

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10747

研究課題名(和文) 遺伝子コピー数変化解析による新規難聴発症メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Copy number variations in hearing loss

研究代表者

茂木 英明(MOTEKI, Hideaki)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：60422698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円

研究成果の概要(和文)：コピー数変化(CNV: copy number variation)といわれる、数千ないしは数Mbの大きな規模での遺伝子の欠失が、先天的感音難聴の原因のひとつとして注目されている。本研究期間において、難聴遺伝子CNV解析のためのCGH(比較ゲノムハイブリダイゼーション法)アレイを設計、次いで、現在保険診療で行われている先天性難聴の遺伝学的検査と同様の、次世代シーケンサーのリードデータから、コンピューター解析によるCNVの検出を行った。難聴の原因遺伝子のひとつであるSTRC遺伝子をターゲットにCNV解析を行なった結果、本遺伝子のCNVが中等度難聴において頻度が高いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, copy number variants (CNVs) have been recognized as a major cause of genetic hearing loss. We undertook CNV analysis of the deafness causing genes using Next-generation sequencing (NGS) dataset and custom array CGH. We used the NGS platform with a social health insurance-approved method, and then performed CNV calling using read-depth approach we developed. The CNV results were confirmed with customized array comparative genomic hybridization (array CGH). We identified CNVs of the STRC genetic region as an important cause of hearing loss. The present study indicated that a considerable number of deafness patients, particularly among mild-moderate ARHL patients, caused by CNVs in the STRC gene.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：難聴 遺伝子 次世代シーケンサー アレイCGH CNV

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1,000 名に 1 名に認められる比較的頻度の高い障害である。これまで我々は日本人の難聴患者の遺伝子解析を行い、*GJB2* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子など多数の難聴遺伝子が日本人難聴患者にも関与していることを報告してきた。また、2008 年には「先天性難聴の遺伝子診断」を先進医療として申請、2012 年には保険収載され、日常診療においても難聴の原因検索としての遺伝子検査が行なわれ、正確な診断に基づき、難聴予後の推測、適切な治療法の選択などが可能になってきている。

先天性感音難聴においては、遺伝子上のひとつの塩基ないしは数塩基の、点変異、欠失や挿入による変異が原因となる。近年、これに加えて、コピー数変化（CNV: copy number variation）といわれる、より大きな規模での遺伝子の重複や欠失が、難聴の原因となることが明らかになりつつある。CNV は全ゲノム上の 10% 以上の領域にわたって存在していることが明らかになっており、遺伝性疾患の原因にもなることから、注目されている現象である。従来の遺伝子解析に多用されてきた Sanger 法による直接シーケンスでは、遺伝子の CNV を検出することは極めて困難である。これが、今まで遺伝性難聴の原因として、CNV を見出すことが困難であった理由である。よって、多くの難聴の原因遺伝子や、その変異の部位が発見されてはいるものの、遺伝性難聴の原因としての CNV を見逃している可能性があった。また、近年幅広く臨床応用されている次世代シーケンサーをもってしても、未だ CNV 解析は容易ではなく、そのプラットフォームの確立も必要であった。

2. 研究の目的

CNV 解析を、未知の難聴の原因遺伝子において解析を行うことは現実的ではない。そこで今回の研究では、既知の難聴遺伝子におけるコピー数の変化を調査することを主たる目的とする。CNV が関与すると考えられる原因遺伝子には *STRC* 遺伝子、*OTOA* 遺伝子、*EYA1* 遺伝子などがあり、これらを対象とした解析を行う。CNV 解析はすでに確立された手法として、アレイ CGH 法（比較ゲノムハイブリダイゼーション法）があり、これを応用することで能率的に解析することが可能である。本研究では、新たに得られた難聴患者を対象とした CNV 解析を行う。目的とする遺伝子は既知の難聴の原因遺伝子における CNV 解析である。またこれら CNV を原因とする遺伝性難聴の経時的・周波数特性などの臨床データをより正確に把握し、難聴病態の解析のための基礎的データを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析を行い、得られたリードデータに関して、コンピューターによる CNV 解析を試みた。また同時に、この結果を、アレイ CGH で確認するために、難聴の遺伝子解析に特化したカスタムメイドのアレイ CGH をデザイン、作成した。これにより次世代シーケンサー CNV 解析の正確性を評価した。

解析対象の全症例のうち、どのような遺伝子に CNV が見出されるか、その頻度や CNV のパターンを評価した。

CNV が同定された症例に関しては、遺伝形式、聴力などの表現型を解析し臨床像の評価を行なった。

4. 研究成果

（1）難聴遺伝子の CNV 解析に特化したアレイ CGH 法の確立

次世代シーケンサーによる難聴遺伝子解析でターゲットとしている、63 の原因遺伝子に関して、カスタムアレイをデザインした。*STRC* 遺伝子の CNV が確認されている症例に関して、これを陽性コントロールとして検討を行なった。

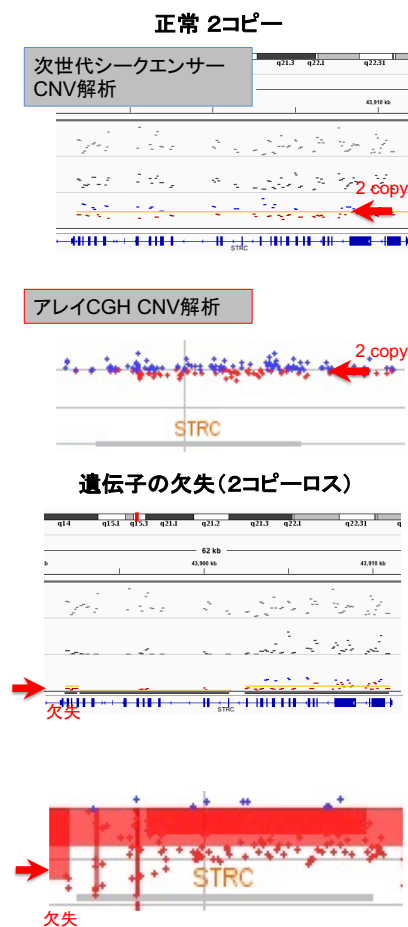


図 1. 次世代シーケンサーとアレイ CGH のコピー数変化解析の結果。次世代シーケンサーのコピー数解析により、遺伝子 2 コピー欠失が検出可能であった。

その結果、*STRC* 遺伝子の 1 コピー欠失、2 コピー欠失ともに正確に検出することが可能であり、有用であることが明らかとなった (図 1)。

(2) 次世代シーケンサーの遺伝子解析データを用いた CNV 解析

現在、保険診療で行なっている、難聴遺伝子をターゲットとした次世代シーケンサー解析では、各遺伝子を PCR で増幅したのち、次世代シーケンサーでその増幅産物の塩基配列を決定していく。この時に得られる「リードデータ」を解析することで CNV を検出した。それぞれのリードデータの相対的な量を比較し、最適な組み合わせで比較することで、従来の方法よりも簡便、かつ迅速に CNV を検出することが可能であった。この結果を (1) のカスタム・アレイ CGH で確認し、正確に検出できることが示された。

(3) *STRC* 遺伝子の CNV の特徴

STRC 遺伝子は CNV が関与する難聴の原因遺伝子として、頻度が高いと海外からは報告がなされている。日本人難聴患者のうち、常染色体劣性遺伝形式をとる 40 症例を対象に解析を行なったところ、3 症例に見出され、日本人においても頻度が高い原因であることが示された。また、これらはすべて、「中等度難聴」を呈していた。常染色体劣性遺伝形式をとる難聴の原因遺伝子の大半は、「先天性高度難聴」を示すため、中等度難聴を示す原因遺伝子が明らかでなかったことを鑑みると、CNV を原因とする難聴を見逃していた可能性が高いのではないかと推測された。

また、*STRC* 遺伝子における CNV が、実際には本遺伝子領域の領域を超え別の遺伝子を含んだ、非常に大きな領域での欠失が確認された (図 2)。このため、難聴のみならず、別の症状をきたす可能性が示唆され、遺伝カウンセリングなどで有用な情報を提供できる結果につながることを示唆された。

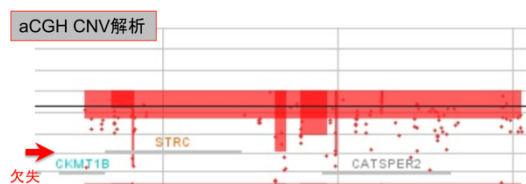


図 2. アレイ CGH により *STRC* 遺伝子と隣接する *CATSPER2* 遺伝子の両方の欠失が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

1. Nishio SY, Moteki H, Usami SI. Simple and efficient germline copy number variant visualization method for the Ion AmpliSeq custom panel. Mol Genet Genomic Med. 2018. (Epub 2018/4/11), DOI:10.1002/mgg3.399 (査読有)
2. Kobayashi M, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Fujikawa T, Ohyama K, et al. WFS1 mutation screening in a large series of Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis. PLoS One. 2018;13(3):e0193359. (査読有)
3. 茂木英明, 西尾信哉, 宇佐美真一. 【難聴の遺伝子解析-臨床応用と病態解明】先天性難聴の遺伝学的検査 次世代シーケンサーの臨床応用. Otology Japan. 2017;27(2):135-40. (査読無)
4. Usami SI, Kitoh R, Moteki H, Nishio SY, Kitano T, Kobayashi M, et al. Etiology of single-sided deafness and asymmetrical hearing loss. Acta Otolaryngol. 2017;137(sup565):S2-s7. (査読有)
5. Kitano T, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Oda K, Ohyama K, et al. POU4F3 mutation screening in Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis identified novel variants associated with autosomal dominant hearing loss. PLoS One. 2017;12(5):e0177636. (査読有)
6. Moteki H, Nishio SY, Miyagawa M, Tsukada K, Iwasaki S, Usami SI. Long-term results of hearing preservation cochlear implant surgery in patients with residual low frequency hearing. Acta Otolaryngol. 2017;137(5):516-21. (査読有)
7. Shibata SB, Ranum PT, Moteki H, Pan B, Goodwin AT, Goodman SS, et al. RNA Interference Prevents Autosomal-Dominant Hearing Loss. Am J Hum Genet. 2016;98(6):1101-13. (査読有)

8. Sakuma N, Moteki H, Takahashi M, Nishio SY, Arai Y, Yamashita Y, et al. An effective screening strategy for deafness in combination with a next-generation sequencing platform: a consecutive analysis. J Hum Genet. 2016;61(3):253-61. (査読有)
9. Mori K, Moteki H, Miyagawa M, Nishio SY, Usami S. Social Health Insurance-Based Simultaneous Screening for 154 Mutations in 19 Deafness Genes Efficiently Identified Causative Mutations in Japanese Hearing Loss Patients. PLoS One. 2016;11(9):e0162230. (査読有)
10. Moteki H, Azaiez H, Sloan-Heggen CM, Booth K, Nishio SY, Wakui K, et al. Detection and Confirmation of Deafness-Causing Copy Number Variations in the STRC Gene by Massively Parallel Sequencing and Comparative Genomic Hybridization. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2016;125(11):918-23. (査読有)
4. Hideaki Moteki, A. Eliot Shearer, Hela Azaiez, Kevin Booth, Christina M Sloan, Diana L Kolbe, Shin-ya Nishio, Richard JH Smith, Shin-ichi Usami. Copy Number Variants in the *STRC* Gene are a Common Cause of Genetic Hearing Loss in the Japanese Population. 39th ARO Annual midwinter meeting. 2016.
5. 茂木英明、吉村豪兼、宇佐美真一. 次世代シーケンサー解析にて *GPR98* 遺伝子変異を同定し、Usher 症候群 Type 2 と診断した一家系. 第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会. 2015
6. Hideaki Moteki, Richard J H Smith and Shin-ichi Usami. The Role of Genetic Testing for Hearing Loss: The Clinical Utility of Genomic Technologies and their Application. 30th Politzer Society Meeting. 2015.
7. 茂木英明、宇佐美真一. 遺伝子コピー数変化 (Copy Number Variation) による先天性感音難聴症例. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会. 2015. 5. 20-23. 東京国際フォーラム (東京)

[学会発表] (計 7 件)

1. Hideaki Moteki, Yoh Yokota, Shin-ichiro Oka, Shin-ya Nishio, Tomomi Yamaguchi, Keiko Wakui, Shin-ichi Usami. Copy number variants in the *STRC* gene are a common cause of moderate hearing loss in a Japanese population. 第 62 回日本人類遺伝学会. 2017.
2. 茂木英明、宮川麻衣子、宇佐美真一. 先天性難聴の遺伝子診断における遺伝子コピー数変化 (Copy Number Variation) 同定の試み. 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会. 2016.
3. 茂木英明、西尾信哉、宇佐美真一. 先天性難聴の遺伝学的検査 - 次世代シーケンサーの臨床応用. 第 26 回日本耳科学会. 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 英明 (MOTEKI, Hideaki)
 信州大学・学術研究院医学系
 (医学部附属病院)・講師
 研究者番号: 60422698