

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Rare / Intractable Disease Research
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Phenotype-genotype analysis and investigation of disease-causing mechanism for hereditary retinal diseases
- 研究開発担当者
所属 役職 氏名： (日本語) 独立行政法人 国立病院機構東京医療センター
臨床研究センター 分子細胞生物学研究部 部長 岩田 岳
(英語) National Institute of Sensory Organs, Tokyo Medical Center,
National Hospital Organization, Director, Takeshi Iwata
- 実施期間： 平成27年4月1日 ～ 平成28年3月31日
- 分担研究
開発課題名： (日本語) 遺伝性網脈絡膜疾患の生体試料の収集・管理
(英語) Genome Analysis and Biobank Development for Hereditary Retinal Diseases in Japanese Population
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 国立遺伝学研究所/生命情報・DDBJ研究センター、教授、池尾 一穂
(英語) National Institute of Genetics, ROIS, Professor, Ikeo Kazuho
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 藤田保健衛生大学医学部 眼科学教室、教授、堀口 正之
(英語) Department of ophthalmology, Fujita Health University, Professor,
Masayuki Horiguchi
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 千葉大学大学院医学研究院眼科学、教授、山本 修一
(英語) Department of ophthalmology, Chiba University, Professor,
Shuich Yamamoto
- 研究開発分担者
所属 役職 氏名： (日本語) 名古屋大学大学院医学系研究科 眼科学・感覚器障害制御学教室、
教授、寺崎 浩子

所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology Protective care for Sensory Disorders
Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor,
Hiroko Terasaki

研究開発分担者 (日本語) J A三重厚生連 松阪中央総合病院 眼科、医師、久瀬 真奈美
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Matsusaka Central General Hospital,
Doctor, Manami Kuze

研究開発分担者 (日本語) 帝京大学医学部 眼科学講座、教授、溝田 淳
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Teikyo University School of Medicine,
Professor, Tatushi Mizota

研究開発分担者 (日本語) 宮崎大学医学部感覚運動医学講座 眼科学分野、教授、直井 信久
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, University of
Miyazaki, Professor, Nobuhisa Naoi

研究開発分担者 (日本語) 獨協医科大学越谷病院、教授、町田 繁樹
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Dokkyo Koshigaya Hospital, Professor,
Shigeki Machida

研究開発分担者 (日本語) 藤田保健衛生大学 坂文種報徳會病院、准教授、島田 佳明
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Banbuntane Houtokukai Hospital,
Associate professor, Yoshiaki Shimada

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学大学院医学研究科外科系講座眼科学分野、教授、中村 誠
所属 役職 氏名 : (英 語) Kobe University Graduate School of Medicine, Department of
Ophthalmology, Professor, Makoto Nakamura

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科 医用工学講座 感覚機能形成学教室、
教授、不二門 尚
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Applied Visual Science, Osaka University Graduate
School of Medicine, Professor, Takashi Fujikado

研究開発分担者 (日本語) 浜松医科大学 眼科学教室、教授、堀田 喜裕
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Hamamatsu University School of Medicine,
Professor Yoshihiro Hotta

研究開発分担者 (日本語) 三重大学大学院医学系研究科臨床医学系講座眼科学、教授、近藤 峰生
所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Mie University Graduate School of
Medicine, Professor, Mineo Kondo

- 研究開発分担者 (日本語) 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 視覚研究部、部長、
角田 和繁
- 所属 役職 氏名 : (英 語) National Institute of Sensory Organs, Tokyo Medical Center,
National Hospital Organization,
Director of Division for Vision Research
Kazushige Tsunoda
- 研究開発分担者 (日本語) 近畿大学医学部眼科学教室、講師、國吉 一樹
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Kindai University Faculty of Medicine,
Assistant Professor, Kazuki Kuniyoshi
- 研究開発分担者 (日本語) 埼玉医科大学医学部 眼科学講座、教授、篠田 啓
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Saitama Medical University,
Kei Shinoda
- 研究開発分担者 (日本語) 東京慈恵会医科大学 眼科学講座、准教授、林 孝彰
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, The Jikei University School of Medicine,
Associate Professor, Takaaki Hayashi
- 研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 網膜再生医療研究開発
プロジェクト、プロジェクトリーダー、高橋 政代
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Laboratory for Retinal Regeneration Riken Center for Developmental
Biology, Project Leader, Masayo Takahashi
- 研究開発分担者 (日本語) 岐阜大学医学部 眼科学教室、准教授、望月 清文
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Gifu University School of Medicine,
Associate Professor, Kiyofumi Modhiduki
- 研究開発分担者 (日本語) 順天堂大学大学院医学研究科眼科学、教授、村上 晶
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Juntendo Hospital, Professor,
Akira Murakami
- 研究開発分担者 (日本語) 産業医科大学 眼科学教室、教授、近藤 寛之
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, University of Occupational and
Environmental Health, Professor, Kondo Hiroyuki.
- 研究開発分担者 (日本語) 日本医科大学千葉北総病院 眼科、教授、亀谷 修平
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Ophthalmology, Nippon Medical School Chiba Hokusoh
Hospital, Professor, Shuhei Kameya

研究開発分担者 (日本語) 弘前大学医学部 眼科学教室、教授、中澤 満

所属 役職 氏名: (英語) Department of Ophthalmology, Hirosaki University School of Medicine,
Professor, Mitsuru Nakazawa

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

ヒトは情報の約8割を視覚情報に頼っており、これが障害されると通常の生活に著しい影響を及ぼす。特に光を感じる視細胞が存在する網膜への障害は重篤な視機能低下をもたらす。視細胞が障害される遺伝性網脈絡膜疾患の多くは希少疾患であり、進行を遅延あるいは治療することは困難である。遺伝性網脈絡膜疾患には網膜色素変性、黄斑ジストロフィー、錐体杆体ジストロフィー、先天夜盲症などが含まれ、より正確な診断には高度な電気生理学的な手法を必要とする。遺伝学的には優性、劣性、X連鎖性、孤発、ダイジェニックなど様々な形式の遺伝子変異が報告されている。すでに欧米での研究によって256の原因遺伝子が明らかにされているが日本での解析はほとんど進んでいない。また、それぞれの原因遺伝子についても発症機序は十分に解明されておらず、治療には結びついていない。本研究はこのような状況下において、国内の推定5万人の患者について、全国の眼科施設と連携し、より正確な臨床診断と血液・唾液検体を収集、全エクソーム解析と全ゲノム解析、さらにiPS細胞などの生体試料バンクの設立を目的とする。遺伝性網脈絡膜疾患についてこのようなオールジャパン体制の試みは初めてであり、欧米との20年の遅れを取り戻すために、国内におけるこの分野の活性化をめざす。本研究では精度の高い臨床診断と症例情報のデータベース化、全エクソーム・全ゲノム解析による原因遺伝子の解明、新規遺伝子の発症機序の解明、ゲノム編集によるノックイン動物モデルの作製、患者DNA・患者iPS細胞の生体試料バンクの構築、さらに遺伝子別の治療法の開発している。

- ① 遺伝子が特定されていない遺伝性網脈絡膜疾患患者において、ご本人およびできる限りご家族の臨床データを収集し、ご本人およびご家族の生体試料を収集した。
- ② 全視野網膜電図、黄斑局所網膜電図、およびパターン網膜電図など、網脈絡膜疾患の他覚的診断や機能評価に有用な視覚生理学的検査を用いた各種疾患の機能分析を行っている。
- ③ パターン刺激が必要な多局所網膜電図、およびパターン網膜電図などにおいて、新しい刺激モニターを用いた記録方法の評価と臨床応用の開発を進めている。
- ④ RETeval®という、手持ち型の新しい網膜電図(ERG)記録装置を用いて乳幼児や周術期においてもERG記録が行え、臨床研究上の有用性を確認した。

<先天停在夜盲不全型の遺伝子型と表現型に関する研究>

先天停在性夜盲の不全型 (incomplete-type congenital stationary night blindness, iCSNB) は、比較的稀な非進行性の遺伝性網膜疾患であり、生来の低視力と暗所視機能の低下を特徴とする。原因遺伝子としては、これまで2つの原因遺伝子 (CABP4 と CACNA1F) が報告されている。今回の研究期間内で、不全型 CSNB 12家系 14症例の臨床データと DNA が得られた。14症例の年齢は 8-74歳 (平均 34.9歳) であり、低視力、羞明、または夜盲を主訴に病院を受診していた。矯正視力は 0.3-1.2 と比較的良好であった。暗順応後に強い光刺激を用いて記録する全視野 ERG は全例“陰性型”を示し、視細胞から双極細胞

への伝達に異常があることが示唆された。ERGの杆体応答と錐体応答は中等度に減弱していた。14症例中9症例で全エクソーム解析が行われ、このうち6症例に*CACNA1F*遺伝子に病原性のある変異が検出された。日本人の不全型CSNBは、多くの症例で*CACNA1F*の遺伝子変異が原因であることが判明した。

<本人における常染色体劣性ベストロフィノパチーの臨床像と遺伝子変異>

Autosomal recessive bestrophinopathy (ARB)は*BEST1*の遺伝子異常による常染色体劣性遺伝の疾患である。以前から*BEST1*の遺伝子異常による優性遺伝の疾患として報告されている特徴的な黄斑変性を示すベスト病とは異なる疾患として2009年に報告された疾患である。眼底所見が多彩で診断が難しく確定診断には遺伝子検査が必要なため、今まで日本で報告されていなかった。今回研究グループの3施設でARBと診断された7家系9症例の眼科所見と遺伝子変異について、*American Journal of Ophthalmology* に論文にて報告した。

<①眼科臨床研究および症例登録システムの運用、②オカルト黄斑ジストロフィを始めとした代表的疾患の患者データバンクの構築および遺伝学的原因の解明>

① 平成26年度から28年度にかけて、遺伝網膜・視神経疾患の全国的な臨床研究チームをまとめ、大規模な疾患コホートの作成に勤めた。

平成28年度10月までに、全国の大学および研究機関26施設が臨床情報提供施設（分担施設）となった。また、研究の対象となる眼科疾患を27疾患56分類に細分類し、それぞれについて疾患データの評価、管理を行う「疾患チームリーダー」を設定した。これにより、各疾患について、検体収集状況、臨床データの解析状況、およびエクソーム解析を中心とした遺伝子解析状況について、円滑に研究が遂行できるように各チームリーダーと緊密に連絡を取ることができた。チームリーダー会議は定期的で開催され、これによって、各分担研究者が症例登録から候補遺伝子の結果提示までを継時的にフォローできる体制造りが完成した。

さらに平成28年度5月には、国際間共同研究が可能な英語版新システムが稼働した。これによって、疾患名、家系番号等によって症例を選択できるのみならず、特定の遺伝子や遺伝子変異を持つ家系をコHORT内から抽出することが可能なり、今後、遺伝子型を基準に行われる臨床治験に向けて応用可能なコHORTの作成が実現されることとなった。平成28年3月末の時点で、1009家系、1634症例が登録されており、国内の遺伝性網膜疾患遺伝学的研究における最大の疾患コHORTが確立された。

② 分担研究者の一施設として、オカルト黄斑ジストロフィ、スターガルト病、錐体杆体ジストロフィ等の疾患チームリーダーとして、症例登録を積極的に呼びかけ、各疾患における国内最大のコHORTを作成することができた（オカルト黄斑ジストロフィ153症例、スターガルト病100症例、錐体杆体ジストロフィ症231例）。

特にオカルト黄斑ジストロフィ（三宅病）については、世界最大数の患者を含むコHORTであり、平成28年には他施設共同研究に基づく遺伝学的解析結果より本疾患の病態に基づく疾患分類、疾患定義を提唱し、国際誌において認められることとなった（K Fujinami, S Kameya, et al., 'Novel RP1L1 Variants and Genotype-Photoreceptor Microstructural Phenotype Associa

<網膜ジストロフィに対する遺伝子解析>

- 1) 網膜色素変性は、遺伝的異質性をもつ網膜ジストロフィの1つである。常染色体優性網膜色素変性の10家系に対し、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析法を行い、2家系で *RHO* 遺伝子変異 (p. W126L, p. A346P) を突き止め p. W126L は新規変異であった。また、p. W126L 変異をもつ変異ロドプシン立体構造について検討した結果、特に明順応下で立体構造転移を示しロドプシン機能障害を引き起こすと考えられた。
- 2) 常染色体劣性網膜色素変性で頻度の高い遺伝子変異を探索する目的で、30例・発端者に対して、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析を行った。その結果、4例で *CNGA1* 変異が検出された。さらに69例で *CNGA1* 遺伝子解析を行ったところ1例で遺伝子変異が検出され、本研究から常染色体劣性網膜色素変性の5.1% (5/99) が *CNGA1* 遺伝子異常によることが示された。
- 3) レーベル先天黒内障の遺伝学的特徴を明らかにする目的で、5例・発端者に対して、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析を行った結果、2例で *RPE65* 変異が検出された。症例1で複合ヘテロ接合変異 (p. H59Q and p. D62X) が、症例2でホモ接合変異 (p. R515W) が検出された。本研究で、3種類の *RPE65* 変異が日本人レーベル先天黒内障の原因となっていることを明らかにした。
- 4) 両親がいとこ婚である杆体一色覚の姉弟 (姉が完全型、弟が不全型) に対して、次世代シーケンサを用いたエクソーム解析を行った結果、両者で *PDE6C* 遺伝子に新規ホモ接合変異 (p. E591K) が検出された。In silico 解析で本変異を有するホスホジエステラーゼ6Cの構造変化が起きその酵素活性を減弱させている可能性が示唆された。
- 5) Best病は、初期の眼底所見が特徴的で黄斑中心部に目玉焼きの黄身に類似した病変が現れることから卵黄状黄斑ジストロフィとも呼ばれ、常染色体優性遺伝形式をとる。確定診断には、眼球電図検査によるL/D比低下の検出が重要である。網膜電図における振幅は正常であることが多い。Best病と診断された16例に対して、その原因遺伝子である *BEST1* 遺伝子の変異解析を行い、13例で12種類の遺伝子変異 (p. T2A, p. S7N, p. R25W, p. F80L, p. V81M, p. A195V, p. R218H, p. G222E, p. V242M, p. D304del, p. E306D, p. P346H) が確認された。このうち2つが新規変異 (p. S7N と p. P346H) であった。今回検出された大部分の変異がすでに欧米から報告されている変異とオーバーラップしていた。日本人Best病においても *BEST1* 遺伝子変異が主要原因であることを明らかにした。

これらの研究成果は、診療の質を高めるだけでなく、将来の遺伝子補充療法や再生医療など次世代治療の基盤研究に向け有意義なものになると確信する。

<日本人レーベル先天盲患者における原因遺伝子検索>

岩田岳部長 (東京医療センター感覚器センター分子細胞生物学研究部)、そして全研究分担者ともに日本人のレーベル先天盲48家系132例の血液検体を採取し、次世代シーケンスによる全エクソンのゲノ

ム解析を行った。現在までに 20 家系のシーケンス解析が終了した。その結果, *RPE65* (1 家系), *RPGR* (1 家系), *RDH12* (2 家系), *PDE6C* (1 家系), *CRB1* (2 家系), *NMNAT1* (1 家系), *TULP1* (1 家系), *RPE65* (1 家系) の各遺伝子に病的変異が見つかった。他の 10 家系は、既知の遺伝子に病的変異がみられなかった。今回検索したレーベル先天盲 20 家系では既知の遺伝子に変異が見つかったものは 50% であり、欧米の 70% (Neveling et al., *Methods Mol Biol* 2013) に比較して低い。このことは、本邦を含む黄色人種におけるレーベル先天盲の原因遺伝子は欧米のそれらと種類や頻度が異なる可能性を示している。

<コロイデミア、クリスタリン網膜症、常染色体優性視神経萎縮の症例情報の収集、臨床病型の解析>

これまでに当該 3 疾患において全国各地からデータベースへの登録があった。クリスタリン網膜症では 17 家系 19 症例の登録があった。12 家系でエクソーム解析が行われた。その結果これまでに日本人や中国人、および欧米諸国に在住するアジア系人種で非常に多く報告されている c. 802-8_810del17insGC 変異が 8 家系で認められた。最新の報告によるとこの変異は中国では 8200~1040 世代前に発生し、日本では 1100~300 世代前に発生したと考えられると報告されている。この変異に関してはこのように、人種の形成、日本人のルーツを解明する変異としても用いることが可能と考えられており、非常に有意義である。本研究においてもエクソーム家系が終了した家系中 66.7% で同変異のホモ変異により発症していることが確認され、日本人のクリスタリン網膜症の主要原因となっていることが確認された。患者の受診地は東京、名古屋、岐阜であった。今後症例登録数の増加に伴って、患者分布の地理的構成が明らかになれば、創始者効果の詳細が明らかとなる可能性がある。また 1 家系では c. 802-8_810del17insGC 変異と新規変異である p. S461F 変異のコンパウンドヘテロ変異を認めた。また別の 1 家系では新規変異である p. F460L 変異のホモ変異を認めた。これらの遺伝子データと臨床データをデータベースにて突き合わせることにより、クリスタリン網膜症の原因遺伝子である *CYP4V2* 遺伝子の詳細な機能を明らかにできる可能性がある。

コロイデミアでは 7 家系 14 症例の登録があった。2 家系でエクソーム解析が行われた。これらのうち 1 例でコロイデミアの原因遺伝子である *CHM* 遺伝子に既知の変異である p. W47X 変異を認めた。他の 1 例では *CHM* 遺伝子異常を認めなかった。コロイデミアとして登録されている症例以外で、choroidal dystrophy として登録されている症例 1 例と分類不能の症例 1 例に既知のコロイデミアの原因遺伝子が発見された。これらは両者ともスプライスサイト変異であり c. 820-1G>A と c. 49+1G>C であった。これらの症例は臨床的にコロイデミアとして診断されにくい病態であったが、*CHM* 遺伝子異常によるコロイデミアの臨床スペクトラムと考えられた。この成果は今後の臨床診断に有用であると考えられた。

常染色体優性視神経萎縮 (ADOA) では 19 家系 35 症例の登録があった。6 家系でエクソーム解析が行われた。これらのうち 1 家系で ADOA の原因遺伝子である *OPA1* 遺伝子に既知のアミノ酸置換変異をみとめ、1 家系に既知のナンセンス変異を認めた。また 1 家系では新規の 13 塩基欠損変異を認めた。分担研究者である林孝彰講師 (東京慈恵会医科大学・眼科学教室) らのグループによる Tailed PCR 法による *OPA1* 遺伝子解析も併用することにより *OPA1* 遺伝子変異の検出感度を高めることができた。ADOA は他の視神経疾患の後に視神経萎縮が生じた症例との臨床的な鑑別が難しいため、データを蓄積することにより遺伝子変異が陽性の症例と、陰性の症例の臨床的特徴を明らかにすることができた。これは将来の遺伝子治療研究に患者リクルートするにあたり、臨床スクリーニングとして非常に有用なデータとなる。

英文

Majority of the information we receive comes as vision. Any damage in vision system will lead to devastating effect to normal life. Damage to the retina where photoreceptors are located will have significant impact on normal vision. Over 36 diseases are known to have such defect including retinitis pigmentosa, macular dystrophy, cone-rod dystrophy and stationary night blindness. These eye diseases with Mendelian inheritance of autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked or sporadic forms require diagnostic with high quality including the electroretinogram. are known. There are already 256 disease-causing genes have been identified for these 36 eye diseases. These information of gene mutations mainly comes from Caucasian population. However, study for the Japanese population has not fully explored. To obtain enough information of the Japanese patients, Japan Eye Genetics Consortium (JEGC) for Hereditary Retinal Diseases was established with 30 major Ophthalmology Departments in Japan. The consortium will focus on collecting 10% of the potential 50,000 patients in Japan. Over 1,080 pedigrees were collected and diagnosed. Whole exome analysis or whole genome analysis were performed for all member of the pedigree to identify the disease gene mutation. Only 20% of the pedigree analyzed were found to have known gene mutation, while other with novel mutation or novel gene. Over 50 pedigree has been detected with novel genes. Each gene are now functionally studied by protein interaction experiments, patient iPS cells and knock-in mouse using the CRISPR/Cas9 system. Genotype-phenotype database is now in operation. JEGC has now expanded to the Asian Eye Genetics Consortium (AEGC, <http://asianeyeogenetics.org>) maintained by 21 countries to share genotype-phenotype information in all Asia.

- ① We have collected clinical data and biological samples such as peripheral blood or salivary secretion from patients and family with hereditary retinochoroidal disease whose responsible gene was not identified.
- ② We are analyzing retinal function of several retinochoroidal diseases using some objective and functional visual physiology testings, such as full-field ERG, focal macular ERG, and pattern ERG.
- ③ We are conducting assessment of new visual display used for visual physiology testings as multifocal ERG and pattern ERG which require pattern stimulation. We are developing optimal application of the new display to those ERG testings.
- ④ We have recorded full-field ERG using a portable ERG recording machine named RETeval® from infants and patients just after surgery. We showed its availability and usefulness in clinical research.

<Studies of genotype and phenotype of incomplete-type of congenital stationary night blindness>

Incomplete-type congenital stationary night blindness (iCSNB) is a relatively rare

non-progressive retinal disease characterized by decreased visual acuity and reduced night vision. It has been reported that the mutations in *CABP4* or *CACNA1F* cause iCSNB. During this research period, we had the clinical data and DNA samples of 14 iCSNB patients from 12 families. Their ages ranged from 8 to 74 years (mean, 34.9 years), and chief complaints were reduced visual acuity, photophobia, or poor night vision. Corrected visual acuities of these iCSNB patients were relatively preserved, and ranged from 0.3 to 1.2. The full-field blight-flash electroretinography (ERG) recorded after dark-adaptation showed “negative” waveform in all patients, suggested that the neurotransmission from the photoreceptors to the bipolar cells are impaired in the retina of iCSNB. The rod responses and cone responses of ERG were moderately reduced. The whole exome sequencing analyses were performed on 9 of 14 patients with iCSNB, and 6 patients showed pathogenic variants in *CACNA1F* gene. These results suggested that the most Japanese patients with iCSNB are caused by *CACNA1F* gene mutations.

<Genetic analysis of inherited retinal dystrophies>

1) To investigate genetic and clinical features of patients with rhodopsin (RHO) mutations in two Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP). Whole-exome sequence analysis was performed in ten adRP families. Identified RHO mutations for the cosegregation analysis were confirmed by Sanger sequencing. In two adRP families, we identified two RHO mutations (p.W126L and p.A346P), one of which was novel. Molecular modeling predicted that the novel mutation (p.W126L) might impair rhodopsin function by affecting its conformational transition in the light-adapted form. Clinical phenotypes showed that patients with p.W126L exhibited sector RP, whereas patients with p.A346P exhibited classic RP. Our findings demonstrated that the novel mutation (p.W126L) may be associated with the phenotype of sector RP.

2) The purpose of this study was to investigate frequent disease-causing gene mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa (arRP) in the Japanese population. In total, 99 Japanese patients with non-syndromic and unrelated arRP or sporadic RP (spRP) were recruited in this study and ophthalmic examinations were conducted for the diagnosis of RP. Whole exome sequencing of 30 arRP/spRP patients identified disease-causing gene mutations of *CNGA1* in four patients. Screening of an additional 69 arRP/spRP patients for the *CNGA1* gene mutation revealed one patient with a homozygous mutation. This is the first identification of *CNGA1* mutations in arRP Japanese patients. The frequency of *CNGA1* gene mutation was 5.1% (5/99 patients). *CNGA1* mutations are one of the most frequent arRP-causing mutations in Japanese patients.

3) The purpose was to investigate genetic and clinical features of patients with Leber congenital amaurosis (LCA) caused by *RPE65* mutations. Five Japanese families with LCA were recruited. In whole-exome sequencing analysis and Sanger sequencing, we identified *RPE65* mutations in two unrelated LCA patients from two families. In case 1, novel compound hete

rozygous mutations (p.H59Q and p.D62X) were identified. In case 2, a homozygous mutation (p.R515W) was detected. By using whole-exome sequencing analysis, three RPE65 mutations were identified in two Japanese patients with LCA.

4) We have previously reported clinical features of two siblings, a sister with complete achromatopsia (ACHM) and a brother with incomplete ACHM, in a consanguineous Japanese family. Whole-exome sequencing identified a novel homozygous PDE6C mutation (p.E591K) in the siblings. Molecular modeling showed that the mutation could cause a conformational change in the PDE6C protein and result in reduced phosphodiesterase activity.

5) Best's vitelliform macular dystrophy (BVMD), a macular dystrophy with autosomal dominant inheritance, is ophthalmoscopically characterized by an elevated macular lesion filled with large deposits of lipofuscin-like material, which creates a yellowish lesion resembling an egg yolk. The diagnosis of BVMD was determined based on the characteristic findings of normal or slightly subnormal ERG and abnormal EOG. This study genetically examined 22 patients, including 16 probands from 16 families with BVMD. Genetic analysis identified 12 BEST1 variants in 13 probands (81%). Of these, 10 variants (p.T2A, p.R25W, p.F80L, p.V81M, p.A195V, p.R218H, p.G222E, p.V242M, p.D304del and p.E306D) have been previously reported in BVMD, while two variants (p.S7N and p.P346H) were novel, putative disease-causing variants. Twelve different variants, two of which (p.S7N and p.P346H) were novel, were identified in the 13 Japanese families with BVMD. Our results suggest that BEST1 variants do play a large role in Japanese patients with BVMD.

We confirm that the outcomes of our studies will be beneficial for development of promising new therapies such as gene replacement therapy and regenerative medicine.

<Identification of Causative Gene for Leber Congenital Amaurosis in Japanese Population>

Professor Takeshi Iwata (Division of Molecular and Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, Tokyo Medical Center, National Hospital Organization) and his colleagues genetically examined 132 Japanese patients in 48 families with Leber congenital amaurosis (LCA). Whole exome was investigated using next generation sequence technique. Analyses of the sequences were completed in 20 families. In these families, pathogenic mutants were discovered in the *RPE65* (1 family), *RPGR* (1 family), *RDH12* (2 families), *PDE6C* (1 family), *CRB1* (2 families), *MMNAT1* (1 family), *TULP1* (1 family), *RPE65* (1 family) genes, respectively. The rest 10 families (50%) did not have pathogenic mutant in the previously reported genes which were causative for retinal diseases. Since genetic causes have been found in up to 70% of LCA cases in Caucasian population (Neveling et al., *Methods Mol Biol* 2013), our results suggest that genetic characteristics of LCA in Japanese population seem to be different from those in Caucasian population.

<Genome Analysis and Biobank Development for Choroideremia, Bietti's Crystalline dystrophy,

and Dominant optic atrophy in Japanese Population>

We had many registration of inherited retinal diseases from all over the Japan to the database made by National Institute of Sensory Organ. For Bietti's crystalline dystrophy (BCD), 19 cases from 17 families were registered. We have found major mutation of c.802-8_810del17insGC of *CYP4V2* gene in 8 family by whole exome analysis. The mutation was reported to be found in majority of Japanese and Chinese patients with BCD. According to the recent report, the age of the c.802-8_810del17insGC mutation was estimated to be 1040-8200 generations in the Chinese and 300-1100 generations in the Japanese populations. These results provide insight into the origin of the c.802-8_810del17insGC mutation in the Japanese population and its transmission from the Chinese population. We have also found novel *CYP4V2* mutations. A family possess compound heterozygous mutation of c.802-8_810del17insGC and novel p.S461F. An another family possess homozygous p.F460L mutation in *CYP4V2* gene. These new findings facilitate the elucidation of the gene function of *CYP4V2*.

For Choroideremia, 14 cases from 7 families were registered. Whole exome analysis of 2 families are finished. A known *CHM* gene mutation of p.W47X was found in a family. Interestingly, patients other than registered as choroideremia had *CHM* mutations in the database. These cases are registered as choroidal dystrophy and unclassified retinal dystrophy. Mutations of *CHM* gene found in these cases are splice site mutations of c.820-1G>A and c.49+1G>C. These cases were difficult to diagnose as choroideremia only by clinical data, however these cases are considered as spectrum of choroideremia from the perspective of genetic diagnosis. The achievement will improve a future diagnosis of choroideremia. For autosomal dominant optic atrophy (ADOA), 35 cases from 19 families were registered. Whole exome analysis of 6 families are finished. 2 family showed known *OPAI* mutations of p.D438A and p.R38X. A family showed a novel 13 bp deletion mutation of c.1139_del13bp. We have also used tailed PCR method by collaboration with Dr.Takaaki Hayashi (The Jikei University School of Medicine: Ophthalmology). The method improved the sensitivity of the detection of *OPAI* mutation compared to whole exome analysis alone. It is difficult to differentiate ADOA from the secondary optic atrophy caused by various optic neuritis without genetic diagnosis. To classify optic atrophies by genetic diagnosis in this database disclosed the features of ADOA in order to differentiate them from other secondary optic atrophies.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3 件、国際誌 9 件）

1. Ueno S, Nakanishi A, Kominami T, Ito Y, Hayashi T, Yoshitake K, Kawamura Y, Tsunoda K, Iwata T, Terasaki H. In vivo imaging of a cone mosaic in a patient with achromatopsia associated with a GNAT2 variant. *Jpn J Ophthalmol*. 2016;61 (1), 92-98.
2. Minegishi Y, Nakayama M, Iejima D, Iwata T. Significance of Optineurin Mutations in Glaucoma and Other Diseases. *Prog Ret Eye Res* 2016 29. pii: S1350-9462(16)30061-1.
3. Shim MS, Takihara Y, Kim K-Y, Iwata T, Yue BYJT, Inatani M, Weinreb RN, Perkins GA, and Ju W-K. Mitochondrial pathogenic mechanism and degradation in optineurin E50K mutation-mediated retinal ganglion cell degeneration. *Sci Rep* 2016 22; 6:33830.
4. Minegishi Y, Sheng X, Yoshitake K, Sergeev Y, Iejima D, Shibagaki Y, Monma N, Ikeo K, Furuno M, Zhuang W, Liu Y, Rong W, Hattori A, Iwata T. *CCT2* Mutations Evoke Leber Congenital Amaurosis due to Chaperone Complex Instability. *Sci Rep* 2016 in press
5. Iwata T. Establishment of the Indian Chapter for Asian Eye Genetics Consortium. *Indian J Ophthalmol*. 2016; 64:484.
6. Fujinami K, Kameya S, Kikuchi S, Ueno S, Kondo M, Hayashi T, Shinoda K, Machida S, Kuniyoshi K, Kawamura Y, Akahori M, Yoshitake K, Katagiri S, Nakanishi A, Sakuramoto H, Ozawa Y, Tsubota K, Yamaki K, Mizota A, Terasaki H, Miyake Y, Iwata T, Tsunoda K. Novel RP1L1 Variants and Genotype-Photoreceptor Microstructural Phenotype Associations in Cohort of Japanese Patients with Occult Macular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:4837-46.
7. Suga A, Mizota A, Kato M, Kuniyoshi K, Yoshitake K, Sultan W, Yamazaki M, Shimomura Y, Ikeo K, Tsunoda K, Iwata T. Identification of novel mutations in the LRR-cap domain of *C21orf2* in Japanese patients with retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57:4255-4263.
8. Kuniyoshi K, Hayashi T, Sakuramoto H, Mishima H, Tsuneoka H, Tsunoda K, Iwata T, Shimomura Y. New truncation mutation of the NR2E3 gene in a Japanese patient with enhanced S-cone syndrome. *Jpn J Ophthalmol* 2016;60(6):476-485.
9. Yagura K, Shinoda K, Matsumoto S, Terauchi G, Kawashima M, Watanabe E, Matsumoto H, Iwata T, Mizota A, Miyake Y. Electroretinographic evaluations of retinal function before, just after, and after intravitreal injections. *Sci Rep* 2016 Aug 5; 6:31104. doi: 10.1038/srep31104.

10. Nakanishi A, Ueno S, Hayashi T, Katagiri S, Kominami T, Ito Y, Gekka T, Masuda Y, Tsuneoka H, Shinoda K, Hirakata A, Inoue M, Fujinami K, Tsunoda K, Iwata T, Terasaki H. Clinical and genetic findings of autosomal recessive bestrophinopathy in Japanese cohort. *Am J Ophthalmol*. 2016;S0002-9394:30198-2.
11. Biswas P, Chavali VR, Agnello G, Stone E, Chakarova C, Duncan JL, Kannabiran C, Homsher M, Bhattacharya SS, Naeem MA, Kimchi A, Sharon D, Iwata T, Riazuddin S, Reddy GB, Hejtmancik JF, Gerogiou G, Riazuddin SA, Ayyagari R. A missense mutation in the *ASRGL1* gene is involved in causing autosomal recessive retinal degeneration. *Hum Mol Genet* 2016 15;25(12):2483-2497.
12. Kuniyoshi K, Muraki-Oda S, Ueyama H, Toyoda F, Sakuramoto H, Ogita H, Irifune M, Yamamoto S, Nakao A, Tsunoda K, Iwata T, Ohji M, Shimomura Y. Novel mutations in the gene for α -subunit of retinal cone cyclic nucleotide-gated channels in a Japanese patient with congenital achromatopsia. *Jpn J Ophthalmol*. 2016; 60:187-97.
13. Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, Tsuneoka H, Iwata T. RPE65 mutations in two Japanese families with Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genetics* 2016;37:161-169
14. Nakanishi A, Ueno S, Kawano K, Ito Y, Kominami T, Yasuda S, Kondo M, Tsunoda K, Iwata T, Terasaki H. Pathologic Changes of Cone Photoreceptors in Eyes With Occult Macular Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:7243-9
15. Iejima D, Nakayama M, Iwata T, HTRA1 Overexpression Induces the Exudative Form of Age-Related Macular Degeneration. *Age-Related Macular Degeneration. J Stem Cells* 2015;10:193-203
16. Katagiri S, Hayashi T, Ohkuma Y, Sekiryu T, Takeuchi T, Gekka T, Kondo M, Iwata T, Tsuneoka H. Mutation analysis of BEST1 in Japanese patients with Best's vitelliform macular dystrophy. *Br J Ophthalmol*. 2015;99:1577-82
17. Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Sergeev Y, Akahori M, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsunoda K, Tsuneoka H, Iwata T. Congenital Achromatopsia and Macular Atrophy Caused by a Novel Recessive PDE6C Mutation (p.E591K). *Ophthalmic Genet*. 2015;36:137-44
18. Kato Y, Tsunoda K, Fujinami K, Iwata T, Saga M, Oguchi Y. Association of Retinal Artery and Other Inner Retinal Structures With Distribution of Tapetal-like Reflex in Oguchi's Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:2162-72

19. Iwata T. Author Response: Postnatal Overexpression of the Human ARMS2 Gene Does Not Induce Abnormalities in Retina and Choroid in Transgenic Mouse Models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015; 56:1389
20. Kuniyoshi K, Sakuramoto H, Yoshitake K, Ikeo K, Furuno M, Tsunoda K, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Reduced rod electroretinograms in carrier parents of two Japanese siblings with autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with PDE6B gene mutations. *Doc Ophthalmol*. 2015;131:71-9
21. Iejima D, Itabashi T, Kawamura Y, Noda T, Yuasa S, Fukuda K, Oka C, Iwata T. 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. *The Journal of Biological Chemistry* 2015;290:2784-97
22. Kuniyoshi K, Ikeo K, Sakuramoto H, Furuno M, Yoshitake K, Hatsukawa Y, Nakao A, Kusaka S, Shimomura Y, Iwata T. Novel nonsense and splice site mutations in CRB1 gene in two Japanese patients with early-onset retinal dystrophy *Documenta Ophthalmologica*. *Documenta Ophthalmologica* 2015;130:49-55
23. Katagiri S, Hayashi T, Akahori M, Itabashi T, Nishino J, Yoshitake K, Furuno M, Ikeo K, Okada T, Tsuneoka H and Iwata T. RHO mutations (p.W126L and p.A346P) in two Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Journal of Ophthalmology* 2014;2014:210947. doi: 10.1155/2014/210947
24. Gallenberger M, Kroeber M, Koch M, März L, Fuchshofer R, Iwata T, Braunger BM, Tamm ER. Heterozygote Wdr36-deficient mice do not develop glaucoma. *Experimental Eye Research* 2014;128:83-91
25. Nakayama M, Iejima D, Akahori M, Kamei J, Goto A, Iwata T. Overexpression of *Htra1* and exposure to mainstream cigarette smoke leads to choroidal neovascularization and subretinal deposits in aged mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2014;55:6514-6523
26. 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, Iwata T. Whole exome analysis identifies frequent *CNGA1* mutations in Japanese population with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *PLoS One* 2014;9(9):e108721
27. Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Gekka T, Tsuneoka H, Iwata T. Novel C8orf37 mutations in patients with early-onset retinal dystrophy, macular atrophy, cataracts, and high myopia. *Ophthalmic Genetics* 2014;12:1-8

28. Tanito M, Hara K, Akahori M, Harata A, Itabashi T, Takai Y, Kaidzu S, Ohira A, Iwata T. Lack of association of LOXL1 gene variants in Japanese patients with central retinal vein occlusion without clinically detectable pseudoexfoliation material deposits. *Acta Ophthalmologica* 2014; Aug 12
29. Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Funada H, Sasaki K, Minoda H, Iwata T, Mizota A. Pattern visually evoked potentials elicited by organic electro-luminescence screen. *BioMed Research International* 2014;606951
30. Matsumoto CS, Nakagomi R, Matsumoto H, Minoda H, Shinoda K, Iwata T, Mizota A. Binocular interaction of visually evoked cortical potentials elicited by dichoptic binocular stimulation *Journal of Vision* 2014;14(11). pii4
31. Matsumoto CS, Shinoda K, Matsumoto H, Seki K, Nagasaka E, Iwata T, Mizota A. What monitor can replace cathode ray tube for visual stimulation to elicit multifocal electroretinograms? *Journal of Vision* 2014;14(9) pii:2
32. Kobayashi H, Okamoto H, Murakami A, Iwata T. Plasma Proteome Analysis On Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Pedigrees With Early Onset Drusen Formation. *Journal of Experimental Animals* 2014;63:305-310
33. 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/severe early childhood onset retinal dystrophy with *RDH12* mutation. *Documenta Ophthalmologica* 2014;128:219-228
34. Katagiri S, Akahori M, Hayashi T, Yoshitake K, Gekka T, Ideo K, Tsuneoka H, Iwata T. Autosomal recessive cone-rod dystrophy associated with compound heterozygous mutations in the *EYS* gene. *Documenta Ophthalmologica* 2014;128:211-2117
35. Ohkuma Y, Hayashi T, Sakai T, Watanabe A, Yamada H, Akahori M, Itabashi T, Iwata T, Noda T, Tsuneoka H.: Retinal angiomatous proliferation associated with risk alleles of *ARMS2/HTRA1* gene polymorphisms in Japanese patients. *Journal of Clinical Ophthalmology* 2014;8:143-8
36. Iwata T, *Animal Models for Eye Diseases, Handbook of Laboratory Animal Science III*, (Editor: Hau J and Schapiro SJ) CRC Press 2014;195-217

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Takeshi Iwata, Oral presentation,
Disease mechanism for exudative AMD and Introduction of the Japan/Asian Eye Genetics Consortium. Moorfields Eye Hospital/ UCL, 2016.6/14-18, England.
2. Takeshi Iwata, Oral presentation,
Asian Eye Genetics Consortium (AEGC).
15th Chinese Visual Physiology Congress &, Chongqing Medical University/Chongqing Eye Institute Shenzhen & The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University & Southwest Eye Hospital Third Military Medical University, 2016.6.25, China.
3. Takeshi Iwata, Oral presentation,
Japanese consortium for hereditary retinal diseases.
Retina International World Congress 2016, 2016.7.9, Taipei.
4. Takeshi Iwata.
Genetic factors and molecular mechanisms of early stage AMD : CNV mouse and drusen primate models.
XV II International Symposium on Retinal Degeneration 2016
Kyoto International Conference Center, 2016.9.19-24, Kyoto.
5. G. Prakash, Takeshi Iwata, Oral presentation,
Developing international research collaborations in eye diseases – Asian Eye Genetics Consortium. XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research,
2016.9.25-29, Tokyo.
6. Takeshi Iwata, Oral presentation,
International collaborations to identify novel genes responsible for hereditary retinal diseases in Asian population.
The 116th Annual Meeting of the Korean Ophthalmological Society, 2016.11.9, Seoul.
7. Takeshi Iwata, Oral presentation,
International collaborations to identify novel genes responsible for hereditary retinal diseases in Asian population.
The Eye Hospital of Wenzhou Medical University, 2016.12.2, Wenzhou, China.
8. Takeshi Iwata, Oral presentation,
①Asian Network to identify disease mechanisms for genetic eye diseases.
②International collaborations to identify novel genes responsible for hereditary retinal diseases

in the Asian population.

Aditya Jyot Eye Hospital, 2016.12.12-18, Mumbai.

8. Takeshi Iwata, Oral presentation,

Asian Eye Genetics Consortium: International collaboration to accelerate identification of novel diseases causing genes. ARVO – Asia 2017, 2017.2.3-8, Brisbane.

9. Takeshi Iwata, Oral presentation,

International collaborations to identify novel genes responsible for hereditary retinal diseases in the Asian population. APAO 2017, 2017.3.2-5, Singapore.

10. 岩田 岳

Optineurin and normal tension glaucoma

World Ophthalmology Congress® 2014 2014年4月 国内

11. 岩田 岳

Characterization of gene responsible for AMD, NTG and hereditary retinal diseases

International Ophthalmic Genetics Meeting 2014 2014年4月 国内

12. 岩田 岳

最新の遺伝子解析技術と眼科への応用

第47回日本眼科講演会 2014年7月 国内

13. 岩田 岳

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

世界網膜の日(神戸) 2014年9月 国内

14. 岩田 岳

Overview of eye genetics and the way forward in Asia

XII th Congress of The South Asian Academy of Ophthalmology 2014年10月 国外

15. 岩田 岳

Molecular mechanism of gene associated with glaucoma and age-related

Omacular degeneration

サンディエゴ大学 2014年10月 国外

16. 岩田 岳

遺伝性網膜疾患の網羅的な病態解明への挑戦

第10回感覚器シボジウム 2015年3月 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 岩田 岳

「遺伝性網脈絡膜疾患群の網羅的遺伝子解析：オールジャパン体制の構築と課題」
第41回近畿眼科先進医療研究会 大阪府 2016.10.8, 国内

2. 岩田 岳

「遺伝性網脈絡膜疾患の全エクソーム解析：オールジャパン体制の構築と課題」
第3回弘前医療技術イノベーションシンポジウム-光をもういちど 要介護0を目指して-
2007/11/13 国内

3. Takeshi Iwata

Discovery and characterization of novel genes responsible for hereditary retinal diseases,
熊本大学リエゾンラボセミナー(HIGO 最先端研究セミナー) 2017/3/1 国内

4. 岩田 岳

「網膜色素変性症を含む遺伝性網脈絡膜疾患の全遺伝子解析と発症機序の解明について」
日本網膜色素変性症協会 社員総会 2015年 6月27日

5. 岩田 岳

「遺伝性網膜疾患の原因遺伝子の探索、データベースの構築そして国際協力」
日本網膜色素変性症協会 東京支部定期総会 2015年7月5日

(4) 特許出願

あり