

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
総合分担研究報告書

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（所属機関・職名 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、新しい知見を得たので報告する。
症例・方法) 症例 1 は 14 歳女兒、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。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 (Retinitis pigmentosa, RP) と診断された。26 歳から当院で経過観察しているが、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た。患者 3 と 4 は、14 歳女兒と 16 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 RP と診断された後、9 歳で当科を初診した。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、網膜色調異常網膜色素上皮の萎縮を認めた。対象症例に対して、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、全エクソーム解析を行った。
結果) 症例 1 は *SRD5A3* 遺伝子変異をホモ接合性で同定し、第 4 染色体の母性 Uniparental disomy (UPD) を検出した。症例 2 は *RPI* 遺伝子変異をホモ接合性で同定し、第 8 染色体の母性 UPD を検出した。症例 3 と 4 は、*NEK1* 遺伝子に複合ヘテロ接合性変異を検出した。
考察) 小児期の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

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シング(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

国内の 2 施設を受診した小児期発症の IRD を対象とした。以下の 4 症例について、原因遺伝子を同定し、新たな知見を得た。

患者 1 は 14 歳女兒、。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。家族には特記すべき眼疾患の既往は認めなかった。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 IRD と診断した。

患者 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 (Retinitis pigmentosa, RP) と診断された。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 歳から当院で経過観察しているが、矯正視力は右 (0.07)、左(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、ellipsoid zone (EZ)は全く欠落しており、網膜電図は消失型であった。

症例 3 と 4 は、14 歳女兒と 16 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 RP と診断された後、9 歳で当科を初診した。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、網膜色調異常網膜色素上皮の萎縮を認め、光干渉断層計画像では EZ が不鮮明で、網膜電図では ab 波とも桿体錐体混合応答で著明な減弱を示した。両親は近親婚ではない。兄妹ともに現在矯正視力は両眼とも(0.1) で、求心性視野狭窄が進行して

いる。対象とした症例に対して、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、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。Alu挿入変異については、PCR法によって確認した。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、*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。採血前に倫理委員会に提出している通り、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

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 Uniparental disomy (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。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、第8染色体の母性 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ントをヘテロ接合性で認め、症例2では UPD の結果ホモ接合性であることを確認し、*RPI* 関連 RP と診断した。

症例3と4の兄妹には、*NEK1* 遺伝子に原因が疑われる複合ヘテロ接合性変異 c.240 G>A; p.(M80I) と c.634_639dup;p.(V212_L213dup)を検出した。全身的な精査をしたが、骨格の異常は認められなかった。

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IRDの報告は9例と少ない。第4染色体、第8染色体のUPDによるIRDの報告ははじめてである。また、わが国で最初のUPDによるIRDの報告であり、症例1はわが国で最初の*SRD5A3*-先天性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。症例3と4は、*NEK1* 遺伝子異常による骨格異常を伴わないIRDは初めての報告である。

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 RP、全身異常を伴わない*NEK1* 遺伝子異常による RP を経験した。遺伝相談をする上で、UPDや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問題と考える。

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, Saitsu 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.

Hikoya A, Hosono K, Ono K, Arai S, Tachibana N, Kurata K, Torii K, Sato M, Saitsu 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.

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.

堀田喜裕. 第 126 回日本眼科学会
G. 知的財産権の出願・登録状況: なし