

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

乳幼児期に重篤な視覚障害をきたす難病の診療体制の確立に関する研究
難治性小児眼疾患症例の遺伝学的診断に関する研究

研究分担者 堀田喜裕（国立大学法人浜松医科大学眼科学講座・教授）
研究協力者 細野克博（国立大学法人浜松医科大学眼科学講座・助教）

研究要旨：

目的) 早期発症網膜ジストロフィ (EORD: early onset retinal dystrophy) 症例に対して全エクソーム解析による遺伝子解析を行い片親性ダイソミーを同定したので報告する。

症例・方法と結果)

症例1は14歳女児。生下時より眼振と運動発達遅滞が見られた。2歳時よりてんかんで治療を受け予防的に内服している。屈折異常を指摘されて眼科を受診し眼鏡を処方された。8歳時に紹介されて当院を受診。視力右(0.15)、左(0.3)、両眼とも-9.0Dの近視を認めた。光干渉断層計所見と網膜電図で消失型であることからEORDと診断した。症例2は31歳男性。7歳から羞明と夜盲を自覚し、10歳時に網膜色素変性と診断された。26歳から当院で経過観察している。両眼とも-5.0Dの近視を認めた。初診時の視力は右(0.07)、左(0.2)。高度の求心性視野狭窄、網膜に色素斑を認め、網膜電図は消失型であった。症例1は10歳時に両親の、症例2は本人と両親の同意を得て全エクソーム解析を行った。症例1はSRD5A3遺伝子の新規c.57G>C:p.(W19C)変異をホモ接合性で検出した。さらなる解析から第4染色体の母性イソダイソミーが示唆された。症例2はRPI遺伝子のc.4052_4053ins328:p.(Y1352Afs)変異をホモ接合性で検出した。同様に第8染色体の母性ダイソミーが示唆された。

考察) 眼科疾患の片親性ダイソミーの報告は極めて少ないが、遺伝カウンセリングには留意が必要と考えられた。

A. 研究目的

片親性ダイソミー (UPD: uniparental disomy) は、一対の相同染色体またはその一部のどちらも片方の親から由来する稀な染色体異常である。父親及び母親由来の場合があり、片親の相同染色体の両方が存在するヘテロダイソミーと片親の1本の染色体が重複するイソダイソミーに分けられる。UPDの主な原因はトリソミーレスキューと考えられている。潜性(劣性)遺伝病において片親が保因者の場合、片親性イソダイソミーにより、病原性のあるバリエントがホモ接合性になって発症することがある。

本研究は乳幼児期に重篤な視覚障害をきたす難病を対象として早期の発見と確実な鑑別診断(遺伝学的診断と臨床診断)の為に診療ガイドラインの作成を目指している。本年度は前年に引き続いて早期発症網膜ジストロフィ (EORD: early onset retinal dystrophy) 症例に対して次世代シーケンサー(NGS: next generation sequencer)を用いた遺伝子変異解析を実施してUPDを同定した。

B. 研究方法

(1) 症例

患者1は14歳女性、生後から眼振を認め、視力は不良であった。2歳時からてんかんの予防的治療を受けており、精神運動発達遅滞を伴っていた。彼女の家族には特記すべき眼疾患の既往は認めなかった。14歳時の矯正視力は両眼ともに(0.08)と不良で、高度の近視と乱視を合併していた。高度の視野狭窄と、網膜色素上皮の萎縮、網膜血管の狭細化を認め、光干渉断層計では、中心窩を除く ellipsoid Zone (EZ) の欠落を認めた。網膜電図は消失型であった。

患者2は31歳男性、7歳時から羞明及び夜盲を訴えた。特記すべき全身疾患の既往はなく、家族に同様の眼疾患の既往は認めなかった。26歳時の矯正視力は右眼(0.07)、左眼(0.2)と不良で、中等度の近視と乱視を合併していた。高度の視野狭窄、網膜血管の狭細化と骨小体様色素沈着を認め、黄斑を含む網膜の変性所見を認めた。光干渉断層計にて網膜の菲薄化を認め、EZは全く欠落しており、網膜電図は消失型であった。

検査前に遺伝子検査について十分な説明を行い、書面上でインフォームドコンセントを取得の上、患

者と両親から採血を行い、DNA を精製した。

(2) NGS を用いた遺伝子解析

使用機器は、浜松医科大学の先進機器共用推進部の次世代シーケンサーNextSeq 500 (イルミナ社)を使用した。サンプルライブラリーの作成は、SureSelect Human All Exon V6 kit(アジレント社)を使用した。NextSeq500用のシーケンス試薬はNextSeq 500/550 High Output Kit v2 300 cycle (イルミナ社)を使用した。

(3) 変異の抽出法

NGSより出力された大量のシーケンスデータは専用の解析パイプラインを用いて解析したり。

(4) 疾患原因変異の判定

原因変異を同定できた検体はサンガー法を用いて確認実験を行った。Alu挿入変異については、PCR法によって確認した²⁾。その後、家族検体を利用して分離解析を実施した。得られた変異が極めて稀な変異かどうか評価する為に、健常人中に検出される該当変異の頻度を既存のデータベースを用いて評価した。スプライス変異は、スプライス部位予測ソフトを用いてドナー/アクセプターサイトの影響を評価した。新規のミスセンス変異は、4種類のソフトウェアを用いた*in silico*解析を行いアミノ酸置換による病原性を評価した。

(倫理面への配慮)

当該研究に関する遺伝子及び末梢血の収集にあたり、成育医療研究センター、浜松医科大学の臨床研究倫理委員会(承認番号686、14-040)の承認を受けている。末梢血は、同意を得た患者または保護者より提供を受けた。採血前に本研究の研究内容、協力の任意性と撤回の自由、研究計画書等の開示、個人情報保護の保護、提供者の利益および不利益、解析結果の通知、研究成果の公表、研究終了後の試料等の取扱いの方針、知的財産権、費用、遺伝カウンセリング等について詳しく説明し、インフォームドコンセントを書面で得られたもののみを対象とした。本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)及び、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省)を遵守して行った。

C. 研究結果

症例1の遺伝子検査の結果、第4染色体全体のヘテロ接合性の喪失を認め、両親の解析結果から母性UPDが示唆された。代表的な血清タンパク質であるトランスフェリンの質量分析にて、患者血清ではグリコシル化の異常を検出し、*SRD5A3*-先天性グリコシル化異常症と診断した(Wada Y, Okamoto Nらとの共同研究)。

症例2の遺伝子検査の結果、第8染色体全体のヘテロ接合性の喪失を認め、両親の解析結果から母性

UPDが示唆された。PCR法によるAlu挿入変異の解析の結果、母親ではこの挿入バリエーションをヘテロ接合性で認め、症例2ではイソダイソミーの結果ホモ接合性であることを確認し、*RPI*関連網膜色素変性と診断した。

D. 考察

1992年にUPDによる杆体一色型色覚がはじめて報告されたが、これまでのUPDによる網膜ジストロフィの報告は9例と少ない。既報では第1染色体のUPDの報告が多く、第4染色体、第8染色体のUPDによる網膜ジストロフィの報告ははじめてである。また、わが国で最初のUPDによる網膜ジストロフィの報告であり、症例1はわが国で最初の*SRD5A3*-先天グリコシル化異常症の報告である。過去の報告を含めて検討したUPDによる網膜ジストロフィは、原因がUPDでない症例と臨床像に差はなく、臨床像だけでこの染色体異常を疑うことは難しいと考える。今回の検討からは小児期発症で屈折異常が大きい症例に留意が必要と考える。

E. 結論

第4番染色体の母性UPDによる*SRD5A3*-先天性グリコシル化異常症と第8染色体の母性UPDによる*RPI*関連網膜色素変性を経験した。UPDによる網膜ジストロフィの報告は極めて少なく、発症が稀であることを示唆している。遺伝相談をする上で、片親性ダイソミーは悩ましい問題であるが、EORDの遺伝カウンセリングにおいて留意すべき問題と考える。

参考文献

- 1) Hayashi T et al, Long-term observation of a Japanese mucopolidosis IV patient with a novel homozygous p.F313del variant of *MCOLN1*. *Am J Med Genet A*. 2020;182:1500-5.
- 2) Mizobuchi K et al. Genotype-phenotype correlations in *RPI*-associated retinal dystrophies: a multi-center cohort study in JAPAN. *J Clin Med*. 2021;10: 2265.

F. 研究発表

1. 論文発表

Tachibana N, Hosono K, Nomura S, Arai S, Torii K, Kurata K, Sato M, Shimakawa S, Azuma N, Ogata T, Wada Y, Okamoto N, Saito H, Nishina S, Hotta Y*. Maternal uniparental isodisomy of chromosome 4 and 8 in patients with retinal dystrophy: *SRD5A3*-congenital disorders of glycosylation and *RPI*-related retinitis pigmentosa. *Genes* 2022; 13: 359.

2. 学会発表

堀田喜裕、細野克博、倉田健太郎、彦谷明子、才津浩智、緒方勤、東範行、仁科幸子、佐藤美保. 第75回日本臨床眼科学会. 2021年10月31日.

G. 知的財産権の出願・登録状況: なし