

## 遺伝性網膜変性の分子病態の解明

●和田裕子

東北大学眼科

### 〈研究の目的と進め方〉

網膜色素変性は進行性の夜盲、視力低下、視野狭窄を主症状とする疾患で、先天盲の第一位を占めている。原因不明であった本疾患も1990年代より、眼科学の分野においても分子生物学が急速に進歩し、遺伝子レベルでの原因の解明が進められているが、まだその一部が解明されたに過ぎない。将来本疾患に対して、有効な治療法が開発されるためには遺伝子レベルでの病因の解明が必須である。さらに、網膜色素変性は、重症例、軽症例、遺伝子異常を持っているにもかかわらず無発症例が存在し、表現型が非常に多彩である。遺伝子異常に加え、表現型の決定には、他の遺伝子の関与、さらに環境因子の存在を我々は着目している。我々は東北大学網膜変性グループを結成し、は、1500以上にわたる遺伝性網膜変性疾患の患者のDNAおよび臨床データを保存しているので、各遺伝子形式ごとに分類し、現在まで報告されている全ての原因遺伝子をスクリーニングし、遺伝子異常と臨床像について詳細に検討する。新しい変異と表現型の関連性さらに、遺伝子異常の頻度、種類、人種差を明らかにする。特に日本人に高頻度に認められる原因遺伝子異常を検討し、治療法開発への架け橋とする。また他の遺伝子の関与を検索する事を目的とし、FSCN2遺伝子、PRPF31遺伝子異常をもつ網膜色素変性家系は無発症例が存在するためそれぞれの発症例、無発症例患者から採血し、RNAを抽出したのちマイクロアレイによる遺伝子発現を解析し、原因遺伝子に加え重症度を左右する遺伝子を決定する。臨床像と遺伝子異常の関連をデータベース化し、遺伝子異常による重症度分類、治療薬の選択、遺伝カウンセリングなど、得られた研究結果を網膜色素変性患者およびその家族に還元する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

1. 網膜色素変性患者、類縁疾患患者からの遺伝子（ゲノムDNA）の精製  
東北大学病院倫理委員会の承認をえた同意書を用いて、インフォームドコンセントを得た後、網膜色素変性、および類縁疾患患者から採血し、白血球分離したのち、全自動核酸抽出装置を用いて安全かつ迅速に白血球中のゲノムDNAを分離、精製する。患者のプライバシーは網膜変性グループを結成し厳重に管理している。
2. 遺伝形式によるスクリーニングプレートの作成
3. 原因遺伝子のプライマーのデザイン、PCR (polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖増幅) 法の条件設定
4. DNA塩基配列の決定  
PCR産物をアガロースゲルで確認後、ABI3100を用いてダイレクトシークエンスを行い、塩基配列の決定を行う。得られた塩基配列は、変異があるか否かをSequence Navigatorを用いて、解析する。変異を確認した症例では家系調査を行い、表現型と連鎖するか否かを確認する。さらに遺伝子異常がひきおこす臨床像について詳細に検討する。眼科的検査は、視力、色覚、精密細線灯検査、

眼底検査、網膜電位図、視野検査を行う。

### 〈研究期間の成果〉

日本人常染色体優性網膜色素変性96家系に対してすべての原因遺伝子を用いてスクリーニングし日本人患者における遺伝子変異の種類と頻度を同定した。海外ではロドプシン遺伝子変異は常染色体優性網膜色素変性の25%に認められるが日本人では約4%で非常に低頻度である。RP1遺伝子変異も海外では約8%に認められるが日本人では1%で低頻度である。さらに海外でのmutational hot spotsであるロドプシン遺伝子Pro23His、Pro347Leu変異、RP1遺伝子のArg677X変異、IMPDH1遺伝子のAsp226Asn変異は日本人患者ではhot spotsにならないことを証明した。PRPF31, Peripherin/RDS遺伝子、HPRP3遺伝子、IMPDH1遺伝子はほぼ海外と同頻度である。一方、FSCN2遺伝子208deG変異は日本人患者のみに認められ、日本人固有の遺伝子異常であることを証明した。以上のことより、遺伝子変異には人種差が大きく関与し、日本人は固有の遺伝子異常をもつ可能性を示した。我々の遺伝子変異解析の結果と海外からの遺伝子変異の報告をデータベース化し、日本人患者の主要な遺伝子変異を簡易的にかつ効率的に解析できるシステムを構築した。これにより、一日で解析すべき場所をスクリーニングすることを可能にした。眼底白点症、小口病、クリスタリン網膜症、Stargardt病、若年性網膜分離症はほぼ100%に原因遺伝子変異を確認して、遺伝子解析が有効である事を証明した。

マイクロアレイを用いて、重症度の関与する遺伝子を検討した結果、無発症例1例、発症例4例で2倍以上発現量に差が生じた遺伝子は計15遺伝子、発症例で2倍以上発現が上昇していた遺伝子で9遺伝子、無発症例で2倍以上発現が上昇していた遺伝子は6遺伝子であった。発現量の差が認められた遺伝子は転写因子、ミトコンドリアのエネルギー代謝、血管新生、酸素輸送、グルタミン酸代謝、アポトーシス、細胞の構造、分化に関与する遺伝子である。とくにグルタミン酸代謝、アポトーシス、細胞の構造、分化に関与する遺伝子の発現量のさが大きく、表現型の多様性には原因遺伝子異常のみならず、他の遺伝子の関与が関わっていることが示唆された。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

現在網膜色素変性に関する遺伝子異常の検索は欧米先進国を中心に活発に行われており、新しい遺伝子異常の発見および遺伝子型と表現型の関連に関する知見の集積が行われている段階である。本研究は世界の研究の流れの中にあり、その発展の一翼を担い、特に日本人など黄色人種、東洋人における遺伝子異常の特徴をさぐる重要な位置を占める。本研究により我々は欧米での研究知見と東洋人との間の人種差による遺伝子異常や表現型の特徴の差の有無を検索できるという立場にある。これまで我々が行ってきた研究成果は第12回国際網膜変性シンポジウム(2004年8月、オーストラリア)にて発表し各国

研究者と有益な討論を行ったのみでなく、新たな遺伝子異常と臨床像の関連については、第103回日本眼科学会総会、第53回臨床眼科学会、第9回国際網膜変性シンポジウム（アメリカ）、第54回臨床眼科学会、遺伝子診断と遺伝子治療シンポジウム、第55回網膜色素変性に関する話題、第107回日本眼科学会総会シンポジウム、第56回臨床眼科学会シンポジウム、ARVO（アメリカ）で発表した。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

網膜色素変性に全身疾患を合併するUsher症候群、Bardet-Biedl症候群、Alstrom症候群は疾患頻度が低く、さらに原因遺伝子が多数に及ぶためスクリーニングを行い遺伝子変異を検索する事は不可能であった。

#### 〈今後の課題〉

今後は、データベースをもとに日本人患者の遺伝子変異を効率的にかつ迅速にスクリーニングを行うDNAチップの開発を行う。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

Sato H, Wada Y, Abe T, Kawamura M, Wakusawa R, Tamai M. Retinitis pigmentosa associated with ectopia lentis. Arch Ophthalmol.120: 852-854,2002.

Wada Y, Abe T, Sato H, Tamai M. Clinical variability of Japanese patients with mutations of the RDH5 gene. In "Retinal Degenerative Diseases and Experimental Therapy", ed, J.Hollyfield, R.Anderson and M.LaVail. Plenum Publishing Corporation, New York 23-28,2002

Wada Y, Abe T, Takeshita T, Sato T, Tamai M. Mutation of Human Retinal fascin gene (FSCN2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci42: 2395-2410,2001.

Wada Y, Abe T, Sato H, Tamai M. A Novel Gly35Ser Mutation in the RDH5 Gene in a Japanese Family with Fundus albipunctatus Associated with Cone Dystrophy. Arch Ophthalmol.119: 1059-1063,2001.

Suuki T, Takahashi K, Kuwahara S, Takahashi K, Wada Y, Tamai M. A novel (Pro79Thr) mutation in the FKHL7 gene in a Japanese family with Axenfeld-Rieger syndrome. Am J Ophthalmol. 2001;132:572-5.

Wada Y, Abe T, Fuse N, Tamai M. A Frequent 1085delC/insGAAG Mutations in the RDH5 Gene of the Japanese Patients with Fundus Albipunctatus. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci41: 1894-1897,2000

Wada Y, Nakazawa M, Abe T, Tamai M. A new Leu253Arg mutation in the RP2 gene in a Japanese family with X-linked retinitis pigmentosa. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci41: 290-293,2000.

Abe T, Tsuda T, Yoshida M, Wada Y, Kano T, Itoyama Y, Tamai M. Macular degeneration associated with aberrant expansion of trinucleotide repeat of the SCA7 gene in 2 Japanese families. Arch Ophthalmol.118: 1415-1421,2000.

Abe T, Yoshida M, Tomita H, Kano T, Nakagawa Y, Sato

M, Wada Y, Fuse N, Yamada T, Tamai M. Functional analysis after auto iris pigment epithelial cell transplantation in patients with age-related macular degeneration. Tohoku J Exp.Med1189: 295-305,2000.

Fuse N, Suzuki T, Wada Y, Yoshida M, Shimura M, Abe T, Nakazawa M, Tamai M. Molecular Genetic analysis of ABCR gene in Japanese Dry form age related macular degeneration. Jpn Ophthalmol.44: 245-249,2000