

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462633

研究課題名(和文) KCNQ4遺伝子変異による難聴のデータベース構築と発症機序に関する研究

研究課題名(英文) Comprehensive Genetic Screening of KCNQ4 in a Large Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss Cohort

研究代表者

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70467166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：KCNQ4遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴(DFNA)のうちのDFNA2の原因遺伝子である。本研究では当教室の管理する日本人難聴遺伝子データベースに蓄積された難聴患者の大規模解析を行い、KCNQ4の頻度や病態に関して明らかにすることを目的に研究を実施し、日本人における遺伝子変異のパターンを明らかにした。また、内耳におけるスプライシングバリエーションの存在も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：KCNQ4, a member of the voltage-gated potassium channel family, plays a role in potassium recycling in the inner ear, and its mutation caused autosomal dominant sensorineural hearing loss. In this study we analyzed large number of Japanese hearing loss patients and revealed mutation spectrum of KCNQ4 gene.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：難聴 遺伝子 KCNQ4

## 1. 研究開始当初の背景

KCNQ4遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴(DFNA)のうちのDFNA2の原因遺伝子である。臨床的には後天発症(6歳以後)の進行性難聴であり、聴力像としては高音漸減型と高音急墜型の報告があるが、KCNQ4遺伝子変異や家系の報告が少ないため、その臨床的特徴の詳細は未だ明らかにはなっていない。

KCNQ4遺伝子から産生される蛋白質は蝸牛内の有毛細胞に発現し、細胞膜上のカリウムイオンチャンネルとして働くことが明らかになっており、内リンパから流入したカリウムイオンを排出し、蝸牛内電位を適切に維持するのに重要な働きを担っている。KCNQ4遺伝子変異によりこのカリウムイオンのリサイクルが障害され、蝸牛内電位を維持できなくなり難聴が起きると考えられている。特に、カリウムが通過する領域を担うP-LOOP領域や通過を制御する電位センサー部が特定されており(図1)、これらの領域の変異が優性阻害効果による難聴を引き起こすと考えられていた。

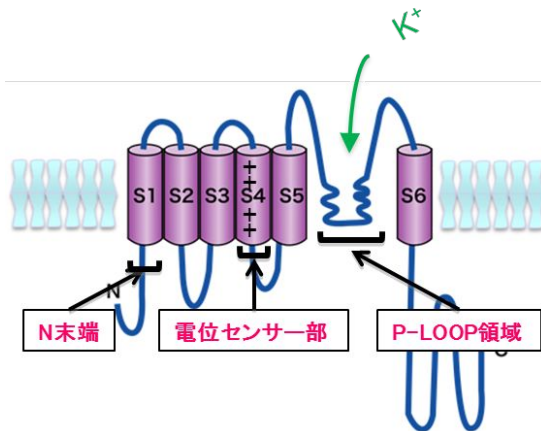


図1 KCNQ4遺伝子の機能ドメイン

また、研究開始時までの報告では、KCNQ4遺伝子変異は15変異、19家系が見出されていたが、主に常染色体優性遺伝形式をとる難聴家系を対象に直接シーケンス法を用いて検索を実施している報告が多く、次世代シーケンサーを用いてKCNQ4遺伝子を含む多数の原因遺伝子を網羅的かつ大規模に調査した例はなかった。

## 2. 研究の目的

KCNQ4遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴(DFNA)のうちのDFNA2の原因遺伝子である。臨床的には後天発症(6歳以後)の進行性難聴であり、聴力像としては高音漸減型と高音急墜型の報告があるが、KCNQ4遺伝子変異や家系の報告が少な

いため、その臨床的特徴の詳細は未だ明らかにはなっていない。特に、研究開始当初までは、常染色体優性遺伝形式をとる難聴家系を対象に直接シーケンス法を用いて検索を実施している報告が多く、次世代シーケンサーを用いてKCNQ4遺伝子を含む多数の原因遺伝子を網羅的かつ大規模に調査した例はなかった。

そこで、本研究では当教室の管理する日本人難聴遺伝子データベースに蓄積された難聴患者の大規模解析を行い、KCNQ4の頻度や病態に関して明らかにすることを目的に研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### 1) KCNQ4 遺伝子変異の頻度および臨床的特徴に関する研究

当研究室において集積されている日本人難聴遺伝子データベースに登録されている日本人難聴患者を対象に次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行い、得られた結果より、KCNQ4 遺伝子変異による難聴と考えられる家系を抽出し、サンガー法による変異の確認、家系解析を行った。

また、検出された KCNQ4 遺伝子変異ごとに、周波数ごとの閾値、年齢、聴力像、進行度などの臨床症状および耳鳴、不整脈などの他の臨床症状に関して検討を行った。また、新規の KCNQ4 遺伝子変異に関しては、これまでに報告されている変異と比較し、その臨床的特徴を明らかにすることを目的に、遺伝子変異の種類と臨床型の相関に関して検討を行った。

### 2) KCNQ4 遺伝子の内耳における局在と機能に関する研究

KCNQ4 遺伝子変異の種類・変異の部位により難聴のタイプや進行が異なることが明らかとなった場合、その原因の一つに蝸牛の各回転別に異なるオルタネイティブスプライシングバリエーションが発現しているために、変異部位の影響が特定の周波数にだけ及ぶ可能性が考えられることより、マウス内耳における遺伝子発現を Laser Micro Dissection 法を用いて検討を行った。

## 4. 研究成果

### 1) KCNQ4 遺伝子変異の頻度および臨床的特徴に関する研究

信州大学医学部耳鼻咽喉科の管理する日本人難聴遺伝子データベースに登録されている日本人難聴患者を対象に次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行い、得られた結果より、KCNQ4 遺伝子変異による難聴と考えられる家系を抽出し、サンガー法による変異の確認、家

系解析を行った。その結果 *KCNQ4* 遺伝子変異による難聴患者 54 家系を見出した。これらの家系は全て常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性難聴家系であった。見出された 54 家系のうち、23 家系は *KCNQ4*: c.211delC 変異による難聴家系であり、日本人難聴患者において比較的高頻度に認められること、またハプロタイプ解析より創始者変異である可能性が高いことを明らかにした。また、臨床的には、高音急墜型の聴力像を呈すること、低音部の難聴はほとんど進行せず、比較的高齢になるまで保たれることを明らかにした。

## 2) *KCNQ4* 遺伝子の内耳における局在と機能に関する研究

また、前項の解析により、*KCNQ4* 遺伝子変異のうち、高音急墜型の難聴を引き起こす変異のほかに、高音漸傾型や中音域障害型の聴力像を示す変異があることを明らかにした。その原因の一つとして蝸牛の各回転別に異なるオルタネイティブスプライシングバリエントが発現しているために、変異部位の影響が特定の周波数にだけ及ぶ可能性を考え、マウス内耳における遺伝子発現を Laser Micro Dissection 法を用いて検討を行った。その結果、蝸牛の基底回転および中回転特異的な転写産物がある可能性を明らかにした(図2)。今後さらなる検討を行い機能面に迫ることを計画している。

図2 *KCNQ4* 遺伝子より見出されたスプライシングバリエント



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Nishio SY, Usami S. Deafness gene variations in a 1120 nonsyndromic hearing loss cohort: molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:49S-60S. 査読有 doi: 10.1177/0003489415575059.

Nishio SY, Hattori M, Moteki H, Tsukada K, Miyagawa M, Naito T, Yoshimura H, Iwasa Y, Mori K, Shima Y, Sakuma N, Usami S. Gene expression profiles of the cochlea and vestibular endorgans: localization and function of genes causing deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:6S-48S. 査読有 doi: 10.1177/0003489415575549.

Nishio SY, Hayashi Y, Watanabe M, Usami S. Clinical application of a custom AmpliSeq library and ion torrent PGM sequencing to comprehensive mutation screening for deafness genes. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2015;19(4):209-17. 査読有 doi: 10.1089/gtmb.2014.0252.

西尾信哉、宇佐美真一、遺伝性難聴. *JOHNS* 2015;31(7):941-945. 査読無

西尾信哉、宇佐美真一、難聴における遺伝子医療の現状. *医学のあゆみ* 2014;250(5):371-377. 査読無

Naito T, Nishio SY, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, Ishikawa K, Kojima H, Namba A, Oshikawa C, Usami S. Comprehensive genetic screening of *KCNQ4* in a large autosomal dominant nonsyndromic hearing loss cohort: genotype-phenotype correlations and a founder mutation. *PLoS One*. 2013;8(5):e63231. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0063231.

西尾信哉、宇佐美真一、難聴の遺伝子診断と次世代シーケンス解析 *医学のあゆみ* 2013;245(5):393-400. 査読無

〔学会発表〕(計 17 件)

Nishio S, Usami S. Deafness gene variations in a 1,120 nonsyndromic hearing loss cohort: Molecular

epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan. 第13回国際人類遺伝学会. 2016.4.3-7. 国立京都国際会館

Nishio S, Takumi Y, Usami S. Laser-capture micro dissection combined with next-generation sequencing analysis of cell type-specific deafness gene expression in the mouse cochlea. ARO 39th MidWinter Meeting. 2016.2.20-24. San Diego, California, USA

西尾信哉、宮川麻衣子、池園哲郎、石川浩太郎、岩崎聡、岡本牧人、小川郁、加我君孝、熊川孝三、小橋元、坂田英明、佐藤宏昭、佐野肇、曾根三千彦、高橋晴雄、武田英彦、東野哲也、内藤泰、中川尚志、西崎和則、野口佳裕、羽藤直人、原 晃、福田諭、松永達雄、山岨達也、宇佐美真一. 特発性両側性感音難聴患者に対する遺伝学的検査～次世代シーケンサーを用いた検査～. 第60回日本聴覚医学会総会・学術講演会. 2015.10.21-23. 京王プラザホテル、東京

西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一. 次世代シーケンサーを用いた日本人難聴患者1120例の網羅的遺伝子解析. 第60回日本人類遺伝学会. 2015.10.14-17. 京王プラザホテル、東京

西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一. 次世代シーケンサーを用いた日本人難聴患者1120例の網羅的遺伝子解析. 第25回日本耳科学会. 2015.10.7-10. 長崎ブリックホール

工 穰、西尾信哉、宇佐美真一. マウス蝸牛組織における難聴遺伝子の細胞特異的発現：レーザーキャプチャーと次世代シーケンサーによる解析. 第25回日本耳科学会. 2015.10.7-10. 長崎ブリックホール

岩佐陽一郎、西尾信哉、宇佐美真一. 優性遺伝形式をとる遺伝性難聴76家系に対する遺伝学的解析. 第25回日本耳科学会. 2015.10.7-10. 長崎ブリックホール

西尾信哉、宇佐美真一. 日本人難聴遺伝子変異データベースの構築と臨床応用. NGS Field 4th Meeting. 2015.7.1-3. つくば国際会議場

西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一. 日本人難聴遺伝子変異データベースの構築と臨床応用. 第59回日本聴覚医学会. 2014.11.27-28. 海峡メッセ下関

西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一. 日本人難聴遺伝子変異データベースの構築と臨床応用. 第59回日本人類遺伝学会. 2014.11.19-22. タワーホール船堀、東京

Nishio S, Miyagawa M, Naito T, Iwasa Y, Ichinose A, Usami S. Clinical Genetic Testing Based on Massively Parallel DNA Sequencing. Inner Ear Biology Workshop. 2014.11.1-4. Kyoto, Japan

西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一. 次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子診断システムの開発と臨床応用. 第24回日本耳科学会. 2014.10.5-18. 朱鷺メッセ、新潟市

西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、宇佐美真一. 次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析および遺伝的背景の解明. 第23回日本耳科学会. 2013.11.24-26. 宮崎シーガイア

西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、鎌谷直之、宇佐美真一. 次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析～同定された原因遺伝子と遺伝疫学～. 第58回日本人類遺伝学会. 2013.11.20-23. 仙台市

Nishio S, Usami S. Comprehensive genetic screening of hearing loss for efficient clinical molecular diagnosis. Life Technologies Asia Pacific Japan 2013 Genetic Analysis Summit. 2013.9.28-30. バリ、インドネシア

Nishio S, Miyagawa M, Naito T, Nakazono K, Kamatani N, Usami S. Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference. 2013.6.22-25. Stanford University USA

Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, Ishikawa K, Kojima

H, Namba A, Oshikawa C, Usami S.  
Comprehensive genetic screening of  
*KCNQ4* in a large autosomal dominant  
nonsyndromic hearing loss cohort;  
genotype-phenotype correlations and a  
founder mutation.9th Molecular  
Biology of Hearing and Deafness  
Conference. 2013.6.22-25. Stanford  
University Campus USA

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号：7 0 4 6 7 1 6 6

(2)研究分担者

内藤 武彦 (NAITO, Takehiko)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：5 0 4 6 7 1 6 4

(3)連携研究者

宇佐美 真一 (USAMI, Shin-ichi)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：1 0 1 8 4 9 9 6