

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 國吉一樹 近畿大学医学部眼科学教室 講師

研究要旨：本研究は、遺伝性網脈絡膜疾患の原因遺伝子を究明し、その遺伝型と臨床型の関連について調査し報告することが目的である。分担研究組織である近畿大学医学部眼科学教室では、レーベル先天盲/若年発症網膜ジストロフィー、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、オカルト黄斑変性と診断された患者のうち、家族歴のはっきりしている症例について、前眼部、眼底、視力、視野、蛍光眼底造影、網膜電図(ERG)、暗順応、光断層干渉計(OCT)、超音波の各臨床検査を行い、合わせて家族歴を詳細に調査した。さらに、同意を得た患者とその血縁者に対して全血採血を行って東京医療センター分子生物学教室に送付し、次世代シーケンサーを用いた全エクソームの解析を行った。平成26年は7家系19例の患者とその家族に対して臨床検査と遺伝子検査を行い、それ以前に遺伝子検索を行った家系を含めて5家系について原因遺伝子が確定した。

A. 研究目的

本研究の目的は、次世代シーケンスを用いて遺伝性網脈絡膜疾患の患者とその血縁者の全エクソームを解析し、原因遺伝子とその変異を発見しようとするものである。全エクソームを解析することにより既知・未知を問わずに遺伝子異常を発見することができる。この解析方法は、特に常染色体劣性遺伝形式の疾患において、その原因の候補となる遺伝子を効率的にリストアップできる。

本研究では、常染色体劣性遺伝形式をとる網脈絡膜疾患を中心に、次世代シーケンサーを用いて遺伝子異常を発見し、その遺伝型と臨床型を比較して検討した。

B. 研究方法

まず、近畿大学医学部遺伝子倫理委員会に研究内容について書類で申請を行い、平成23年2月2日に承認を得た。

平成26年度は平成25年度にひきつづき、近畿大学医学部附属病院眼科を受診した常染色体劣性遺伝が疑われる網脈絡膜疾患の患者とその家族を対象に遺伝子解析と臨床検査を行った。対象となった疾患は、レーベル先天盲/若年発症網膜ジストロフィー、網膜色素変性、錐体-杆体ジストロフィー、オカルト黄斑ジストロフィーであった。発端者とその血縁者の臨床検査と遺伝子解析を行った。その中で、レーベル先天盲/若年発症網膜ジストロフィーと網膜色素変性については、前年度までの遺伝子解析で新規遺伝子の関与が疑われた家系と臨床型が類似する家系をリストアップして、重

点的に検体採取を行った。

臨床検査としては、前眼部・眼底検査、視力検査、視野検査、網膜電図(ERG)検査、暗順応検査、光干渉断層型(OCT)検査を行った。必要な症例に対しては、フルオレセインおよびインドシアニングリーン蛍光眼底造影検査、そして角膜検査や超音波断層検査を施行した。

発端者の血縁者には眼底検査を行った。了解を得た血縁者に対しては、眼底写真撮影や視野検査、ERG検査、OCT検査を行った。

遺伝子解析は、倫理委員会で承認された方法に則ってインフォームドコンセントを行い、全例書面で同意書を取得した。その後患者およびその血縁者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て遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

平成26年度は、東京医療センターに提出した検体からDNAを抽出して全エクソームのシーケンスを行った結果、1種の既知遺伝子(*RP111*)に既知変異が見つかった。その他には数種の新規遺伝子変異が原因遺伝子として候補に挙がっていて、現在、機能検査についての検討が行われている。そして類似の臨床型を示す家系について同じ遺伝子に異常がないかどうか現在解析が進められている。

平成26年は、それまでに結果が出た遺伝子解析結果をまとめた論文3編が出版された。

E. 結論

現在までにいくつかの新規遺伝子が候補の原

因遺伝子として挙がっており、現在さらに解析が進められている。

F. 健康危険情報

該当する危険 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuniyoshi K, Ikeo K, Sakuramoto H, Furuno M, Yoshitake K, Hatsukawa Y, Nakao A, Tsunoda K, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Novel nonsense and splice site mutations in *CRB1* gene in two Japanese patients with early-onset retinal dystrophy. *Doc Ophthalmol* 130: 49-55, 2015.
- 2) Kuniyoshi K, Terasaki H, Arai M, Hirose T. Macular electroretinogram in Stargardt's disease/fundus flavimaculatus. *Ophthalmologica* 233: 113-114, 2015.
- 3) 國吉一樹: 定型網膜色素変性. 青錐体強固症候群. 山本修一, 他 (編): 新版 どうとる? どう読む? ERG. メジカルビュー社, 東京, pp.80-81 & 124-125, 2015.
- 4) 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/early-onset retinal dystrophy with *RDH12* mutation. *Doc Ophthalmol* 128: 219-228, 2014.
- 5) Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y, Yoshitake K, Ileo K, Furuno M, Hayashi T, Kondo M, Ueno S, Tsunoda K, Shinoda K, Kuniyoshi K, Tsurusaki E, Matsumoto N, Ysuneoka H, Iwata T. Whole exome analysis identifies frequent *CNGA1* mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *PLoS One* 9: e108721, 2014.
- 6) Minami T, Kuniyoshi K, Kusaka S, Sugioka K, Sakuramoto H, Sakamoto M, Izu A, Wada N, Shimomura Y. Intravitreal injection of bevacizumab for retinopathy of prematurity in an infant with Peters anomaly. *Case Rep Ophthalmol* 5: 318-324, 2014.
- 7) Abe K, Shirane J, Sakamoto M, Tanabe F, Kuniyoshi K, Matsumoto C, Shimomura Y. Optical coherence tomographic findings at the fixation point in a case of bilateral congenital macular coloboma. *Clin Ophthalmol* 8: 1017-1020, 2014.
- 8) Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Nakao Y, Matsumoto C, Shimomura Y. Two types of

acute zonal occult outer retinopathy differentiated by dark- and light-adapted perimetry. *Jpn J Ophthalmol* 58: 177-187, 2014.

- 9) Kuniyoshi K, Sugioka K, Sakuramoto H, Kusaka S, Wada N, Shimomura Y. Intravitreal injection of bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Jpn J Ophthalmol* 128: 219-228, 2014.
 - 10) Kuniyoshi K, Terasaki H, Arai M, Hirose T. Multifocal electroretinograms in Stargardt's disease/fundus flavimaculatus. *Ophthalmologica* 232: 118-125, 2014.
 - 11) 櫻本宏之, 國吉一樹. 電気生理学的検査. 全視野ERG. *眼科* 56: 65-75, 2014.
 - 12) Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Nakao A, Sato T, Utsumi T, Tsuneoka H, Shimomura Y. Novel mutations in enhanced S-cone syndrome. *Ophthalmology* 120: 431.e1-6, 2013.
 - 13) Sakuramoto H, Kuniyoshi K, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Shimomura Y. Two siblings with late-onset cone-rod dystrophy and no visible macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 7: 1703-1711, 2013.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 國吉一樹. やさしい神経眼科. 網膜疾患との接点. 第68回日本臨床眼科学会. 神戸市. 2014.11.15.
 - 2) 國吉一樹, 櫻本宏之, 松本長太, 下村嘉一. AZOORのteo-color perimetry. 第3回日本視野学会学術集会. 東京都. 2014.6.29.
 - 3) 國吉一樹. 先天性疾患とERG. 第118回日本眼科学会総会. 東京都. 2014.4.5.
 - 4) Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Iwata T, Ikeo K, Shimomura Y. Longitudinal clinical courses of three Japanese with congenital amaurosis of Leber. World Ophthalmology Congress 2014. 東京都. 2014.4.2-6.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

寺崎 浩子 所属 名古屋大学大学院医学系研究科眼科 職名 教授
上野真治 所属 名古屋大学医学部附属病院眼科 職名 病院講師

研究要旨：

本研究において当研究室では、DNA解析を行うために遺伝性網脈絡膜疾患と考えられる患者の診断及び評価を行い、患者および家族の同意を得たうえで採血を行った。

多数の疾患の中でオカルト黄斑ジストロフィと呼ばれる疾患群に対して我々は、遺伝子解析とともに、他の光干渉断層計や補償光学眼底カメラを用いて視細胞レベルでの異常の観察を行った。オカルト黄斑ジストロフィの患者では以前より錐体細胞の異常が推測されていたが、補償光学眼底カメラを用いて錐体細胞を観察したところ、正常者に比較して錐体細胞の数が1/10以下に減少していたが、錐体細胞は黄斑に存在することが分かった。また、この残存している細胞の形はやや不整で、通常の1.2倍ほどに拡大していた。これらの結果は通常の視細胞が黄斑から消失すると考えられる他の黄斑ジストロフィとは異なっていると考えられた。われわれの結果は病態が不明であったオカルト黄斑ジストロフィの疾患機序の一因が解明された。

A. 研究目的

遺伝性網膜疾患を疑われる患者にはいまだに臨床病態が明らかにされていないものが多数ある。

当教室ではオカルト黄斑ジストロフィと呼ばれる疾患概念の確立をおこなっており、今回の研究対象とした。オカルト黄斑ジストロフィは眼底正常の黄斑ジストロフィであり、通常の黄斑ジストロフィより視力は良いとされている、また、長期間経過を観察しても眼底に変化がないということも特徴である。なぜオカルト黄斑ジストロフィはこのような特徴を持つのかわかってなかった。今回は、最新の画像機器を用いてこの疾患の病態を解明することを目的とした。

オカルト黄斑ジストロフィの原因遺伝子はRP1L1遺伝子と報告されており、今回は遺伝子検査の結果とその他の検査の結果も参考にした。

B. 研究方法

当院眼科外来を受診した、各種遺伝性網膜疾患（網膜色素変性、クリスタリン網膜症、錐体杆体ジストロフィ等、その他分類不能の網膜ジストロフィ）の中で、オカルト黄斑ジストロフィと考えられる患者11人を対象に光干渉断層計（以下 OCT）と補償光学眼底カ

メラ（以下 AO 眼底カメラ）を用いて評価を行った。オカルト黄斑ジストロフィの診断は、眼底正常、全視野網膜電図が正常で、黄斑部局所ERGもしくは多局所ERGが異常ということによって行った。またRP1L1の遺伝子異常の有無の関連を検討した。

C. 研究結果

オカルト黄斑ジストロフィの患者から3人からRP1L1に既知の変異を認めた。画像解析の結果、記録可能であった11例を検討した結果、全ての症例において、正常眼では明瞭に観察される錐体細胞のモザイク配列はみられず、黄斑部全体において不鮮明な背景上に高輝度の粒状の構造物が無数に観察された。この高輝度の構造物は大きさの検討から、錐体細胞の1.2倍程度の大きさであり、形状がみだれやや大きくなった錐体視細胞であると判断した。錐体細胞の密度は全ての症例で正常の1/10以下であるが、黄斑部全体に細胞は存在していた。

D. 考察

今回のオカルト黄斑ジストロフィの11症例の検討において、正常な錐体細胞のモザイク配列は検出されず、広範囲に錐体細胞が変性している可能性が考えられた。しかし、変性により視細胞全てが消失しているわけではなく、錐体視細胞は形態を変化させながらも、残存しており

これにより通常の黄斑ジストロフィよりも視力が保たれると考えられた。

E. 結論

今回の検討によりオカルト黄斑ジストロフィの病態が一部解明され、他の黄斑ジストロフィとの相違がわかった。
この研究結果は現在英文雑誌に投稿中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Case of paraneoplastic retinopathy with retinal ON-bipolar cell dysfunction and subsequent resolution of ERGs.

Ueno S, Nakanishi A, Nishi K, Suzuki S, Terasaki H. *Doc Ophthalmol*. 130(1):71-6
2015 Feb

2. 学会発表

1 上野 真治 シンポジウム1 「遺伝性網膜疾患、最新の genotyping」
第 62 回日本臨床視覚電気生理学会 東京
両国 平成 26 年 10 月 3 日

2 Shinji Ueno Symposium “Mechanism of Retinal degeneration” 2015 Asia ARVO
Yakohama 平成 27 年 2 月 18 日

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

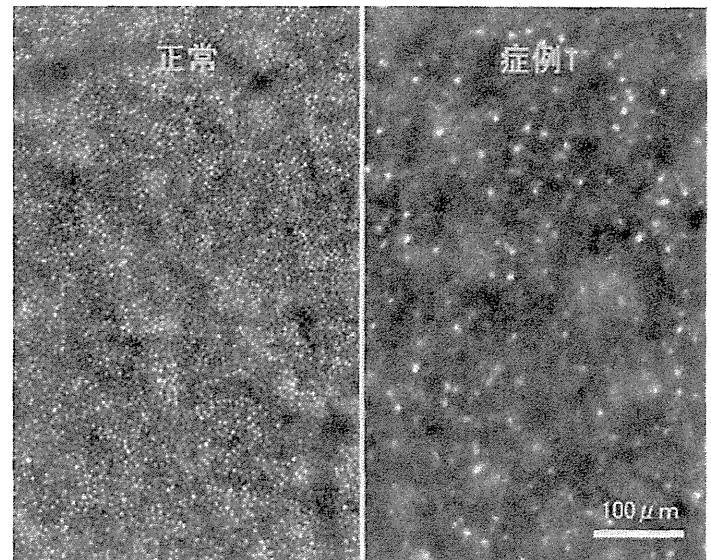


図 正常患者とオカルト黄斑ジストロフィの補償光学眼底カメラの像

正常者では錐体のモザイク配列が隙間なく並んでいるが、オカルト黄斑ジストロフィの患者ではやや大きい細胞が疎に配列している。

III. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

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」
 機関名独立行政法人 国立病院機構東京医療センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別) | 発表者氏名 | 発表した場所(学会等名) | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|-------|---|----------|--------|
| Optineurin and normal tension glaucoma | 岩田 岳 | World Ophthalmology Congress® 2014 | 2014年4月 | 国内 |
| Characterization of gene responsible for AMD, NTG and hereditary retinal diseases | 岩田 岳 | International Ophthalmic Genetics Meeting 2014 | 2014年4月 | 国内 |
| 最新の遺伝子解析技術と眼科への応用 | 岩田 岳 | 第47回日本眼科講演会 | 2014年7月 | 国内 |
| 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 | 岩田 岳 | 世界網膜の日(神戸) | 2014年9月 | 国内 |
| Overview of eye genetics and the way forward in Asia | 岩田 岳 | XII th Congress of The South Asian Academy of Ophthalmology | 2014年10月 | 国外 |
| Molecular mechanism of gene associated with glaucoma and age-related macular degeneration | 岩田 岳 | サンディエゴ大学 | 2014年10月 | 国外 |
| 遺伝性網膜疾患の網羅的な病態解明への挑戦 | 岩田 岳 | 第10回感覚器シンポジウム | 2015年3月 | 国内 |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文(発表題目) | 発表者氏名 | 発表した場所(学会誌・雑誌等名) | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|--|--|-------------------------------------|----------|--------|
| Novel nonsense and splice site mutations in CRB1 gene in two Japanese patients with early-onset retinal dystrophy Documenta Ophthalmologica. | Kuniyoshi K, Ikeo K, Sakuramoto H, Furuno M, Yoshitake K, Hatsukawa Y, Nakao A, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T | Documenta Ophthalmologica | 2015年2月 | 国外 |
| 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. | Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Noda T, Yuasa S, Fukuda K, Oka C, Iwata T | The Journal of Biological Chemistry | 2015年1月 | 国外 |
| RPE65 mutations in two Japanese families with Leber congenital amaurosis. | Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, Tsuneoka H, Iwata T | Ophthalmic Genetics | 2014年12月 | 国外 |

| | | | | |
|--|--|--|----------|----|
| A homozygous PDE6C mutation (E591K) associated with congenital achromatopsia and macular atrophy. | Katagiri S, Yoshitake K, Sergeev Y, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsuneoka H, <u>Iwata T</u> | Ophthalmic Genetics | 2014 | 国外 |
| RHO mutations (p.W126L and p.A346P) in two Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. | Katagiri S, Hayashi T, Akahori M, Itabashi T, Nishino J, Yoshitake K, Furuno M, Ikeo K, Okada T, Tsuneoka H and <u>Iwata T</u> | Journal of Ophthalmology | 2014年 | 国外 |
| Heterozygote Wdr36-deficient mice do not develop glaucoma. | Gallenberger M, Kroeber M, Koch M, März L, Fuchshofer R, <u>Iwata T</u> , Braunger BM, Tamm ER. | Experimental Eye Research | 2014年11月 | 国外 |
| Overexpression of Htra1 and exposure to mainstream cigarette smoke leads to choroidal neovascularization and subretinal deposits in aged mice. | Nakayama M, Iejima D, Akahori M, Kamei J, Goto A, <u>Iwata T</u> | Investigative Ophthalmology and Visual Science | 2014年9月 | 国外 |
| Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. | 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, <u>Iwata T</u> | PLoS One | 2014年9月 | 国外 |
| Binocular interaction of visually evoked cortical potentials elicited by dichoptic binocular stimulation | Matsumoto CS, Nakagomi R, Matsumoto H, Minoda H, Shinoda K, <u>Iwata T</u> , Mizota A. | Journal of Vision | 2014年9月 | 国外 |
| Novel C8orf37 mutations in patients with early-onset retinal dystrophy, macular atrophy, cataracts, and high myopia. | Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, Tsuneoka H, <u>Iwata T</u> | Ophthalmic Genetics | 2014年8月 | 国外 |
| Lack of association of LOXL1 gene variants in Japanese patients with central retinal vein occlusion without clinically detectable pseudoexfoliation material deposits. | Tanito M, Hara K, Akahori M, Harata A, Itabashi T, Takai Y, Kaidzu S, Ohira A, <u>Iwata T</u> | Acta Ophthalmologica | 2014年8月 | 国外 |
| Pattern visually evoked potentials elicited by organic electro-luminescence screen. | Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Funada H, Sasaki K, Minoda H, <u>Iwata T</u> , Mizota A | BioMed Research International | 2014年8月 | 国外 |

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

学会等発表実績

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」

機関名 独立行政法人 国立病院機構東京医療センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|--|---|--------------|--------|
| 「Case report of Monocular rod-cone dystrophy, which suspected Melanoma associated retinopathy.」 | Toshihiko Hirakata, Kaoru Fujinami, Kazunori Tsunoda, Akito Hirakata, Yozo Miyake | World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology, Tokyo | 4.2-4.6 2014 | 国内 |
| 「 Siblings with Childhood-Onset Stargardt Disease Associated with External Limiting Membrane Thickening.」 | Ikko Iehisa, Kaoru Fujinami, Natsuko Nakamura, Toru Noda, Kazushige Tsunoda | World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology, Tokyo | 4.2-4.6 2014 | 国内 |
| 「Fundus Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (Rendu-Osler-Weber Disease).」 | Kato Y, Fujinami K, Noda T, Miyake Y, Tsunoda K. | World Ophthalmology Congress of the International Council of Ophthalmology, Tokyo | 4.2-4.6 2014 | 国内 |
| 「 Observations of cone photoreceptor by adaptive optics fundus camera in eyes with occult macular dystrophy」 | Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Terasaki H | ARVO 2014 Annual Meeting, Orlando | 2014.5.4-8 | 国外 |
| 「 Efficacy of Aflibercept in Japanese Patients with Polypoidal Choroidal Vasculopathy Insensitive to Ranibizumab Treatment (poster).」 | Toshiaki Hirakata, Yuko Nishikawa, Kaoru Fujinami, Ken Watanabe, Kazushige Tsunoda, Toru Noda, Kunihiko Akiyama. | ARVO 2014 Annual Meeting, Orlando | 2014.5.4-8 | 国外 |
| 「Clinical and Genetic Characteristics of Childhood-onset Stargardt Disease.」 | Fujinami K, Zernant J, Ozawa Y, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Webster AR, Alikmets R, Michaelides M, Moore AT | ARVO annual meeting 2014, Orlando | 2014.5.4-8 | 国外 |
| 「The case of occult macular dystrophy which developed local retinal detachment at fovea with vitreous traction」 | Kato Y, Fujinami K, Noda T, Akahori M, Iwata T, Miyake Y, Tsunoda K. | ARVO annual meeting 2014, Orlando | 2014.5.4-8 | 国外 |
| 「 Observations of cone photoreceptor by adaptive optics fundus camera in eyes with occult macular dystrophy」 | Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Tsunoda K, Akahori M, Iwata T, Terasaki H | ARVO 2014 Annual Meeting, Orlando | 2014.5.4-8 | 国外 |

| | | | | |
|--|---|---|-----------------------|----|
| 「Unilateral Cone-rod Dysfunction associated with Electronegative bright flash Electroretinography」 | Toshihiko Hirakata, Kaoru Fujinami, Yu Kato, Natsuko Nakamura, Toru Noda, Akito Hirakata, Shinji Ueno, Hiroshi Ohguro, Yozo Miyake, Kazushige Tsunoda | ISCEV, Boston | 2014/7/20 | 国外 |
| 「Clinical and Genetic Characteristi | Fujinami K, Zernant J, Ozawa Y, Tsunoda K, Tsubota K, Robson AG., Alikmets R, Michaelides M, Moore AT, Holder GE. | ISCEV, Boston | July, 21st-24th, 2014 | 国外 |
| 「Novel fundusoscopic features in patients with Oguchi's disease.」 | Kato Y, Tsunoda K, Fujinami K, Noda T, Oguchi Y. | ISCEV symposium 2014, Boston | July, 21st-24th, 2014 | 国外 |
| 「オカルト黄斑ジストロフィー」 | 角田和繁 | 第62回日本臨床視覚電気生理学学会シンポジウム、「遺伝性網膜疾患、最新のgenotyping」 | 2014.10.3-4 | 国内 |
| 「中心窩機能温存型黄斑ジストロフィ」(ミニシンポジウム) | 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 | 第62回日本臨床視覚電気生理学学会 | 2014.10.3-4 | 国内 |
| 「黄斑分離の自然消失と伴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) | 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 | 第62回日本臨床視覚電気生理学学会 | 2014.10.3-4 | 国内 |
| 「GUCY2D 遺伝子変異を伴う錐体杆体ジストロフィーの2例」 | 中村奈津子、藤波芳、野田徹、角田和繁、三宅養三 | 第62回日本臨床視覚電気生理学学会 | 2014.10.3-4 | 国内 |
| 「遅視症 (Bradyopsia) における暗順応下赤色刺激ERG」 | 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 | 第62回日本臨床視覚電気生理学学会 | 2014.10.3-4 | 国内 |
| 「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.」 | 角田和繁 | 第68回日本臨床眼科学会 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」 | 2014.11.13 | 国内 |
| インストラクションコース「眼底自発蛍光を使いこなす」 | 角田和繁、飯田知弘、石龍鉄樹、丸子一朗、古泉秀樹 | 第68回日本臨床眼科学会 | 2014.11.13 | 国内 |
| 「簡易型フリッカー網膜電位計(レチナルR)による錐体機能評価」 | 中村奈津子、藤波芳、水野嘉信、野田徹、角田和繁 | 第68回日本臨床眼科学会 | 2014.11.13 | 国内 |
| 「加齢性黄斑変性症の再発予測における網膜色素上皮下病変測定の有用性」 | 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 | 第68回日本臨床眼科学会 | 2014.11.13 | 国内 |
| 「滲出性加齢黄斑変性に対するアプレクト硝子体内注射の1年治療成績」 | 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 | 第68回日本臨床眼科学会 | 2014.11.15 | 国内 |

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

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文(発表題目) | 発表者氏名 | 発表した場所 (学会誌・雑誌等名) | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|---|--------------------------------|----------------|--------|
| Longitudinal clinical course of three Japanese patients with Leber congenital amaurosis/early onset retinal dystrophy with RDH12 mutation | Kazuki Kuniyoshi, Hiroyuki Sakuramoto, Kazutoshi Yoshitake, Kosuke Abe, Kazuho Ikeo, Masaaki Furuno, <u>Kazushige Tsunoda</u> , Shunji Kusaka, Yoshikazu Shimomura, Takeshi Iwata | Documenta Ophthalmologica | June 2014 | 国外 |
| Clinical and Molecular Characteristics of Childhood-Onset Stargardt Disease | Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, <u>Tsunoda K</u> , Ozawa Y, Tsubota K, Robson AG, Holder GE, Allikmets R, Michaelides M, Moore AT. | Ophthalmology | 2014 Oct | 国外 |
| Novel nonsense and splice site mutations in CRB1 gene in two Japanese patients with early-onset retinal dystrophy | Kazuki Kuniyoshi, Kazuho Ikeo, Hiroyuki Sakuramoto, Masaaki Furuno, Kazutoshi Yoshitake, Yoshikazu Hatsukawa, Akira Nakao, <u>Kazushige Tsunoda</u> , Shunji Kusaka, Yoshikazu Shimomura, Takeshi Iwata | Documenta Ophthalmologica | 2014 Oct | 国外 |
| Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa | Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Hayashi T, Kondo M, Ueno S, <u>Tsunoda K</u> , Shinoda K, Kuniyoshi K, Tsurusaki Y, Matsumoto N, Tsuneoka H, Iwata T. | PLoS One. | 2014 Sep | 国外 |
| Clinical course of focal choroidal excavation in Vogt-Koyanagi-Harada disease. | Nishikawa Y, Fujinami K, Watanabe K, Noda T, <u>Tsunoda K</u> , Akiyama K. | Clin Ophthalmol | 2014 Dec | 国外 |
| Occult macular dystrophy | Miyake Y and Tsunoda K | Japanese Journal of Ophthalmol | 2015, in press | 国外 |

| | | | | |
|--|---|---|-----------------------|-----------|
| <p>Congenital achromatopsia and macular atrophy caused by a novel recessive PDE6C mutation (p.E591K)</p> | <p>Satoshi Katagiri, Takaaki Hayashi, Kazutoshi Yoshitake, Yuri Sergeev, Masakazu Akahori, Masaaki Furuno, Jo Nishino, Kazuo Ikeo, Kazushige Tsunoda, Hiroshi Tsuneoka, and Takeshi Iwata</p> | <p>Ophthalmic Genetics,</p> | <p>2015</p> | <p>国外</p> |
| <p>Fundus autofluorescence imaging in patient with juvenile form of galactosialidosis</p> | <p>Risa Yamazaki, Kazushige Tsunoda, Kaoru Fujinami, Toru Noda, Kazuo Tsubota</p> | <p>Ophthalmic Surgery Lasers & Imaging Retina</p> | <p>May/June 2014</p> | <p>国外</p> |
| <p>'Association of retinal artery and other inner retinal structures with distribution of tapetal-like reflex in Oguchi's disease'</p> | <p>Yu Kato, Kazushige Tsunoda, Kaoru Fujinami, Takeshi Iwata, Masamichi Saga, Yoshihisa Oguchi</p> | <p>2015, in press</p> | <p>2015, in press</p> | <p>国外</p> |
| <p>(総説)</p> | | | | |
| <p>「黄斑ジストロフィ(三宅病を含めて)」</p> | <p>角田和繁、藤波芳</p> | <p>眼科</p> | <p>2014</p> | <p>国内</p> |
| <p>「黄斑ジストロフィとERG」</p> | <p>角田和繁</p> | <p>オクリスタ</p> | <p>2014</p> | <p>国内</p> |
| <p>「オカルト黄斑ジストロフィ(三宅病)のOCT所見」</p> | <p>角田和繁</p> | <p>「オカルト黄斑ジストロフィ(三宅病)のOCT所見」</p> | <p>2014</p> | <p>国内</p> |
| <p>「黄斑部局所ERG」</p> | <p>藤波芳、中村奈津子、角田和繁</p> | <p>眼科</p> | <p>2014.4</p> | <p>国内</p> |
| <p>「Functional OCT」</p> | <p>鈴木航、角田和繁、谷藤学</p> | <p>臨床眼科</p> | <p>2014.10.30</p> | <p>国内</p> |
| <p>「卵黄様黄斑ジストロフィ」</p> | <p>角田和繁</p> | <p>眼科 2015年臨時増刊号</p> | <p>2015年</p> | <p>国内</p> |
| <p>(書籍)</p> | | | | |
| <p>「 Chapter 10. Fundus Autofluorescence in occult macular dystrophy」</p> | | <p>Lippincott</p> | | <p>国外</p> |
| <p>「網膜電図(ERG)」</p> | <p>角田和繁</p> | <p>眼科臨床クローズアップ</p> | <p>2014年4月10日</p> | <p>国内</p> |
| <p>「網膜遺伝性疾患」</p> | <p>角田和繁</p> | <p>眼科グラフィック</p> | | <p>国内</p> |
| <p>「オカルト黄斑ジストロフィ」</p> | <p>角田和繁</p> | <p>新版 どうとる？どう読む？ERG」</p> | | <p>国内</p> |

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

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」

機関名 独立行政法人 国立病院機構東京医療センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|---|--------------|------------|--------|
| Controversies in Retinal Vein Occlusion. (シンポジウム) | Kondo M | WOC2014 | 2014. 4. 2 | 国外 |
| A Case of Japanese Patient Diagnosed As Melanoma-Associated Retinopathy with Anti-TRPM-1 Antibody. (ポスター) | Kimura K, Fujitsu Y, Ueno S, Kondo M, Sonoda K | WOC2014 | 2014. 4. 4 | 国外 |
| The Role of Vascular Endothelium Growth Factor on Onset of Retinopathy Associated with Gestational Causes of Visual Impairment in Mie Prefecture During a 9-Year Period. (ポスター) | Sugimoto M, Kondo M, Ikeda T, Bela Anand-Antes | WOC2014 | 2014. 4. 5 | 国外 |
| A New Light Stimulus System for Zebrafish Electroretinogram. (ポスター) | Ikesugi K, Tsukitome H, Yagi T, Miyata M | WOC2014 | 2014. 4 | 国外 |
| Orbital Development in Japanese Children. (ポスター) | Matsubara H, Tanaka T, Nishimura Y, Matsui Y | WOC2014 | 2014. 4 | 国外 |
| Evaluations of Tear Meniscus Height and Wavefront Aberrations in Nasolacrimal Duct Obstruction Before and after Intubation | Tsukitome H, Hatsukawa Y, Shimada M, Kondo M | WOC2014 | 2014. 4 | 国外 |
| To Study the Changes in the Outer Retinal Microstructures Six Months after the Onset of Acute Zonal Occult Outer Retinopathy | Kato K, Matsunaga K, Takashima Y, Hirano K | WOC2014 | 2014. 4 | 国外 |
| Effect of Age on the Electroretinogram from Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells | Matsui Y, Matsubara H, Ito Y, Terasaki H, Kondo M | WOC2014 | 2014. 4 | 国外 |
| Changes in outer retinal microstructures during a six month period in eyes with onset of acute zonal occult | Kuze M, Ayaki M, Tsubota K, Kondo M, Morita T | WOC2014 | 2014. 4 | 国外 |
| Preoperative Predictive Factor of Retinal Pigment Epithelium Tear after treatment of eyes with Age- | Matsui Y, Miyata M, Matsubara H, Ueno S, Kachi | ARVO2014 | 2014. 5. 4 | 国外 |
| Mutation Analysis of the USH2A Gene in Japanese Patients with Autosomal Recessive Retinitis | Matsubara H, Miyata R, Matsunaga K, Matsui Y | ARVO2014 | 2014. 5. 6 | 国外 |
| Molecular and immunohistochemical characterization of a canine model of complete congenital | Hosono K, Yang Zhao, Ishigami C, Ueno S | ARVO2014 | 2014. 5. 6 | 国外 |
| Relationship between retinal venous tortuosity and aqueous vascular endothelial growth factor concentration | Gautami Das, Miyadera K, Evelyn Santana | ARVO2014 | 2014. 5. 6 | 国外 |
| Partial NMNAT1 deletions cause Leber Congenital Amaurosis. | Yasuda S, Kachi S, Kondo M, Tamai Y, Ueno | ARVO2014 | 2014. 5. 6 | 国外 |
| | Frauke Coppieters, Fujimaki T, Marieke De | ARVO2014 | 2014. 5. 6 | 国外 |

| | | | | |
|---|--|--|--------------|----|
| Effect of Pupil Size on ERGs Recorded by New Mydriasis - Free Full - Field Flicker ERG System (RETeval™) (ポスター) | Kondo M, Kato K, Nagashima R, Matsui Y, Sugimoto M | ARVO2014 | 2014. 5. 7 | 国外 |
| A simple estimation method for visualization quality in retinal OCT images. (ポスター) | Nakagawa T, Matsui Y, Mizuochi M, Kondo M | ARVO2014 | 2014. 5. 7 | 国外 |
| Usefulness of Ultra-Widefield Fluorescein Angiography by Oral Administration of | Sugimoto M, Matsubara H, Miyata R, Matsui Y | ARVO2014 | 2014. 5. 8 | 国外 |
| Effect of age on the electrical response from intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ポスター) | Kuze M, Matsubara H, Ayaki M, Tsubota K | ARVO2014 | 2014. 5. 8 | 国外 |
| Photoreceptor and post-photoreceptor contribution to reduction of photopic b-wave ERG in light-adapted | Nagaya M, Ueno S, Kondo M, Furukawa T, Terasaki H | ARVO2014 | 2014. 5. 8 | 国外 |
| Importance, application and relevance of animal models to clinical human ERG. (教育講演) | Kondo M | International Society for Clinical Electrophysiology of Vision | 2014. 7. 20 | 国外 |
| Dark-adapted red ERG in a case with bradyopsia. (口頭) | Kondo M, Uji U, Akahori M, Iwata T | International Society for Clinical Electrophysiology of Vision | 2014. 7. 22 | 国外 |
| Effect of pupil size on flicker ERGs recorded by new mydriasis-free ERG system (RETeval™) (口頭) | Kondo M, Kato K, Nagashima R, Matsui Y, Sugimoto M | International Society for Clinical Electrophysiology of Vision | 2014. 7. 23 | 国外 |
| Clinical application and recent advances in electroretinography (ERG). (シンポジウム) | Kondo M | Combined AAPOS - JAPO - JASA International Meeting | 2014. 11. 30 | 国外 |
| Changes in angle of optic nerve and angle of ocular orbit with increasing age in Japanese children (ポスター) | Tsukitome H, Hatsukawa Y, Morimitsu T, Yagasaki T | AAPOS-JAPO-JASA Joint Meeting | 2014. 11. 30 | 国外 |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文(発表題目) | 発表者氏名 | 発表した場所(学会誌・雑誌等名) | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|-------------------------------------|--|----------|--------|
| Bilateral retinal detachment in Werner syndrome. | Sasoh M, Tsukitome H, Matsui Y | Retinal Cases & Brief Reports 8: 92-94 | 2014. 4 | 国外 |
| Electroretinograms and level of aqueous vascular endothelial growth factor in | Yasuda S, Kachi S, Ueno S, Ushida H | Jpn J Ophthalmol 58(3):232-236. | 2014. 5 | 国外 |
| The 5-year incidence of bleb-related infection and its risk factors after | Yamamoto T, Sawada A, Mayama C | Ophthalmology 121(5):1001-1006 | 2014. 5 | 国外 |
| Ultra-WideField fluorescein angiography by oral administration of | Sugimoto M, Matsubara H, Miyata R | Acta Ophthalmol 92(5): e417-8. | 2014. 8 | 国外 |
| Probing of congenital nasolacrimal duct obstruction with | Kato K, Matsunaga K, Takashima Y | Clin Ophthalmol 8:977-980 | 2014. 9 | 国外 |
| Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese | Katagiri S, Akahori M, Sergeev Y | PLoS One 9(9): e108721 | 2014. 9 | 国外 |
| The first USH2A mutation analysis of Japanese autosomal recessive | Zhao Y, Hosono K, Suto K | J Hum Genet 59(9):521-528 | 2014. 9 | 国外 |
| Changes in outer retinal microstructures during six month period in eyes with | Matsui Y, Matsubara H, Ueno S, Ito | PLoS One 9(10):e110592 | 2014. 10 | 国外 |

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

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」

機関名 独立行政法人 国立病院機構東京医療センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|--|-----------------------------------|---------------|--------|
| やさしい神経眼科. 網膜疾患との接点（口頭） | 國吉一樹 | 第68回日本臨床眼科学会 | 2014. 11. 15. | 国内 |
| AZORのteo-color perimetry（口頭） | 國吉一樹, 櫻本宏之, 松本長太, 下村嘉 | 第3回日本視野学会学術集会 | 2014. 6. 29. | 国内 |
| Longitudinal clinical courses of three Japanese with congenital amaurosis of Leber (ポスター) | Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Iwata T, Ikeo K | World Ophthalmology Congress 2014 | 2014. 4. 2-6. | 国内 |

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会誌・雑誌等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|--|-----------------------------------|--------|--------|
| Novel nonsense and splice site mutations in CRB1 gene in two Japanese patients | Kuniyoshi K, Ikeo K, Sakuramoto H | Documenta Ophthalmologica | 2015 | 国外 |
| Macular electroretinogram in Stargardt's disease/fundus albipunctatus | Kuniyoshi K, Terasaki H, Arai M | Ophthalmologica | 2015 | 国外 |
| 定型網膜色素変性. 青錐体強調症候群 | 國吉一樹 | 新版 どうぞる? どう読む? ERG. メジカルビュー社 東京 | 2015 | 国内 |
| Longitudinal clinical course of three Japanese patients with Leber's hereditary optic neuropathy | Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Yoshitake S | Documenta Ophthalmologica | 2014 | 国外 |
| Whole exome analysis identifies frequent CNGA1 mutations in Japanese | Katagiri I, Akahori M, Sergeev V | PLOS ONE | 2014 | 国外 |
| Intravitreal injection of bevacizumab for retinopathy of prematurity in an infant | Mitsumi T, Kuniyoshi K, Kusaka S | Case Reports in Ophthalmology | 2014 | 国外 |
| Optical coherence tomographic findings at the fixation point in a case of two types of acute zonal occult outer retinopathy | Abe K, Shirane J, Sakamoto M | Clinical Ophthalmology | 2014 | 国外 |
| Two types of acute zonal occult outer retinopathy differentiated by dark- and light-induced ERG | Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Nakan Y | Japanese Journal of Ophthalmology | 2014 | 国内 |
| Intravitreal injection of bevacizumab for retinopathy of prematurity | Kuniyoshi K, Sugioka K, Sakuramoto H | Japanese Journal of Ophthalmology | 2014 | 国内 |
| Multifocal electroretinograms in Stargardt's disease/fundus albipunctatus | Kuniyoshi K, Terasaki H, Arai M | Ophthalmologica | 2014 | 国外 |
| Novel mutations in enhanced S-cone syndrome | Kuniyoshi K, Hayashi T | Ophthalmology | 2013 | 国外 |

(注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

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」

機関名 独立行政法人 国立病院機構東京医療センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|--|-------|-------------------------|-----------|--------|
| 遺伝性網膜疾患、最新の genotyping 口頭発表 | 上野 真治 | 東京 阿国 第02回日本臨床視覚電気生理学会 | H26 10月3日 | 国内 |
| Mechanism of Retinal degeneration 口頭発表 | 上野 真治 | 2015 Asia ARVO Yokohama | H27 2月18日 | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

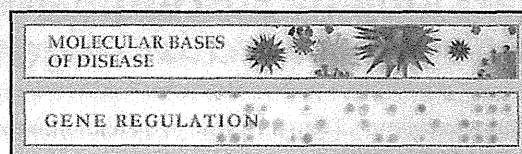
2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

| 掲載した論文（発表題目） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会誌・雑誌等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|---|-------|---------------------------|--------|--------|
| Case of paraneoplastic retinopathy v Ueno, S. et al | | Documenta Ophthalmologica | 2015 | 国外 |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

- (注1) 発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。
- (注2) 本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Molecular Bases of Disease:
***HTRA1* (High Temperature Requirement A
Serine Peptidase 1) Gene Is
Transcriptionally Regulated by
Insertion/Deletion Nucleotides Located at
the 3' End of the *ARMS2* (Age-related
Maculopathy Susceptibility 2) Gene in
Patients with Age-related Macular
Degeneration**



Daisuke Iejima, Takeshi Itabashi, Yuich
Kawamura, Toru Noda, Shinsuke Yuasa,
Keiichi Fukuda, Chio Oka and Takeshi Iwata

J. Biol. Chem. 2015, 290:2784-2797.

doi: 10.1074/jbc.M114.593384 originally published online December 17, 2014

Access the most updated version of this article at doi: 10.1074/jbc.M114.593384

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the JBC Affinity Sites.

Alerts:

- When this article is cited
- When a correction for this article is posted

Click here to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 40 references, 16 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/290/5/2784.full.html#ref-list-1>

HTRA1 (High Temperature Requirement A Serine Peptidase 1) Gene Is Transcriptionally Regulated by Insertion/Deletion Nucleotides Located at the 3' End of the *ARMS2* (Age-related Maculopathy Susceptibility 2) Gene in Patients with Age-related Macular Degeneration*

Received for publication, July 1, 2014, and in revised form, December 15, 2014. Published, JBC Papers in Press, December 17, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.593384

Daisuke Iejima[‡], Takeshi Itabashi[‡], Yuich Kawamura[‡], Toru Noda[§], Shinsuke Yuasa[¶], Keiichi Fukuda[¶], Chio Oka^{||}, and Takeshi Iwata^{‡1}

From the [‡]Division of Molecular and Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, and the [§]Division of Ophthalmology, National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokyo 152-8902, Japan, the [¶]Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan, and the ^{||}Division of Gene Function in Animals, Nara Institute of Science and Technology, Nara 630-0101, Japan

Background: The biological function of insertion/deletion sequences associated with AMD has not been fully characterized.

Results: The *HTRA1* regulatory region contains an insertion/deletion sequence that is significantly up-regulated in retinal neuronal cell lines.

Conclusion: *HTRA1* expression is enhanced by a mutation in the insertion/deletion in the *HTRA1* regulatory region.

Significance: This is the characterization of the *HTRA1* regulatory elements and the effect of insertion/deletion sequences associated with AMD.

Dry age-related macular degeneration (AMD) accounts for over 85% of AMD cases in the United States, whereas Japanese AMD patients predominantly progress to wet AMD or polypoidal choroidal vasculopathy. Recent genome-wide association studies have revealed a strong association between AMD and an insertion/deletion sequence between the *ARMS2* (age-related maculopathy susceptibility 2) and *HTRA1* (high temperature requirement A serine peptidase 1) genes. Transcription regulator activity was localized in mouse retinas using heterozygous *Htra1* knock-out mice in which *Htra1* exon 1 was replaced with β -galactosidase cDNA, thereby resulting in dominant expression of the photoreceptors. The insertion/deletion sequence significantly induced *HTRA1* transcription regulator activity in photoreceptor cell lines but not in retinal pigmented epithelium or other cell types. A deletion construct of the *HTRA1* regulatory region indicated that potential transcriptional suppressors and activators surround the insertion/deletion sequence. Ten double-stranded DNA probes for this region were designed, three of which interacted with nuclear extracts from 661W cells in EMSA. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) of these EMSA bands subsequently identified a protein that bound the insertion/deletion sequence, LYRIC (lysine-rich CEACAM1 co-isolated) protein. In addition, induced pluripotent stem cells from wet AMD patients carrying the insertion/deletion sequence showed significant up-regulation of the *HTRA1* transcript compared with controls. These data suggest

that the insertion/deletion sequence alters the suppressor and activator *cis*-elements of *HTRA1* and triggers sustained up-regulation of *HTRA1*. These results are consistent with a transgenic mouse model that ubiquitously overexpresses *Htra1* and exhibits characteristics similar to those of wet AMD patients.

Recent genome-wide association studies have identified more than 19 susceptibility genes associated with age-related macular degeneration (AMD)² (1). Among these genes, two loci have been highly associated with AMD, and these include the *CFH* (complement factor H) gene on chromosome 1q32 and the *ARMS2/HTRA1* (age-related macular degeneration susceptibility 2/high temperature requirement A1) gene on chromosome 10q26. Although a strong association of *CFH* Y402H (rs1061170) with Caucasians with dry AMD has been established (2, 3), this locus has not been associated with the majority of Japanese patients with wet AMD (4). Rather, *ARMS2/HTRA1* is the region most strongly associated with wet AMD in Japanese patients (5, 6). Moreover, the single nucleotide polymorphism (SNP), rs10490924, was shown in a single linkage disequilibrium (LD) block to increase the risk of wet AMD in both Caucasian and Japanese AMD populations (6). This LD block included the entire *ARMS2* gene and a portion of *HTRA1* exon 1 (Fig. 1). However, genome-wide association studies alone are insufficient to distinguish between these two candidate genes. Previous reports have identified an insertion/deletion region ~443 bp in length that immediately follows the

* This work was supported by Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare Grant 10103254 and National Hospital Organization of Japan Grant 09005752 (to T. I.). This work was also supported by Japan Society for the Promotion of Science Grant 23890258 (to D. I.).

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel./Fax: 81-3-34111026; E-mail: takeshi_iwata@kankakuki.go.jp.

² The abbreviations used are: AMD, age-related macular degeneration; LD, linkage disequilibrium; RPE, retinal pigment epithelium; PCV, polypoidal choroidal vasculopathy; iPSC, induced pluripotent stem cell; TLR, Toll-like receptor.

second exon of *ARMS2* within the regulatory element of *HTRA1* (7, 8). This finding led to confusion as to whether a single gene or both *ARMS2* and *HTRA1* are involved in AMD. *ARMS2* is a recent gene evolutionarily and is within the primate lineage (7, 9). Its protein product, ARMS2, has been shown to localize to the mitochondria of the inner segment of the photoreceptor (7) and to interact with fibulin-6 in the extracellular matrix of the choroid (10). However, details regarding the biological function(s) of ARMS2 remain unclear (7, 9, 10). In contrast, *HTRA1* has been characterized to some extent. HTRA1 belongs to the HTRA serine protease family, which is highly conserved from microorganisms to multicellular organisms, including humans (11). Several cellular and molecular studies have suggested that HTRA1 plays a key role in regulating various cellular processes via the cleavage and/or binding of pivotal factors that participate in cell proliferation, migration, and cell fate (12–15). Recently, up-regulation of human *HTRA1* expression in the mouse retinal pigment epithelium (RPE) was shown to induce a branching network of choroidal vessels and polypoidal lesions and severe degeneration of the elastic lamina and tunica media of the choroidal vessels, similar to that observed in AMD and PCV patients (16, 17). A mutation in *HTRA1* has also been associated with a hereditary form of familial cerebral small vessel disease (CARASIL (cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)) (18). The original report by Dewan *et al.* (19) described the up-regulation of HTRA1 in fibroblasts obtained from AMD patients. This result was both confirmed and denied by several other groups and was also subjected to a regulatory element characterization assay containing the insertion/deletion sequence (7, 8). However, the results obtained were based on transcription regulator activity that was measured using the human RPE cell line, ARPE19. On the basis of previous study, the purpose of this study is to characterize transcription regulation of *ARMS2* and *HTRA1* genes in wet form AMD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subjects—A total of 226 Japanese patients with typical wet AMD without PCV (average age, 74.68 ± 8.86 years) were classified as 5b according to Seddon *et al.* (20). In addition, 228 non-AMD Japanese individuals (average age, 75.22 ± 7.23 years) were recruited as controls for this study (Table 1). All patients were diagnosed by fundus observation or by fluorescein/indocyanine green angiographic findings. For the controls, no signs of early AMD, such as soft drusen or alterations of the retinal pigment epithelium in the macula area, were observed ophthalmoscopically. Informed consent was obtained from all of the patients and controls, and the procedures performed conformed to the tenets of the Declaration of Helsinki.

DNA Isolation and Sequencing—Human DNA was extracted from blood samples using a Magstration System 8Lx (Precision System Science Co., Ltd., Tokyo, Japan). The *PLEKHA1-ARMS2-HTRA1* region of genomic DNA was amplified from both control and AMD patient samples using the primers listed in Table 1. PCR amplifications for all primer sets were performed in a 20- μ l volume containing 100 ng of genomic DNA and 1 unit of *Taq* polymerase (PrimerStar, Takara Bio Co. Ltd., Japan) for 35–40 cycles of amplification. Amplified PCR products were then

TABLE 1
Primers used for sequencing

| Primer name | Sequence |
|------------------|--------------------------------|
| PLEKHA1-ARMS2-F1 | CCCCATGCTTTCAGGGTTCACC |
| PLEKHA1-ARMS2-R1 | GGGGTCTCATTCTGTGTCCAGGC |
| PLEKHA1-ARMS2-F2 | TGTTCCAGCCTCTCCCCACTCTT |
| PLEKHA1-ARMS2-R2 | GAACCACTTCTCCAGCCAAACACT |
| PLEKHA1-ARMS2-F3 | GTTCAGTGGCGCAATCTCGGC |
| PLEKHA1-ARMS2-R3 | CCTCATGCACTGCTAGTGGGATGTG |
| PLEKHA1-ARMS2-F4 | CAGGCTGGAGTGCAATGGTGTGAT |
| PLEKHA1-ARMS2-R4 | GGAGGATTGTCTGAGCCAGGAC |
| PLEKHA1-ARMS2-F5 | CTACGTGGCGGGCGCTGCT |
| PLEKHA1-ARMS2-R5 | CTGTGTGGCTGGACTCGGTAGCT |
| ARMS2-F1 | CTGAGCCGAGGAGTATGAGG |
| ARMS2-R1 | CAGGAACCCAGGAGGACAGAC |
| ARMS2-F2 | TCCCTGAGACCACCAACAA |
| ARMS2-R2 | CGCGCTCACATTTAGAACAT |
| ARMS2-F3 | GCGCTTGTGCTTCCCATAGT |
| ARMS2-R3 | CCAAAATAGGACAAAGGTGAGG |
| ARMS2-F4 | GTGAAACCCCATCTACTAATAACAG |
| ARMS2-R4 | CCCACATCAGTTCAGTTAGGTTCCGTTACG |
| ARMS2-F5 | GCTTGGCAGTCAATGATGATGAT |
| ARMS2-R5 | CAGGCCCTGGCAGCGGTATTCT |
| ARMS2-HTRA1-F2 | CAAGCCCTGGTGTGAGTGAAGAATGAGTT |
| ARMS2-HTRA1-R2 | GAGGGGTGGAGAAATGGGTAAGAGG |
| ARMS2-HTRA1-F3 | TCCACTTCGGCCGACACTTCTCT |
| ARMS2-HTRA1-R3 | TGCCCTTCTTTCGCCACACTTCC |
| ARMS2-HTRA1-F4 | TGGGGCAGGAGGATGGAAGAG |
| ARMS2-HTRA1-R4 | AGGGAATGAGCGGACCAGAAACAGT |
| ARMS2-HTRA1-F5 | TGGGCAAGAAAGGCACAGAGACC |
| ARMS2-HTRA1-R5 | TGGGGCAGATGGAATTAAGGACA |
| ARMS2-HTRA1-F6 | CCGCAAGCAGTGGGGAAGTT |
| ARMS2-HTRA1-R6 | CCTCATCCGACCCCTCAAACCTC |
| ARMS2-HTRA1-F7 | TTGAGGGGGCTTATAGGTATTTGGAGTT |
| ARMS2-HTRA1-R7 | GGTGGCATCGGTCTCCGTATTC |
| ARMS2-HTRA1-F8 | CCCAACGGATGCACCAAGATTC |
| ARMS2-HTRA1-R8 | CCCGGTACCGCTGGTTCT |
| ARMS2-HTRA1-F9 | ACGCATGCCACCCACAACACTTTT |
| ARMS2-HTRA1-R9 | GCGGGATCTGCATGGCGACTCT |

purified using an ExoSAP-IT kit (GE Healthcare) and were sequenced using a BigDye Terminator version 3.1 sequencing kit (Invitrogen) and an ABI 3130 Genetic Analyzer.

Cell Culture—The mouse photoreceptor cell line, 661W, and the rat retinal ganglion cell line, RGC5, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in 5% CO₂. The human RPE cell line, ARPE19, was cultured in DMEM/F-12 containing 15% FBS at 37 °C in 5% CO₂.

Transcription Regulator Activity Assay—The *ARMS2* regulatory region and the *HTRA1* regulatory region were amplified and cloned into the pGL4.10 (Luc2) luciferase vector (Promega, WI) (Table 2). Insertion/deletion variants were also constructed using a KOD mutagenesis kit (Toyobo, Osaka, Japan). For the luciferase assays performed, 661W cells, RGC5 cells, and ARPE19 cells were seeded in 96-well plates (1 × 10⁴ cells/well) 24 h before transfection. Transfections were performed using Lipofectamine LTX with Plus reagent (Invitrogen). A firefly luciferase gene was integrated into a reporter vector to normalize the activity of both transcription regulators. Luciferase activity was detected using the Dual-Glo luciferase assay system (Promega) and a microplate reader (Plate Chameleon, Hidex, Turku, Finland).

Preparation of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) from Controls and AMD Patients—Human iPSCs were established by infecting circulating T cells obtained from the peripheral blood of human AMD patients with the Sendai virus as described previously (21, 22). Briefly, peripheral blood mononuclear cells were obtained from donors by the centrifugation