

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09343

研究課題名（和文）ゲノム構造変化による感音難聴の発症メカニズムの解明に関する研究

研究課題名（英文）Sensorineural hearing loss caused by genomic alteration

研究代表者

茂木 英明（Moteki, Hideaki）

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60422698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーによる網羅的な難聴の遺伝子解析を行い、ゲノム構造変化のうち、遺伝子の量的変化であるコピー数変化：Copy number variation (CNV) の検出を試みた。この結果をアレイCGH（比較ゲノムハイブリダイゼーション）で検証し、正確に検出できることを示した。CNVを原因とする感音難聴の家系を見出し報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、「難聴の遺伝子解析」が保険診療で可能になっているが、このコピー数変化は検査方法に組み込まれていない。本研究の結果から、難聴の原因のひとつにコピー数変化が重要であることが示された。今後、保険診療でも行うことが可能になることが望まれる。

研究成果の概要（英文）：We intended to detect deafness-causing copy number variations (CNV) using massively parallel sequencing data. Confirmation of CNVs were carried out by a comparative genomic hybridization (array-CGH). We developed the CNV detection method, and also reported several hearing loss cases caused by CNVs in deafness-causing genes.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：コピー数変化 難聴 遺伝子

## 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。このような小さな塩基変化とはまったく異なる、数千~Mb 単位でのゲノム構造の大きな変化が、様々な疾患の原因として注目されている。その代表的なものが、コピー数変化 (CNV: copy number variation) であり、これによる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。しかし、このようなゲノム構造変化を同定することは容易ではなく、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 を検出することは不可能である。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でも、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が必要である。現在、保険診療で行われている「先天性難聴の遺伝子診断」は、次世代シーケンサーを使用して一塩基変異などを同定しているが、遺伝子診断の診断率を向上させるためにも、CNV 解析をこれに加えるための基礎研究が必要であった。

## 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 解析に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。

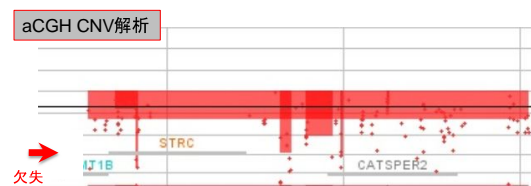
## 4. 研究成果

### (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。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。

### ( 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。このため、より多くの症例を対象に CNV 解析を行った。1,025 症例を対象に検討を行ったところ、17 症例が、*STRC* 遺伝子の CNV によるものと診断され、1.7%の頻度であった。中等度難聴の症例に限った解析を行うと頻度は 12%にのぼり、中等度難聴の原因遺伝子としては、*GJB2* 遺伝子変異に次いで 2 番目に多く、重要な原因遺伝子と考えられた。*STRC* 遺伝子の CNV は非常に大きなゲノム上の欠失を示す場合があり、隣接する遺伝子も欠失する症例が認められた。難聴以外の症状の発現にも注意を払う必要があること、慎重な遺伝カウンセリングが必要と思われた。



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認められた

### ( 4 ) *EYA1* 遺伝子の CNV

症候群性難聴の中にも、原因遺伝子の点変異のみならず CNV によるものもあると考えられる。140 例の症候群性難聴の症例に対して検討を行ったところ、BOR 症候群の原因遺伝子 *EYA1* 遺伝子の CNV を同定することができた。

### ( 5 ) *OTOA* 遺伝子の CNV

前述の *STRC* 遺伝子のほか、*OTOA* 遺伝子も CNV の頻度が高いと考えられている。本研究で確立した手法をベースに、2,262 症例の非症候群性難聴症例の遺伝子解析を行ったところ、14 症例に *OTOA* 遺伝子の CNV を見出した。これらのうち、2 症例が Homozygous deletion であり、4 症例は Hemizygous deletion でもう片方のアレルに一塩基変異 (SNV) が認められ、CNV と SNV の複合的な原因で難聴が引き起こされていることが明らかとなった。

### (まとめ)

*STRC* 遺伝子以外にも、複数の難聴の原因遺伝子において CNV が認められ、その頻度は決して低いものではなく、先天性難聴の原因のひとつとして重要であることが明らかとなった。今後、これらの手法が現行の「先天性難聴の遺伝子診断」に加えられることを期待したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yokota Yoh, Moteki Hideaki, Nishio Shin-ya, Yamaguchi Tomomi, Wakui Keiko, Kobayashi Yumiko, Ohyama Kenji, Miyazaki Hiromitsu, Matsuoka Rina, Abe Satoko, Kumakawa Kozo, Takahashi Masahiro, Sakaguchi Hirofumi, Uehara Natsumi, Ishino Takashi, Kosho Tomoki, Fukushima Yoshimitsu, Usami Shin-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Frequency and clinical features of hearing loss caused by STRC deletions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40586-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama, Moteki, Kitajiri, Kitano, Nishio, Yamaguchi, Wakui, Abe, Ozaki, Motegi, Matsui, Teraoka, Kobayashi, Kosho, Usami	4. 巻 10
2. 論文標題 Mid-Frequency Hearing Loss Is Characteristic Clinical Feature of OTOA-Associated Hearing Loss	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes10090715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ideura M, Nishio S, Moteki H, Takumi Y, Miyagawa M, Sato T, Kobayashi Y, Ohyama K, Oda K, Matsui T, Ito T, Suzumura H, Nagai K, Izumi S, Nishiyama N, Komori M, Kumakawa K, Takeda H, Kishimoto Y, Iwasaki S, Furutate S, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Comprehensive analysis of syndromic hearing loss patients in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47141-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Abe Satoko, Nishio Shin-ya, Yokota Yoh, Moteki Hideaki, Kumakawa Kozo, Usami Shin-ichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Diagnostic pitfalls for GJB2-related hearing loss: A novel deletion detected by Array-CGH analysis in a Japanese patient with congenital profound hearing loss	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 2111 ~ 2116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.1800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishio Shin-ya, Moteki Hideaki, Usami Shin-ichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Simple and efficient germline copy number variant visualization method for the Ion AmpliSeq? custom panel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 678 ~ 686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Yoh, Moteki Hideaki, Nishio Shin-ya, Yamaguchi Tomomi, Wakui Keiko, Kobayashi Yumiko, Ohyama Kenji, Miyazaki Hiromitsu, Matsuoka Rina, Abe Satoko, Kumakawa Kozo, Takahashi Masahiro, Sakaguchi Hirofumi, Uehara Natsumi, Ishino Takashi, Kosho Tomoki, Fukushima Yoshimitsu, Usami Shin-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Frequency and clinical features of hearing loss caused by STRC deletions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40586-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 茂木英明
2. 発表標題 X-linked deafness associated with large genomic deletions in POU3F4 gene
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------