

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

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）

研究要旨：

目的) 小児期の遺伝性網膜ジストロフィ (Inherited retinal dystrophy, IRD) に全エクソーム解析を行い原因となる変異を同定し、新知見を得たので報告する。

症例・方法) 症例 1 と症例 2 は、7 歳女兒と 9 歳男児の兄妹。妹は、7 歳で眼底異常を指摘され当科に初診した。兄は、妹が IRD と診断された後、9 歳で当科を初診した。兄妹を 9 年間経過観察した。兄妹に対して、Fundus autofluorescence imaging (FAF) 検査、optical coherence tomography (OCT) 検査を含む詳細な眼科検査を行った。遺伝学的検査については、検査前に十分な説明を行い、書面上でインフォームドコンセントを取得の上、患児と両親から採血を行い、全エクソーム解析を行った。

結果) 初診時の妹の矯正視力は右 (0.2)、左 (0.3)、兄の矯正視力は両眼 (0.3) であった。兄妹ともに両眼底に網膜血管の狭細化、網膜色素上皮の萎縮を認めた。兄妹は進行性の視野狭窄を示し、最終評価時の矯正視力は両眼とも (0.1) である。兄妹に、*NEK1* 遺伝子に複合ヘテロ接合性変異を検出し、2 つの変異は病原性可能性が高いと分類された。

考察) *NEK1* 遺伝子異常による骨格異常を伴わない IRD を世界ではじめて報告した。

A. 研究目的

小児期の遺伝性網膜ジストロフィ (Inherited retinal dystrophy, IRD) 症例に対し全エクソームシーケンス(whole exome sequencing, WES)を実施し、原因遺伝子変異を検討する。

B. 研究方法

(1) 症例

浜松医科大学医学部附属病院を受診した小児期発症の IRD を対象とした。以下の兄妹例について、原因遺伝子を同定した。

症例 1 と 2 は、7 歳女兒と 9 歳男児の兄妹。妹は 3 歳児健診で視力低下を指摘され近医に通院していたが、7 歳で眼底異常を指摘され当科に初診した。兄は学校健診で 6 歳時に視力低下を指摘され、妹が網膜色素変性 (retinitis pigmentosa, RP) と診断された後、9 歳で当科を初診した。兄妹を 9 年間経過観察した。兄妹に対して、視力、屈折、動的視野、細隙灯生体顕微鏡検査、Fundus autofluorescence imaging (FAF) 検査、optical coherence tomography (OCT) 検査を行った。

遺伝学的検査前に十分な説明を行い、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、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。

(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。保護者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、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、浜松医科大学の臨床研究倫理委員会(承認番号 14-040)の承認を受けている。末梢血は、患者または保護者より提供を受けた。採血前に倫理委員会に提出している項目にしたがって研究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

初診時の症例 1 (妹) の矯正視力は右 (0.2)、左

(0.3)、症例2(兄)の矯正視力は両眼(0.3)であった。屈折は、妹は-3.75-0.50x5 ODと-4.50-0.50x5 OS、兄は-0.50-1.50x40 ODと-1.00 OSであった。兄妹の眼底は、網膜血管の狭窄、視神経乳頭の傾斜、および広範な網膜色素上皮萎縮を示した。兄は12歳の頃から眼底に色素斑を数カ所認めるが、妹は現在に至るまで色素沈着を認めない。兄妹は進行性の視野狭窄を示し、最終評価時の矯正視力は両眼とも(0.1)である。OCTでは、黄斑部外側にまだら状のellipsoid bandがあり、その断端は、FAFの過蛍光部位に一致していた。経過観察期間中、兄妹は眼底所見、視野、OCT、FAFは同様の臨床経過をたどった。International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV)に基づく網膜電図では、消失パターンを示し、患者はRPと診断された。小児科医による診察では、身体的な問題は指摘されなかった。7歳時の妹と9歳時の兄の身長は、それぞれ118 cmと125 cmで、日本人の正常範囲を逸脱していなかった。兄妹はやや身長が低い、現在まで身長の伸びに異常は認められていない。画像による詳細な骨格検査では、異常を認めなかった。兄妹には、*NEK1* 遺伝子に複合ヘテロ接合性変異 c.240G>A; p.(M80I)と c.634\_639dup;p.(V212\_L213dup)を検出した。c.240G>A p.(M80I)は父親に、c.634\_639dup;p.(V212\_L213dup)は母親に認められた。American College of Medical Geneticsのガイドラインによると、二つのバリエーションは病原性の可能性が高いと分類された。

#### D. 考察

軸性脊椎骨幹端異形成症(axial spondylometaphyseal dysplasia, axial SMD)は、骨格と四肢骨近位部の骨幹端に異形成を認める骨系統疾患である。生後発育不全、幼児期の手足の短縮、低身長、小児期後期の短い体幹等を示し、気道感染症に対する感受性が高まる可能性がある。また、Axial SMDにIRDが合併することが知られている。

*C21ORF2* 遺伝子(603191, 21q22)は、axial SMDの原因遺伝子として報告されている。*C21ORF2* 遺伝子変異によるaxial IRDにはIRDが合併することが知られ、IRD単独例の報告もある。*NEK1* 遺伝子(604588, 4q33)は、axial SMDと短肋骨多指症(short rib polydactyly, SRPS)の原因遺伝子として知られている。SRPSは、重度の骨格異形成および内臓機能障害と関連しており、周産期死亡につながることが多い。*NEK1* 遺伝子変異によるaxial SMDは、重度のIRDと関連していると報告されている。しかし、今回経験した症例1と2の兄妹は、全身的な異常を合併せず、*NEK1* 遺伝子変異

によって引き起こされるIRDという新しい表現型を示していると考えられる。

#### E. 結論

全身異常を伴わない*NEK1* 遺伝子異常によるIRDを経験した。遺伝相談をする上で、表現型の多様性は悩ましい問題であるが、小児期IRDの遺伝カウンセリングにおいて留意すべき重要な問題と考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Itai T, Wang Z, Nishimura G, Ohashi H, Guo L, Wakano Y, Sugiura T, Hayakawa H, Okada M, Saisu T, Kitta A, Doi H, Kurosawa K, Hotta Y, Hosono K, Sato M, Shimizu K, Takikawa K, Watanabe S, Ikeda N, Suzuki M, Fujita A, Uchiyama Y, Tsuchida N, Miyatake S, Miyake N, Matsumoto N, Ikegawa S. De novo heterozygous variants in *KIF5B* cause kyphomelic dysplasia. *Clin Genet*. 2022 Jul;102(1):3-11. doi: 10.1111/cge.14133.

Hikoya A, Hosono K, Ono K, Arai S, Tachibana N, Kurata K, Torii K, Sato M, Saito H, Ogata T, Hotta Y. A case of siblings with juvenile retinitis pigmentosa associated with *NEK1* gene variants. *Ophthalmic Genet*. 2022 Nov 7;1-6. doi: 10.1080/13816810.2022.2141788.

Sano Y, Koyanagi Y, Wong JH, Murakami Y, Fujiwara K, Endo M, Aoi T, Hashimoto K, Nakazawa T, Wada Y, Ueno S, Gao D, Murakami A, Hotta Y, Ikeda Y, Nishiguchi KM, Momozawa Y, Sonoda KH, Akiyama M, Fujimoto A. Likely pathogenic structural variants in genetically unsolved patients with retinitis pigmentosa revealed by long-read sequencing. *J Med Genet*. 2022 Nov;59(11):1133-1138. doi: 10.1136/jmedgenet-2022-108428. Epub 2022 Jun 15.

Suga A, Yoshitake K, Minematsu N, Tsunoda K, Fujinami K, Miyake Y, Kuniyoshi K, Hayashi T, Mizobuchi K, Ueno S, Terasaki H, Kominami T, Nao-I N, Mawatari G, Mizota A, Shinoda K, Kondo M, Kato K, Sekiryu T, Nakamura M, Kusuhara S, Yamamoto H, Yamamoto S, Mochizuki K, Kondo H, Matsushita I, Kameya S, Fukuchi T, Hatase T, Horiguchi M, Shimada Y, Tanikawa A, Yamamoto S, Miura G, Ito N, Murakami A, Fujimaki T, Hotta Y, Tanaka K, Iwata T. Genetic characterization of 1210 Japanese pedigrees with inherited retinal diseases by whole-exome sequencing. *Hum Mutat*. 2022 Dec;43(12):2251-2264. doi: 10.1002/humu.24492. Epub 2022 Nov 7.

##### 2. 学会発表

堀田喜裕. 第126回日本眼科学会 特別講演ゲノム医療をめざして～眼遺伝学の研究と臨床～大阪. 2022年4月15日.