京都
墨田区、2014 年 10 月 3 日-10 月 4 日

平形寿彬、藤波芳、中村奈津子、加藤悠、福
井正樹、野田徹、角田和繁、三宅養三

「黄斑分離の自然消失と共に改善を認めた黄
斑部局所律動様小波」(ミニシンポジウム)
第 62 回日本臨床視覚電気生理学学会 東京都
墨田区、2014 年 10 月 3 日-10 月 4 日

中村奈津子、藤波芳、野田徹、角田和繁、三
宅養三

「GUCY2D 遺伝子変異を伴う錐体杆体ジストロ
フィーの 2 例」
第 62 回日本臨床視覚電気生理学学会 東京都
墨田区、2014 年 10 月 3 日-10 月 4 日

近藤峰生、宇治幸隆、杉本昌彦、久瀬真奈美、
加藤久美子、松原央、角田和繁、赤堀正和、
岩田岳

「遅視症 (Bradyopsia) における暗順応下赤色
刺激 ERG」
第 62 回日本臨床視覚電気生理学学会 東京都
墨田区、2014 年 10 月 3 日-10 月 4 日

角田和繁
シンポジウム 7、「黄斑・網膜変性 一病態解
明から治療への発展」

「オカルト黄斑ジストロフィ (三宅病) の病
態と将来の治療。Pathogenesis of occult macular
dystrophy (Miyake's disease) and its therapeutic
approach.」
第 68 回日本臨床眼科学会、神戸、2014.11.13

角田和繁、飯田知弘、石龍鉄樹、丸子一朗、
古泉秀樹
インストラクションコース「眼底自発蛍光を
使いこなす」
第 68 回日本臨床眼科学会、神戸、2014.11.13

中村奈津子、藤波芳、水野嘉信、野田徹、角

田和繁

「簡易型フリッカー網膜電位計（レチバルR）
による錐体機能評価」
第 68 回日本臨床眼科学会、神戸、2014.11.13

加藤悠、佐々木真理子、平形寿彬、藤波芳、
渡辺健、秋山邦彦、角田和繁、野田徹
「加齢性黄斑変性症の再発予測における網膜
色素上皮病変測定の有用性」
第 68 回日本臨床眼科学会、神戸、2014.11.13

平形寿彬、佐々木真理子、加藤悠、藤波芳、
渡辺健、秋山邦彦、角田和繁、野田徹
「滲出性加齢黄斑変性に対するアフリベルセ
プト硝子体内注射の1年治療成績」
第 68 回日本臨床眼科学会、神戸、2014.11.15

渡辺健 藤波芳 秋山邦彦 角田和繁 野田
徹
「Macular coloboma に合併した網膜剥離」
第 53 回日本網膜硝子体学会総会、大阪、
2014.11.28-30

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

II. 委託業務成果報告 (業務項目分担研究報告)

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）
遺伝性網脈絡膜疾患の生体試料の収集と病態解明に関する研究

担当責任者 近藤 峰生 三重大学大学院医学系研究科臨床医学系講座眼科学 教授

研究要旨：今回我々は、原因不明の視機能障害を有する1名の男性に次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、本邦で初めての遅視症 (bradyopsia) 患者を診断し、その興味深い網膜機能特性を網膜電図 (ERG) で解析したので報告する。症例は55歳の男性であり、幼少時から暗い場所から明るい場所に出ると全く見えないという症状があった。一般的な ERG 所見は杆体一色覚に類似していたが、色覚がよく保たれており、原因不明のまま経過観察されていた。この患者のエクソーム解析を行ったところ、*R9AP* 遺伝子に1塩基挿入の frameshift 変異がホモで検出された。この患者の ERG 解析により、錐体視細胞の機能は保たれているものの光刺激後の回復が遅れており、刺激の感覚が10秒以下になると、患者の網膜の反応は著しく減少することがわかった。また、暗順応状態にすれば錐体機能はほぼ正常に近いことも判明した。

A. 研究目的

遅視症 (bradyopsia) は、2003年に Nishiguchi らが初めて報告した比較的新しい網膜疾患である。患者は明所でのまぶしさを訴え、視力は低く、動くものを捉えることが困難であるという症状がある。極めて珍しい網膜疾患で、これまでに世界で10名程度しか報告がない。

2003年の Nishiguchi らの Nature の論文で、この疾患の原因となる遺伝子が、*RGS9*あるいは *R9AP*であることがわかった。この2つの遺伝子産物は視細胞の興奮からの回復過程に重要な役割を果たしている。これらの遺伝子に異常があると、視細胞が光を受け取って興奮してから回復が遅延するため、連続して強い光を受容することができず、そのため患者は明るい場所でみにくい、あるいは動いているものが見にくい、という症状を有する。

この疾患の診断は極めて難しい。なぜならば、通常の眼科検査と網膜電図 (ERG) の所見からだ、この疾患は杆体一色覚と間違われてしまいやすいからである。患者の訴えをよく聞いて、視力がそれほど悪くないことや色覚が正常であることから本症を疑って特殊な ERG 検査を行わなければ診断できない。

今回我々は、これまで原因不明の視力低下と言われてきた1名の男性に次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、本邦で初めての遅視症患者を診断したので報告する。

B. 研究方法

患者の全血を7ml採血し、東京医療センター分子生物学研究部に検体を送り、その後白

血球からDNAを抽出してエクソーム解析を行った。両親と兄弟とともに採血の同意が得られず、本人の検体のみを用いて解析を行った。

網膜電図 (ERG) は、通常的全視野 ERG に加えて、遅視症の診断に有用とされる、刺激間隔を変えた ERG、single-train ERG、暗順応下で赤色刺激を用いた ERG を記録した。

本研究は三重大学医学部附属病院臨床研究倫理委員会の承諾を得て行った (#2429)。患者には十分に説明して書面にてインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

エクソーム解析により、*R9AP* 遺伝子に1塩基挿入の frameshift 変異がホモで検出された。

この55歳の男性は、幼少時から暗い場所から明るい場所に出ると全く見えないという症状があった。外で野球をしていても、ボールが全く見えない、運転は、サングラスしないとできない、という症状を有していた。

視力は、右 0.2 ($0.7 \times -3.00D = -1.50D$ Ax 120°)、左 0.2 ($0.7 \times -2.00D = -2.00D$ Ax 20°) であり、眼底と視野は正常で、色覚検査も正常であった。

ERG 検査では、杆体反応は正常であるものの、錐体反応が全く検出できなかった (図1)。幼少から症状があり、ERG の結果から杆体一色覚が疑われたが、色覚が正常であることから、確定診断できずに、原因不明の症例として三重大学眼科で経過観察されていた。

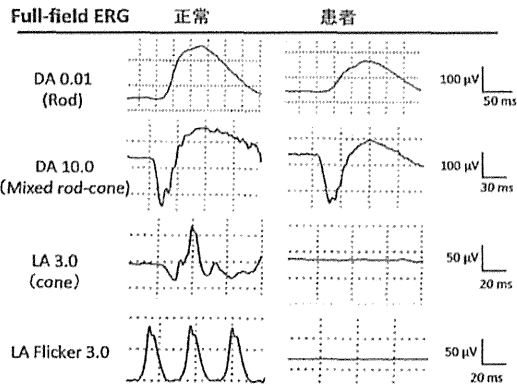


図 1: 遅視症患者の全視野 ERG 所見

エクソーム解析により、この患者が遅視症であることが疑われたので、機能的な確定診断を進めた。

まずは、20 分の暗順応後に刺激の間隔 (ISI) を 120 秒から 1 秒まで様々に変化させて ERG を記録した。その結果、正常者では ERG 波形に目立った変化はみられなかったが、遅視症患者では刺激間隔が短くなると ERG の振幅が低下した (図 2)。これは、先行する刺激から視細胞が回復するのが遅延しているためだと考えられた。

Dark-adapted 3.0 ERG with different inter-stimulus-intervals

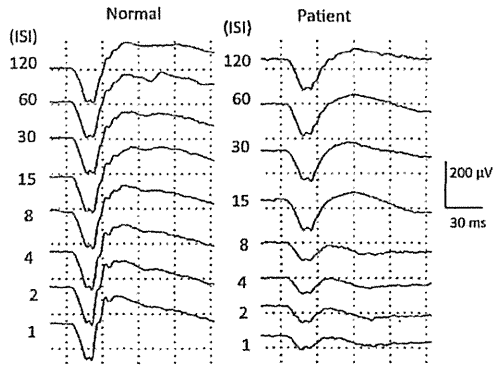
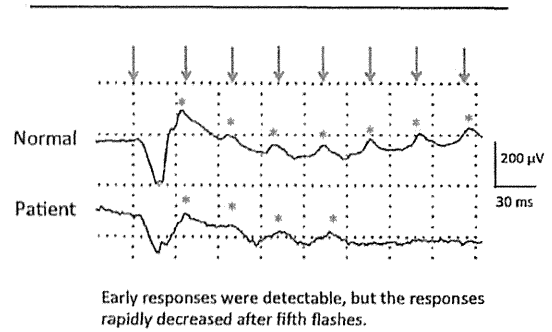


図 2: 刺激の間隔 (ISI) を様々に変化させて記録した ERG

次に、single-train 30-Hz flicker ERG を記録した。これは、1 秒間に 30 回の頻度で網膜を光刺激し、しかも加算を行わないで 1 回の train を全て記録するという ERG である。正常では 5 回目以降の刺激に対しても ERG の波は出ている。しかし遅視症患者では、4-5 回目以降の刺激では網膜は反応せず、振幅が極めて小さくなっていることがわかった (図 3)。

Dark-adapted, single train 30-Hz flicker ERG



Early responses were detectable, but the responses rapidly decreased after fifth flashes.

図 3: Single-train 30-Hz flicker ERG

最後に、遅視症患者に対する診断の決定的機能検査として知られている、暗順応後の赤色フラッシュ ERG を記録した。その結果、明るい背景光を点灯した状態では錐体 ERG 反応が出ないこの患者からも、暗順応後に赤色刺激で記録すれば明瞭な錐体 ERG が記録できることがわかった (図 4)。

Dark-adapted red flash ERG

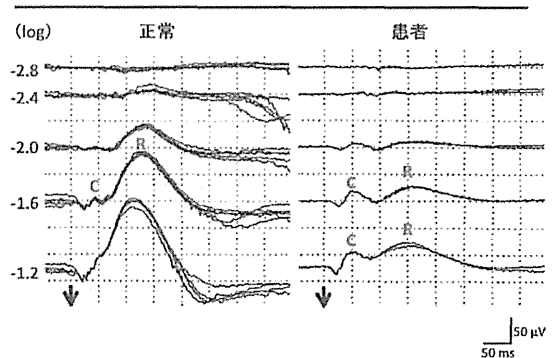


図 4: 暗順応後の赤色フラッシュ ERG

D. 考察

臨床症状と一般的な ERG 検査のみでは、この患者は杆体一色覚と診断されてしまう可能性が極めて高い。このような患者を今回我々はエクソーム解析を用いて遅視症であると診断することができた。

また、ERG 検査により、この患者は正常者よりも光を浴びてから元の状態に回復するまでの時間が長く、錐体細胞そのものの機能は残っているものの、暗順応状態でなければ機能を発揮できない、つまり錐体細胞でありながら暗所でなければ機能できないという極めて特徴的な性質を有していることがわかった。

E. 結論

今回我々は次世代シーケンサーを用いた

エクソーム解析を行い、本邦で初めての遅視症患者を診断し、ERGを用いてその興味深い網膜機能特性を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui Y, Matsubara H, Ueno S, Ito Y, Terasaki H, **Kondo M**. Changes in outer retinal microstructures during six month period in eyes with acute zonal occult outer retinopathy-complex. PLoS One. 2014;9(10):e110592.
- 2) Zhao Y, Hosono K, Suto K, Ishigami C, Arai Y, Hikoya A, Hirami Y, Ohtsubo M, Ueno S, Terasaki H, Sato M, Nakanishi H, Endo S, Mizuta K, Mineta H, **Kondo M**, Takahashi M, Minoshima S, Hotta Y. The first USH2A mutation analysis of Japanese autosomal recessive retinitis pigmentosa patients: a totally different mutation profile with the lack of frequent mutations found in Caucasian patients. J Hum Genet. 2014;59(9):521-8.
- 3) Sasoh M, Tsukitome H, Matsui Y, Furuta M, **Kondo M**. Bilateral retinal detachment in Werner syndrome. Retinal Cases & Brief Reports. 2014;8:92-94.
- 4) Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Hayashi T, **Kondo M**, Ueno S, Tsunoda K, Shinoda K, Kuniyoshi K, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Tsuneoka H, Iwata T. Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. PLoS One. 2014;9(9):e108721.
- 5) Tsukitome H, Hatsukawa Y, Morimitsu T, Yagasaki T, **Kondo M**. Changes in angle of optic nerve and angle of ocular orbit with increasing age in Japanese children. Br J Ophthalmol. 2015;99(2):263-6.
- 6) Katagiri S, Hayashi T, **Kondo M**, Tsukitome H, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T. RPE65 mutations in two Japanese families with Leber congenital amaurosis. Ophthalmic Genet. in press.
- 7) Sugimoto M, Matsubara H, Miyata R, Matsui Y, Ichio A, Kondo M : Ultra-WideField fluorescein angiography by oral administration of fluorescein. Acta Ophthalmol. 92:e417-8.

2. 学会発表

- 1) **Kondo M**. Importance, application and relevance of animal models to clinical human

ERG. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Boston, USA. 2014.7.20

2) **Kondo M**, Kato K, Nagashima R, Matsui Y, Sugimoto M, Matsubara H. Effect of pupil size on flicker ERGs recorded by new mydriasis-free ERG system (RETeval™). International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. Boston, USA. 2014. 7.23

3) Hosono K, Zhao Y, Ishigami C, Ueno S, Nakanishi H, Terasaki H, **Kondo M**, Masayo Takahashi M, Minoshima S, Hotta Y: Mutation Analysis of the USH2A Gene in Japanese Patients with Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa. ARVO2014. Orlando. 2014.5.6

4) Coppieters F, Fujimaki T, Bruyne MD, Baert A, **Kondo M**, Murakami A, Baere ED: Partial *NMNAT1* deletions cause Leber Congenital Amaurosis. ARVO2014. Orlando. 2014.5.6

5) Das G, Miyadera K, Santana E, Aguirre GD, **Kondo M**: Molecular and immunohistochemical characterization of a canine model of complete congenital stationary night blindness (CSNB). ARVO2014. Orlando. 2014.5.6

6) Nakagawa T, Matsui Y, Mizuochi M, **Kondo M**: A simple estimation method for visualization quality in retinal OCT images. ARVO2014. Orlando. 2014.5.7

7) Nagaya M, Ueno S, **Kondo M**, Furukawa T, Terasaki H: Photoreceptor and post-photoreceptor contribution to reduction of photopic b-wave ERG in light-adapted Pikachurin null-mutant mice. ARVO2014. Orlando. 2014.5.8

8) Matsubara H, Miyata R, Matsunaga K, Furuta M, **Kondo M**: Preoperative Predictive Factor of Retinal Pigment Epithelium Tear after treatment of eyes with Age-Related Macular Degeneration Associated with Large Vascularized Retinal Pigment Epithelium Detachment. ARVO2014. Orlando. 2014.5.6

9) Matsui Y, Miyata M, Matsubara H, Ueno S, Kachi S, Ito Y, Terasaki H, **Kondo M**: Changes in outer retinal microstructures during a six month period in eyes with onset of acute zonal occult outer retinopathy (AZOOR)-complex. ARVO2014. Orlando. 2014.5.4

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し