

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 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02565

研究課題名（和文）遺伝子解析に基づいた難聴発症メカニズムの解明および個別化医療システムの構築

研究課題名（英文）Development of high throughput sequencing analysis based system for personalized medicine of deafness

研究代表者

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：10184996

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、信州大学の管理する難聴患者DNAバンクのうち、インベーター法を用いたスクリーニング検査で原因の明らかとならなかった難聴患者500名を対象に、難聴の原因遺伝子として報告されている遺伝子の網羅的解析を実施し、稀な原因遺伝子変異を見出すとともにその臨床像を明らかにすることができた。また、前項の既知難聴原因遺伝子の網羅的解析を行っても難聴の原因を特定できなかった症例のうち、家系内に複数罹患者をみとめ、なおかつ家族のDNA試料のある家系を対象に、全遺伝子のエクソン領域を網羅的に解析するエキソーム解析を行い、新規原因遺伝子候補を複数見いだすことができた。

研究成果の概要（英文）：Hearing loss is one of the most common congenital or early onset sensory disorders, appearing in one out of 700 to 1000 newborns, with 50% to 70% of cases attributable to genetic causes. Inherited hearing loss demonstrates great heterogeneity and approximately one hundred genes are estimated to be involved. In this study, we performed massively parallel DNA sequencing (MPS) analysis for the gene mutations of the previously reported deafness causing genes among a larger series of 500 unrelated Japanese hereditary hearing loss patients. As a result, we obtained the mutation spectrum and frequency of Japanese hearing loss patients and we also clarified clinical feature of each gene mutation case. In addition, we also identified the relatively rare causative gene mutations and its detailed clinical characteristics (Iwasa et al., 2016, Kitano et al., 2017, Kobayashi et al., 2018).

研究分野：耳鼻咽喉科学 耳科学

キーワード：難聴 遺伝子 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1000 名に 1 名に認められる比較的頻度の高い障害である。当研究室では、従来より難聴の遺伝子解析に取り組んでおり、数多くの遺伝子変異を発見・報告してきた(Usami et al. 2012 ほか業績欄参照)。また、2008 年に先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」として承認を受けて臨床応用が開始され、2012 年からは「遺伝学的検査（先天性難聴）」として保険収載され、日常の診療ツールとして必要不可欠な検査となってきた。

遺伝子診断により原因が明らかになることで、難聴の程度、難聴の型、進行性などが、あらかじめ予測可能となるため、治療法選択・治療計画立案の際に有用な情報となる。また、甲状腺腫や糖尿病などの随伴症状が予測可能となり、適切なフォローアップが可能となった。このように、患者ひとりひとりに応じた難聴のオーダーメイド医療を推進するためには、原因診断である遺伝子診断は欠かせないツールとなりつつある。

特に、ここ数年の研究ツールの進歩により、次世代シーケンサーが実用化され、1 ランあたり 6000 億塩基を読み取ることが可能となった。我々の研究室では、次世代シーケンサーという最新の研究ツールをいち早く難聴の遺伝子解析に応用することで、下記のようなパイロット研究の成果を得ており、従来の手法では不可能であった新規原因遺伝子／変異を効率的に探索可能であることを明らかにしてきた。

- ① 従来の解析では困難であった 100 種類の候補遺伝子を網羅的に解析し、稀な遺伝子変異を多数見出した。(PLoS One. 2013;8(8):e71381.)
- ② 人工内耳および EAS 症例の遺伝子を解析し、各治療法の対象となる症例より稀な原因遺伝子変異を同定した (PLoS One. 2013;8(10):e75793.)
- ③ Usher 症候群の候補遺伝子を網羅的に解析することで、Usher 症候群患者の 90%以上から原因遺伝子変異を同定可能である事を明らかにした (Yoshimura et al., 2014)

このように、次世代シーケンス解析により、今までの手法では解析不可能であった稀な難聴の原因遺伝子に関して網羅的に解析することが可能となったことより、既知の難聴原因遺伝子のスクリーニングと機能解析によりその発症メカニズムの解明が期待されている状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果をさらに発展させ、難聴患者 500 名を対象に

- ① 候補遺伝子の次世代シーケンサー解析を行い、新規変異を同定する。
- ② 大家系を対象に全遺伝子の解析を行い、新規原因遺伝子を明らかにする。
- ③ 新規遺伝子変異、新規原因遺伝子に関して、マウスおよび培養細胞を用い難聴発症のメカニズムを明らかにする。
- ④ 治療実態とその効果を収集し原因に応じた適切な治療法を明らかにする。
- ⑤ 最適な人工内耳の電極や種類の選択、人工内耳の装着効果を予測する。

以上の研究を行い、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析と、基盤となる発症メカニズムに関する研究、人工内耳等の治療効果の 3 つを結びつけることにより、患者ひとりひとりの原因に応じた「原因診断に基づいた難聴のオーダーメイド医療のシステムの確立」を目的とした。

3. 研究の方法

従来、難聴の遺伝子解析には直接シーケンス法および連鎖解析が主な解析ツールとして用いられてきたが、(1)100 種ある候補遺伝子のごく一部しか解析できない。(2)少子化により 1 家系あたりの人数が少なくなったため、劣性遺伝形式を取る場合や孤発例の新規原因遺伝子探索は極めて困難という問題点があり、新規原因遺伝子の解析は非常に困難な状況にあった。

本研究では、当研究室の難聴患者 DNA バンク(約 6500 名)のうち、インバーダー法を用いた難聴スクリーニング検査で原因の明らかとならなかった難聴患者 500 名を対象に下記の研究を実施した。

(1) 難聴原因遺伝子の網羅的解析

本研究では、研究を効率的に推進するために、当研究室の難聴患者 DNA バンク(約 6500 名)のうち、インバーダー法を用いた難聴スクリーニング検査で原因の明らかとならなかった難聴患者 500 名を対象に、難聴の原因遺伝子として報告されている遺伝子の網羅的解析を実施した。

原因遺伝子としては文献情報などを参照し、過去に難聴との関連が報告されている 140 遺伝子を対象にした。具体的には、ThermoFisher Scientific 社の AmpliSeq カスタムパネルを用い候補遺伝子領域を含む DNA 領域の網羅的増幅を行う。増幅後は次世代シーケンサー(Ion Proton)により塩基配列の決定を行なった。得られた塩基配列から、遺伝子変異領域を抽出し、ANNOVAR を用いてアノテーション付けを行い、医療用家系図、聴

力像などを参考に、候補となる遺伝子変異の絞り込みを行うとともに、家族サンプルを用いたセグリゲーション解析を行った。候補遺伝子変異の確認および家族サンプルのセグリゲーション解析は直接シーケンス法により実施した。

(2) 全遺伝子のエキソーム解析による新規難聴原因遺伝子の解明

前項の難聴原因遺伝子(140 遺伝子)の網羅的解析を行っても難聴の原因を特定できなかった症例のうち、家系内に複数罹患者をみとめ、なおかつ家族のDNA試料のある家系を対象に、全遺伝子のエクソン領域を網羅的に解析するエキソーム解析を行った。具体的には、Agilent社のSureSelect exomever 5.0を用い候補遺伝子領域を含むDNA領域の濃縮を行う。濃縮後は次世代シーケンサー(HiSeq2500)により塩基配列の決定を行なった。得られた塩基配列から、遺伝子変異領域を抽出し、ANNOVARを用いてアノテーション付けを行い、医療用家系図、聴力像などを参考に、候補となる遺伝子変異の絞り込みを行うとともに、家族サンプルを用いたセグリゲーション解析を行った。また、エキソーム解析では、遺伝形式、難聴の程度、難聴の型、めまいなどの症状の有無などの臨床像を基に難聴患者のグループ化を行い解析する事で共通の原因を見出す手法を組み合わせ用い、効率的に新規難聴原因遺伝子の同定を目指す方法にて解析を行った。

(3) 新規難聴遺伝子の機能解析および難聴発症メカニズムの検討

新規難聴原因遺伝子に関してはマウス内耳における発現部位を免疫組織染色で確認を行った。また抗体の入手が困難な遺伝子に関しては、*in situ* hybridizationをおこなうとともに、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを行い、遺伝子発現を確認し、内耳における機能的役割について検討を行った。

(4) 遺伝子型に基づいた適切な治療法の検討

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析により明らかとなった難聴の原因遺伝子変異の種類ごとに、遺伝形式、難聴の程度、難聴の型、めまいなどの症状の有無などの臨床像をとりまとめ詳細に検討を行う事により、遺伝子型と表現型の相関に関してその特徴を明らかにした。

特に難聴の程度とその進行度合いは、治療法の選択に関わる重要な要素であるため、詳細に検討を行う。また、治療法とその効果(装用閾値、語音弁別など)に関してとりまとめ詳細に検討を行う事により、遺伝子型ごとに適した治療法に関して検討を行った。

4. 研究成果

(1) 難聴原因遺伝子の網羅的解析

難聴原因遺伝子の網羅的解析としては、研究初年度に、当教室の管理する難聴患者DNAバンク(約6500名)のうち、717例を対象に、インバーダー法+次世代シーケンス法を用いた19遺伝子154変異の網羅的スクリーニング検査を行い原因遺伝子変異の種類と頻度を明らかにした(Mori et al., 2016)。

その結果、*GJB2* 遺伝子をもっとも頻度の高い原因であり、*SLC26A4*、*CDH23* 遺伝子の順であることが明らかとなった。また、原因遺伝子変異別に聴力像のまとめを行ったところ、*SLC26A4* 遺伝子、*CDH23* 遺伝子変異は先天性の高度～重度難聴に比較的多く見出されるのに対して、*KCNQ4* 遺伝子やミトコンドリア1555A>G 遺伝子変異は遅発性の中等度難聴に多く見出されることを明らかにした(図1)。

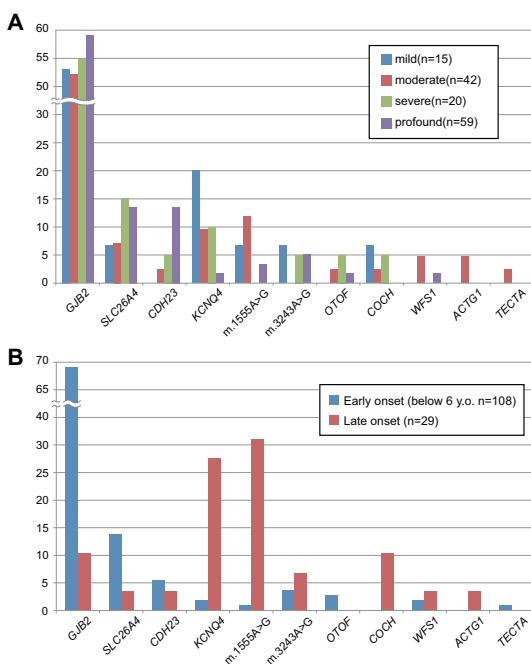


図1 日本人難聴患者の遺伝子変異別に見た聴力像と発症時期 (Mori et al., 2016)

また、上記スクリーニング検査を行っても原因の特定に至らなかった難聴患者を対象に次世代シーケンサーを用いた既知難聴原因遺伝子の網羅的解析を行い、稀な原因遺伝子変異による難聴家系を複数家系見出し報告した(Iwasa et al., 2016, Kitano et al., 2017, Kobayashi et al., 2018)。

特に、日本人難聴患者の網羅的解析により稀な原因遺伝子変異である *POU4F3* 遺伝子変異による難聴症例が見出されたが、15家系に見出された。従来、*POU4F3* 遺伝子変異による難聴は高音障害型感音難聴を呈すると報告されていたが、日本人難聴患者の解析により、若年時には中音域が障害されるいわゆ

る皿型の聴力像を呈するが、年齢とともに難聴が進行し、高音障害型難聴となり、最終的には聾型の聴力となることを明らかにした(図2:Kitano et al, 2017)。

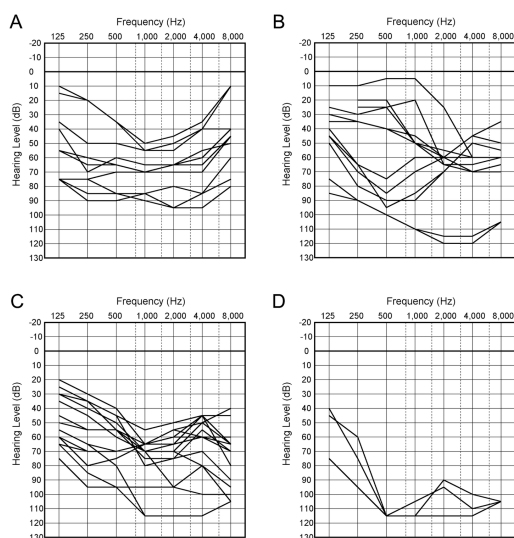


図2 POU4F3 変異による難聴症例の聴力像、A: 20-39 歳、B: 40-49 歳、C: 50-59 歳、D: 60 歳以上。若年時は皿形から水平型の聴力像を呈していたものが、その後高音域の難聴が進行し、高音障害型を経て聾型となることが明らかとなった。

また、低音障害型感音難聴の原因である *WFS1* 遺伝子に関して詳細に検討を行った。その結果、日本人難聴患者より 19 家系に 13 種類の原因遺伝子変異を見出した。見出された 19 家系はいずれも進行性の低音障害型感音難聴を呈していた。また、optic atrophy を伴う症例は 19 家系中 1 家系であり、稀な随伴症状であることが確認された。(Kobayashi et al., PLoS One 2018)

さらに、当教室の管理する難聴遺伝子データベースのうち 2540 例を対象に次世代シーケンズ解析を実施したデータを元に、コピー数多型を検出するプログラムの開発を行った。その結果、250 例より何らかのコピー数多型が見出された。

このうち、41 例 (1.7%) は *STRC* 遺伝子の 2 コピー欠失変異であり、常染色体劣性遺伝形式をとる難聴の原因となっていることが明らかとなった(図3: Nishio et al. 2018 in press.)。

(2) 全遺伝子のエキソーム解析による新規難聴原因遺伝子の解明

前項のスクリーニング解析を実施しても原因診断に至らなかった症例のうち、家系内罹患者が複数いる家系に関してエキソーム解析を行い、新規原因遺伝子の探索を行った。

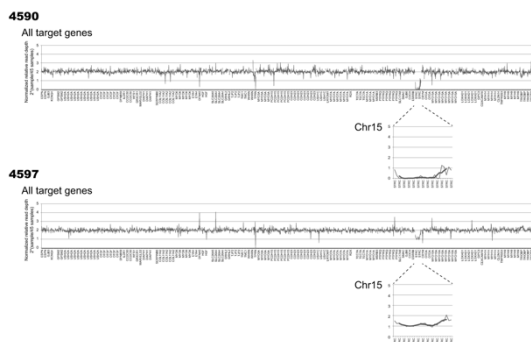
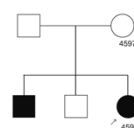


図3 *STRC* 遺伝子の 2 コピー欠失による難聴家系 (Nishio et al., 2018)

次世代シーケンズ解析のデータを用いてコピー数多型を検出する手法を開発し、難聴患者のスクリーニングを行った結果、1.4%程度に *STRC* 遺伝子の 2 コピー欠失による難聴が認められた。

その結果、複数の家系で新規の候補となる原因遺伝子を同定することができた。

また、見出された遺伝子変異のうち、機能的関連の比較的はっきりしていた *HOXA2* 遺伝子に関しては学会発表にて報告を行った。

(3) 新規難聴遺伝子の機能解析および難聴発症メカニズムの検討

本研究では日本人難聴患者より見出された非常に稀な原因遺伝子変異である *DIAPH1* 遺伝子変異に関して、共同研究により難聴発症の分子メカニズムの検討を行った。その結果、遺伝子変異により *DIAPH1* 遺伝子のオートレギュレーションに関与する部位が障害されることにより、アクチン繊維の過形成が生じ、結果的に難聴を生じるという分子メカニズムを明らかにすることができた (Ueyama et al. 2016)。

さらに、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により、蝸牛内の部位ごと (コルチ器、外側壁、ラセン靱帯、ラセン神経節) に既知難聴原因遺伝子の発現レベルに関して検討を行った結果、過去の免疫染色の結果と類似の遺伝子発現パターンを示すことを明らかにすることができた (Nishio et al, 2017)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

- ① Nishio SY, Moteki H, Usami SI. Simple and efficient germline copy number variant visualization method for the Ion AmpliSeq™ custom panel.、査読有、Mol Genet Genomic Med、2018、in press、doi: 10.1002/mgg3.399.
- ② Kobayashi M, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Fujikawa T, Ohyama K, Sakaguchi H, Miyano H, Sugaya A, Naito Y, Morita SY, Kanda Y, Takahashi M, Ishikawa K, Nagano Y, Tono T, Oshikawa C, Kihara C, Takahashi H, Noguchi Y, Usami SI. *WFS1* mutation screening in a large series of Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis.、査読有、PLOS One、Vol.13、2018、pp.e0193359、doi: 10.1371/journal.pone.0193359.
- ③ Arai Y, Takahashi M, Sakuma N, Nishio S, Oridate N, Usami SI. Compound heterozygous dominant and recessive *GJB2* mutations cause deafness with palmoplantar keratoderma.、査読有、Acta Otolaryngol、Vol.2、2017、pp.137-140、doi.org/10.1080/23772484.2017.1376587
- ④ Kitano T, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Oda K, Ohyama K, Miyazaki H, Hidaka H, Nakamura KI, Murata T, Matsuoka R, Ohta Y, Nishiyama N, Kumakawa K, Furutate S, Iwasaki S, Yamada T, Ohta Y, Uehara N, Noguchi Y, Usami SI. *POU4F3* mutation screening in Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis identified novel variants associated with autosomal dominant hearing loss.、査読、PLOS ONE、Vol.12、2017、pp.e0177636、doi: 10.1371/journal.pone.0177636.
- ⑤ Nishio SY, Takumi Y, Usami SI. Laser-capture micro dissection combined with next-generation sequencing analysis of cell type-specific deafness gene expression in the mouse cochlea.、査読有、Hear Res.、Vol. 348、2017、pp. 87-97、doi: 10.1016/j.heares.2017.02.017.
- ⑥ Nishio SY, Usami SI. The Clinical Next-Generation Sequencing Database: A Tool for the Unified Management of Clinical Information and Genetic Variants to Accelerate Variant Pathogenicity Classification.、査読有、Hum Mutat.、Vol. 38、2017、pp. 252-259、doi: 10.1002/humu.23160.
- ⑦ Moteki H, Nishio S, Miyagawa M, Tsukada K, Iwasaki S, Usami S. Long-term results of hearing preservation cochlear implant surgery in patients with residual low frequency hearing.、査読有、Acta Otolaryngol.、Vol.137、2017、pp.516-521、doi: 10.1080/00016489.2016.1252061.
- ⑧ Iwasa Y, Nishio S, Usami S. Comprehensive Genetic Analysis of Japanese Autosomal Dominant Sensorineural Hearing Loss Patients.、査読有、PLOS One、Vol.11、2017、pp.e0166781、doi: 10.1371/journal.pone.0166781.
- ⑨ 宇佐美真一、先天性難聴診療の実践、査読無、外来小児科、Vol.20、2017、pp.335-338.
- ⑩ 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一次世代シーケンサーの臨床応用一、査読有、Otol Jpn.、Vol.27、2017、135-140.
- ⑪ 西尾信哉、宇佐美真一、アッシャー症候群の特徴と診断基準、査読無、新薬と臨床、Vol.66、2017、pp.82-87.
- ⑫ 西尾信哉、宇佐美真一、難聴の遺伝学的検査の現状と展望、査読無、医学のあゆみ、Vol.261、2017、pp.337-339.
- ⑬ Ueyama T, Ninoyu Y, Nishio S, Miyoshi T, Torii H, Nishimura K, Sugahara K, Sakata H, Thumkeo D, Sakaguchi H, Watanabe N, Usami S, Saito N, Kitajiri S. Constitutive activation of *DIA1* (*DIAPH1*) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss.、査読有、EMBO Molecular Medicine、Vol.8、2016、pp.1310-1324、doi: 10.15252/emmm.201606609.
- ⑭ 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.、査読有、PLOS ONE、Vol.11、2016、pp.e0162230、doi: 10.1371/journal.pone.0162230.
- ⑮ Moteki H, Azaiez H, Sloan-Heggen CM, Booth K, Nishio S, Wakui K, Yamaguchi T, Kolbe DL, Iwasa Y, Shearer AE, Fukushima Y, Smith RJ, Usami S. Detection and Confirmation of Deafness-Causing Copy Number Variations in the *STRC* Gene by Massively Parallel Sequencing and Comparative Genomic Hybridization.、査読有、Ann Otol Rhinol Laryngol.、Vol.125、2016、pp.918-923、doi: 10.1177/0003489416661345

- ⑩ Sakuma N, Moteki H, Takahashi M, Nishio S, Arai Y, Yamashita Y, Oridate N, Usami S.、An effective screening strategy for deafness in combination with a next-generation sequencing platform: a consecutive analysis.、査読有、J Hum Genet、Vol.61、2016、pp.253-261、doi: 10.1038/jhg.2015.
- ⑪ Miyagawa M, Nishio S, Usami S.、A Comprehensive Study on the Etiology of Patients Receiving Cochlear Implantation With Special Emphasis on Genetic Epidemiology.、査読有、Otol Neurotol.、Vol.37、2016、pp.e126-e134、doi: 10.1097/MAO.0000000000000936.
- ⑫ Yoshimura H, Miyagawa M, Kumakawa K, Nishio S, Usami S.、Frequency of Usher syndrome type 1 in deaf children by massively parallel DNA sequencing.、査読有、J Hum Genet.、Vol. 61、pp. 419-422、doi: 10.1038/jhg.2015.168.
- ⑬ 西尾信哉、宇佐美真一、難聴の遺伝子診断とその臨床応用、査読無、耳鼻臨床、Vol.109、2016、pp.828-829.
- ⑭ 宇佐美真一、聴覚障害と遺伝子、査読無、Medical Science Digest、Vol.42、2016、pp.166-169.

〔学会発表〕(計 54 件)

1. Usami SI. Social health insurance-based comprehensive genetic testing clarified the molecular epidemiology of deafness (poster). Association for Research in Otolaryngology (ARO). 2018.
2. 宇佐美真一. 患者のための遺伝子診断を目指して～難聴医療での実践～ Genetic diagnosis for patients～practice in hearing-impaired medical care～. 第37回医療情報学連合大会. 2017.
3. 宇佐美真一、茂木英明、宮川麻衣子、西尾信哉. 保険収載された難聴の遺伝学的検査の現状 (Current status of social health based genetic testing for deafness). 第62回日本人類遺伝学会. 2017.
4. 宇佐美真一. 難聴とミトコンドリア遺伝子変異. ミトコンドリアシンポジウム. 2017.
5. Usami SI. Genetics of deafness. ENT WORLD CONGRESS (IFOS) 2017.
6. 宇佐美真一. 耳鼻咽喉科領域の遺伝子診断. 第118回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会. 2017.
7. 宇佐美真一. 難聴医療従事者に必要な遺伝子診断の知識. 第61回日本聴覚医学会総会. 2016.
8. 宇佐美真一. 内耳研究に魅せられて：形態学から遺伝子研究まで. 第26回日

本耳科学会. 2016.

9. Usami SI. EAS IN CHILDREN-WITH SPECIAL REFERENCE TO ETIOLOGY (poster). Collegium Oto - Rhino - Laryngologicum Amicitiae Sacrum. 2016. 2016.

(他、国内学会での発表 36 件、国際学会での発表 9 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(1) 研究分担者

茂木 英明 (MOTEGI, 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：6 0 4 2 2 6 9 8

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