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

令和　３ 年　６ 月 ２３ 日現在

機関番号：１３６０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：１７Ｋ１６９０１

研究課題名（和文）複数の遺伝子変異が関与する遺伝性難聴症例の解析

研究課題名（英文）Analysis of hearing loss cases with multiple mutations in different deafness genes.

研究代表者
森　健太郎（MORI, Kentaro）

信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）

研究者番号：１０７７２３７９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：信州大学医学部耳鼻咽喉科の管理する日本人難聴患者DNAデータベースより日本人難聴患者5584名を対象に、過去に難聴との関連が報告されている63遺伝子を対象とした次世代シークエンス解析を行い、さらに臨床情報の解析を行なった。
5584名のうち、病的意義のある難聴原因遺伝子の変異を複数持つ患者数は23例(0.41%(23/5584))であった。遺伝型-表現型の関連性について検討すると、個々に変異を持つ場合に比較して、難聴の増悪がある症例が認められた。また、一つの病的意義のある難聴原因遺伝子の変異のみでは説明が困難で、複数の変異を同定することで初めて説明することが可能な表現型を示す症例も認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は大規模な母集団を対象に行った検討で、病的意義のある難聴原因遺伝子の変異を複数持つ日本人難聴患者の頻度を明らかにし、その症例の臨床像を明らかにした。本研究の成果は、今後の遺伝性難聴の遺伝カウンセリングやその治療方針を考慮する上で非常に有用な情報であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：For this study, we analyzed 5584 unrelated Japanese hearing loss patients enrolled from Japanese deafness database managed by the department of otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine. The genetic testing was performed to screen for 63 deafness genes using targeted genomic enrichment with massively parallel DNA sequencing combined with the Invader assay and TaqMan genotyping.
Twenty-three of the 5584 patients (0.41%, 23/5584) were diagnosed with genetic hearing loss affected by concomitant with responsible mutations in more than two different genes. Considering genotype-phenotype correlation, we recognized cases of worsened deafness compared to the cases with individual mutations. We also found cases showed a phenotype that was difficult to explain with only one responsible mutation and could be explained for the first time by identifying multiple mutations.

研究分野：遺伝子

キーワード：遺伝子　難聴　次世代シークエンサー

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

これまで我々は日本人難聴患者の遺伝子解析を行い、多数の難聴の原因となる遺伝子を見出し報告してきた。また、研究成果を臨床に還元し、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、さらに 2012 年には保険収載され、日常診療において難聴の原因検索としての遺伝子検査が行われており、正確な診断に基づいた難聴予後の推測、適切な治療法の選択が可能となってきている。

遺伝性難聴は遺伝子ごとに難聴の重症度やめまいの有無など、原因遺伝子により臨床像が異なるという特徴がある。従来、遺伝性難聴の報告は、難聴の原因が単一遺伝子の病的変異によるものが多く、複数の難聴原因遺伝子に病的変異を有する症例の報告は少ない。Usami らは日本人難聴患者 264 例に対し、インベーダー法及び直接シークエンス法による遺伝子解析を行い、4 例(1.5%)に 2 つの異なる難聴の原因遺伝子に変異を同定したと報告している(Usami et al.2012)。これまでに、先天性難聴の原因として最も頻度の高い *GJB2* 遺伝子の変異と *WFS1* 遺伝子の変異を同時に持つ症例や *GJB2* 遺伝子変異と *SLC26A4* 遺伝子変異を同時に持つ症例が過去に報告されており(Minami et al.2012, Shasha et al.2014)、我々も *CDH23* 遺伝子変異とミトコンドリア遺伝子変異を同時に持つ症例を経験している。その他、Usher 症候群は 2 つの異なる遺伝子の変異が組合わさることで発症する digenic inheritance という遺伝形式があることも報告されている(Bonnet et al.2011, Le Quesne et al.2012, Ebermann et al.2010, Yoshimura et al.2014)。すなわち、それぞれが難聴を引き起こす原因遺伝子を 2 つ持つ場合と Usher 症候群のように異なる 2 つの遺伝子変異が複合して難聴を引き起こす場合がある。

次世代シークエンサーにより解析の対象となる難聴の原因遺伝子数は飛躍的に増えるため、複数の難聴原因遺伝子に病的変異を有する症例が今後増加していく事が予想されており、予備的に行った検討でも、日本人難聴患者において、従来の難聴の遺伝学的検査や次世代シークエンサーを用いた遺伝子解析を組み合わせることにより、同一患者でも複数の難聴原因遺伝子に病的変異を有する症例を複数例認めていた(Mori et al.2016)。難聴の重症度や遺伝形式の異なる遺伝子変異を複数有する症例の臨床像や頻度、遺伝性難聴の次世代における再発率を検討することが、今後、遺伝性難聴の治療や遺伝カウンセリングを行う上で重要な情報となると考えられた。

２．研究の目的

本研究は、①複数の難聴原因遺伝子に病的変異を有する日本人難聴患者の頻度を明らかにする事と、②複数の難聴原因遺伝子に病的変異を有する症例の臨床像を明らかにし、今後の治療指針の一助とする事を目的とする。

３．研究の方法

対象の日本人難聴患者 5584 名に対して、hereditary hearing loss ホームページ(https://hereditaryhearingloss.org)を参照し、過去に難聴との関連が指摘されている 63 遺伝子の解析を行った。

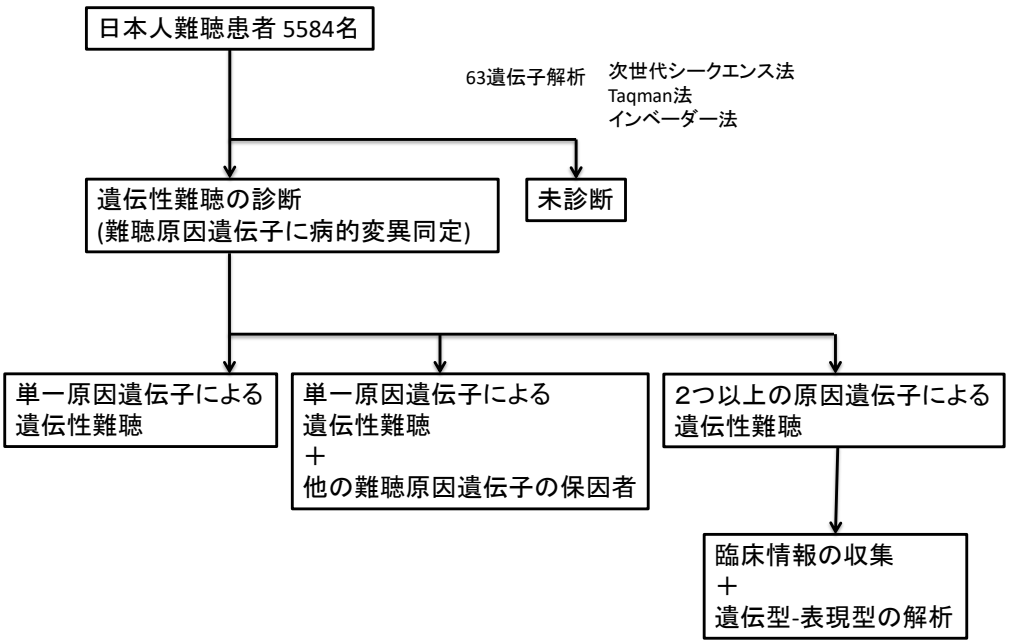
遺伝学的検査は、次世代シークエンス法、Taqman 法、インベーダー法を組み合わせて行なった。具体的には Thermo Fisher 社の Ion AmpliSeq Custom を用いて、全エクソン領域を増幅するプライマーセットを用いたマルチプレックス PCR 法により難聴の原因遺伝子の全エクソン領域を増幅し、エマルジョン PCR を行ってビーズを調整し、Ion Proton システムを用いて次世代シークエンス解析を行った。得られたシークエンスデータに関して、ヒトゲノム配列にマッピングし、塩基置換や欠失挿入変異のある箇所を Ion Variant Caller によりピックアップし、ANNOVAR を用いてアノテーション付けを行った。また、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の中で、日本人に高頻度に見出される *KCNQ4* 遺伝子の c.211delC 変異は次世代シーケンスにて検出されないため、Taqman 法を用いて変異の解析を行った。ミトコンドリア遺伝子変異に関しては、コピー数が多いためインベーダー法を用いて遺伝子解析を行った。

以上の遺伝学的検査により難聴の原因遺伝子変異が特定された症例の頻度及び、複数の難聴原因遺伝子に病的変異が同定された症例の頻度を検討した。また複数の難聴原因遺伝子に病的変異が同定された症例の遺伝型-表現型の関連性を明らかにするため臨床情報の収集を行った。

なお、見出された変異の病原性の判断には ACMG guideline and recommendation 2015 に従い判断を行った。「Likely Pathogenic」、「Pathogenic」の症例を病原性ありと判断した(Richards et al.2015)。

今回の研究の概要を図 1 に示す。

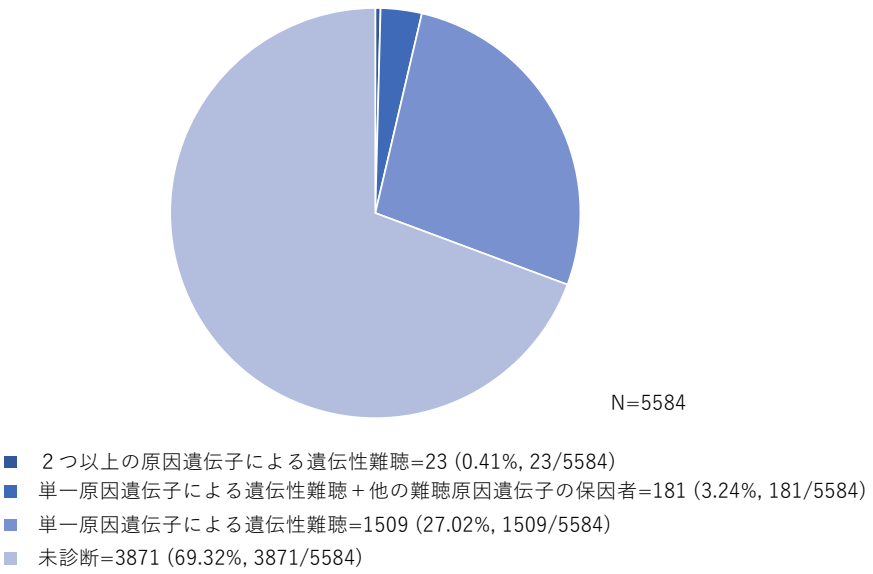
図１　本研究のプロトコール



４．研究成果

今回対象とした日本人難聴患者5584名のうち、遺伝性難聴の診断となったのは1731名(30.67%, 1731/5584)であった。そのうち 1509 名(27.02%,　1509/5584)は単一の難聴原因遺伝子の病的変異による遺伝性難聴であった。ただし、204 名(3.65%,　204/5584)は単一の難聴原因遺伝子の病的変異を持つだけでなく、他の難聴原因遺伝子の保因者もしくは２つ以上の難聴原因遺伝子に病的変異を持つことがわかった。具体的には、単一の難聴原因遺伝子の変異があり且つ他の難聴原因遺伝子変異を持つ保因者は 181 名(3.24%,　181/5584)、重複した難聴原因遺伝子の変異を持つものは 23 名(0.41%,　23/5584)であった。内訳を図 2 に示す。

図２　日本人難聴患者 5584 名の遺伝学的検査結果の内訳



２つ以上の難聴原因遺伝子に病的変異を持つ 23 名の臨床情報を表 1 に示す。

表１　２つ以上の難聴原因遺伝子に病的変異を持つ症例の臨床像

施設ID	年齢	性別	発症年齢	難聴の重症度	内耳奇形	甲状腺腫	糖尿病	原因遺伝子①	原因遺伝子②
HL0349	N/A	男性	N/A	高度	N/A	N/A	N/A	*CDH23*:p.[Q1716P];p.[R2029W]	*CRYM*:p.[k314T]
HL1006	58	女性	25	重度	なし	なし	あり	Mitochondria m.1555A>G	Mitochondria m.3243A>G
2803	N/A	男性	25	中等度	N/A	なし	なし	*TECTA*:p.[C696S]	*WFS1*:p.[A616S]
4516	N/A	男性	N/A	軽度	N/A	なし	なし	*MYO6*:p.[R849X]	*WFS1*:p.[L303P]
HL1171	47	男性	40	高度	N/A	なし	あり	Mitochondria m.3243A>G	Mitochondria m.8296A>G
3010	N/A	女性	0	重度	N/A	N/A	N/A	*GJB2*:c.176_191del;p.[R143W]	*DIAPH1*:p[G13V]
4908	N/A	男性	1	中等度	なし	なし	なし	*CDH23*:p.[Y389X];p.[R1588W]	*OTOF*:p.[R1172Q];p.[R1172Q]
HL1425	1	女性	0	高度	N/A	なし	なし	*GJB2*:p.[L79fs];p.[R143W]	Mitochondria m.3243A>G
HL1827	9	男性	0	高度	N/A	N/A	N/A	*GJB2*:p.[V37I];p.[V37I]	Mitochondria m.8296A>G
HL2362	30	女性	6	高度	なし	なし	なし	*COCH*:p.[E283K]	Mitochondria m.1555A>G
HL2422	32	女性	0	中等度	なし	なし	なし	Mitochondria m.8296A>G	*WFS1*:p.[A716T]
HL3078	1	女性	0	高度	なし	なし	なし	*GJB2*:c.299_300delAT;c.299_300delAT	*TECTA*:p.[E1015K]
HL3191	1	男性	0	高度	N/A	なし	なし	*GJB2*:p.[V37I];p.[V37I]	*DIAPH1*:p[G13V]
2728	N/A	男性	1	重度	あり	なし	なし	*GJB2*:p.[V37I];p.[V37I]	*SLC26A4*:c.919-2A>G;p.[H723R]
HL3391	36	女性	N/A	重度	あり	あり	なし	*SLC26A4*:p.[T410M];p.[H723R]	*KCNQ4*:c.211delC
HL3392	1	男性	0	高度	なし	なし	なし	*OTOF*:p.[R1172Q];p.[R1172Q]	*CCDC50*:c.654_655ins
HL3452	0	女性	0	重度	N/A	なし	なし	*COCH*:p.[A119T]	*GJB2*:p.[L79fs];p.[L79fs]
HL3910	36	男性	35	N/A	N/A	なし	なし	*SLC26A4*:p.[L75L];p.[H723R]	Mitochondria m.3243A>G
3526	N/A	女性	27	重度	なし	なし	なし	*MYO7A*:p.[A771S];p.[G1159S]	Mitochondria m.1555A>G
4444	N/A	男性	0	軽度	N/A	なし	N/A	*GJB2*:p.[V37I];p.[V37I]	Mitochondria m.1555A>G
2539	N/A	男性	0	重度	なし	なし	なし	*GJB2*:p.[L79fs];p.[L79fs]	*DIAPH1*:p[G13V]
HL4545	2	女性	0	中等度	N/A	なし	なし	*GJB2*:p.[V37I];p.[L79Fs]	*DIAPH1*:p[G13V]
HL4556	0	男性	0	重度	N/A	なし	なし	*GJB2*:p.[L79fs];p.[L79fs]	Mitochondria m.8296A>G

23 名の中で検出された遺伝子変異で最も高頻度に認めたのは *GJB2* 遺伝子変異(11/23)であった。続いて、ミトコンドリア遺伝子変異の頻度が高かった(10/23)。さらに *DIAPH1* 遺伝子変異が 4 名、*WFS1* 遺伝子変異、*SLC26A4* 遺伝子変異がそれぞれ 3 名、*OTOF* 遺伝子変異、*TECTA* 遺伝子変異、*COCH* 遺伝子変異、*CDH23* 遺伝子変異が 2 名、*CCDC50* 遺伝子変異、*KCNQ4* 遺伝子変異、*MYO7A* 遺伝子変異、*MYO6* 遺伝子変異、*CRYM* 遺伝子変異が各 1　名ずつに認められた。今回の検討では、23 名の群で *DIAPH1* 遺伝子変異の頻度が全体の日本人難聴患者 5584 名の母集団に比較して高かった。

臨床像については、今回対象の 23 名の平均年齢は 18.1 歳(0-58 歳)で、発症年齢の平均は 8 歳(0-40 歳)であった。男性 13 名、女性 10 名で性差は認めなかった。難聴の程度については重度難聴・高度難聴が 8 名ずつと割合が最も多く、次いで中等度難聴が 4 名と、中等度以上の難聴を

呈する頻度が86.96%(20/23)と高かった。軽中等度難聴を示すことで知られる*GJB2*遺伝子のV37Iホモ変異の症例も、4例中3例が高度から重度難聴を示すことがわかった。このことから、重複した難聴原因遺伝子変異を持つ場合、難聴の程度は、より重度難聴を呈する遺伝子変異により引き起こされる可能性が高いことが考えられる。

また、難聴以外の合併症について検討したところ、*SLC26A4*遺伝子変異を持つ3症例のうち画像的評価を行なっていた2症例では内耳奇形を併発しており、糖尿病を併発していた2症例はミトコンドリア遺伝子変異を持つといった特徴があった。いずれの合併症も*SLC26A4*遺伝子とミトコンドリア遺伝子変異に特徴的な合併症であり、それぞれの合併している難聴原因遺伝子の病的変異のみ起こし得ないものであった。

以上から、単一の難聴原因遺伝子の病的変異のみで説明困難な重度難聴や他の合併症を有する場合には、他の難聴の原因遺伝子の病的変異を有する可能性も考慮すべきであると考える。本研究は、遺伝カウンセリングや遺伝性難聴の治療方法を検討する上で、重要な情報を提供していると考える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔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 森健太郎
２．発表標題 国民健康保険を基にした日本人難聴患者における難聴原因遺伝子19遺伝子154変異のスクリーニング
３．学会等名 第203回日本耳鼻咽喉科学会長野県地方部会
４．発表年 2017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