

令和元年6月14日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19863

研究課題名（和文）分子疫学解析による難聴関連遺伝子の同定とゲノム個別化予防に向けた研究

研究課題名（英文）Genetic and epidemiological analysis of noise-induced hearing loss (NIHL) towards its tailor-made medicine and prevention

研究代表者

四ノ宮 成祥（Shinomiya, Nariyoshi）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・分子生体制御学・教授

研究者番号：40505260

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：騒音に起因する聴覚障害（難聴）において、騒音に対する感受性には大きな個人差があり、この最も大きな原因は遺伝的背景（遺伝子多型の個人差）であると考えられているが、その詳細は明らかではない。本研究では「自衛隊員の50歳時健診の対象者」を対象とすることで、加齢性難聴など年齢による影響を除外した形で、聴力及び健診データの網羅的遺伝子解析に取り組み、その研究リソース及び共同研究体制の整備を実施した。さらに、NRF2を含む難聴の候補遺伝子解析と難聴のゲノムワイド関連解析（GWAS）を実施した。本研究により、騒音性難聴を含むゲノム個別化予防・医療につながる研究成果が世界に先駆けて得られることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、難聴の感受性遺伝子の同定において複数の観点から理想的な対象サンプルの解析を大規模かつ網羅的に実施した。世界の人口の1割が悩まされている「難聴」、特に「感音難聴」には騒音性難聴の他、加齢性難聴（老人性難聴）も含まれるが、両者には酸化的ストレスなどの共通したメカニズムがあることが知られている。これまでの我々の成果からも、騒音性難聴になりやすい遺伝子多型が見いだされ、その予防への応用に資する成果が得られている。そのため、難聴の予防に資する遺伝子の発見を目的とした本研究は、日本のみならず世界の人の健康増進や高齢化社会における活躍機会の増進にも大いに役立つことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Noise-induced hearing loss (NIHL) is one of the most common sensorineural hearing deficits. It is known that susceptibility to NIHL greatly depends on individual variation, but it is remained to be clarified. In the present study, subjects are from participants of health checkups for 50-years-old Japanese Defense Force personnel. We performed comprehensive genetic analysis on their data including hearing tests and laboratory data of health checkups. We also conducted the establishment of research resource and preparation of cooperation on the analyses. Moreover, we performed target gene analysis for candidate genes of hearing loss including NRF2, and a genome-wide association analysis (GWAS) of NIHL. These analyses will provide the results which lead personalized genomic prevention and medication for NIHL.

研究分野：医師薬学

キーワード：分子遺伝疫学 個別化予防 QOL 聴力 予防医学・疫学

1. 研究開始当初の背景

防衛医大では、これまでに自衛隊員の50歳時健診の臨床データとゲノム等の生体試料の収集が継続的に実施されており、一部の検体についてはゲノムワイド関連解析 (GWAS) ための遺伝子タイピングも実施されている。自衛隊員は射撃訓練などの職場環境から騒音性難聴になりやすい傾向があり、50歳時健診サンプルは難聴の関連遺伝子の同定にも役立つ可能性が高い。実際に申請者らは2016年1月に、酸化ストレスに保護的に働く NRF2 遺伝子の遺伝子多型 (SNPs) が騒音性難聴に関連することを論文発表した (Honkura, Matsuo, et al. Sci Rep, 2016; 図1は該当論文掲載に関する記事)。本論文では、NRF2 ノックアウトマウスが騒音性難聴の表現型を呈することを示すとともに、上記の騒音暴露が比較的多いと考えられる自衛隊員の50歳時健診対象者を用い NRF2 が騒音性難聴の予防に資する遺伝子であることをヒトにおいて示すことができた。騒音性難聴の感受性遺伝子は、このような騒音暴露が多く、かつ比較的均一な集団を対象とすることにより同定が期待されるが、上記の50歳時健診サンプルはその解析において、非常に適した対象であることが期待できる。さらに、GWAS のための遺伝子タイピングが一部実施済みであることから、それらのデータを用いて、騒音性難聴に関する GWAS と2次解析のほか、次世代シーケンサー (NGS) を用いたターゲットシーケンスを実施する研究構想に基づきその準備が既に整っている。

この構想に基づく研究を実施することにより、世界に先駆けて騒音性難聴を含む難聴の新規遺伝子座の同定と、その分子病態の解明につながる成果が期待できることから本研究申請に至った。

大きな音を聞いた後に聴力が低下する「騒音性難聴」の予防につながる遺伝子を見つけたと、東北大や防衛医大のチームが、18日の英科学誌サイエンティフィック・リポーツに発表した。

チームは、たばこの煙に対するストレスなどに関係する遺伝子「NRF2」が働かないマウスを作製。大きな音を聞かせると、通常のマウスよりも難聴になりやすいことが判明した。逆に通常のマウスにNRF2の働きを強める薬を投与する

東北大や防衛医大

「騒音性難聴」に予防遺伝子

大音量でも聴力低下しにくく

その後、射撃訓練などで大きな音にさらされる陸上自衛隊員約600人を調べたところ、NRF2の働きが弱い隊員は、他の隊員に比べて、約1.3倍聴力が低下しやすいことがわかった。

東北大の本橋ほづみ教授(生化学)は「予防薬の開発につながる」と話している。

名古屋大の内田浩二教授(生化学)の話「騒音性難聴にNRF2が関わることを示した意義は大きい。予防医学への道を開く研究だ」

2016/1/19 読売新聞に掲載

騒音性難聴の発症リスク判定

大きな音を聞くことで聴力が下がる「騒音性難聴」になりやすいかどうかに関わる遺伝子を見つけたと、東北大と防衛医大などの研究チームが18日付の英科学誌サイエンティフィック・リポーツに発表した。この遺伝子のわずかな配列の違いで、騒音性難聴のリスクが高い人が分かるとい

騒音性難聴は大きな音がきっかけで耳の中の細胞が減ってしまい、聴力が低下する病気。チームは肝臓などで体を守る働きをしているNRF2という遺伝子に注目。この遺伝子が働かないマウスに大きな音を聞かせると、聴力が下がりやすかった。

この遺伝子がつくるたんぱく質を長持ちさせる薬を事前に投与しておくと、大きな音を聞いても聴力が下がりにくく、耳の中の細胞もきちんと保たれることがわかった。

また、人ではこの遺伝子のわずかな配列の違いで、働き具合が異なることが分かっている。そこで、健康診断を受けた50歳の陸上自衛隊員602人の聴力と、遺伝子の配列の違いを調査。特定の配列の違いがある人は、聴力低下のリスクが高かった。

NRF2の働きを活発にする成分はプロコリスフラウトなどの食品にも含まれている。東北大加齢医学研究所の本橋ほづみ教授(生化学)は「遺伝子検査で騒音性難聴になりやすいと分かれば、大きな音に注意したり、活性化する食物をしっかり食べたりして予防に重点を置くことができる」と話している。(合田様)

東北大など 遺伝子の配列注目、予防にも

2016/1/19 朝日新聞に掲載

図1 騒音性難聴の予防遺伝子同定に関する新聞掲載記事

(Honkura, Matsuo, et al. Sci Rep, 2016)

2. 研究の目的

本研究は、分子遺伝疫学的アプローチにより騒音性難聴を含む難聴・耳鳴の予防に資する遺伝子を同定し、分子病態を解明するとともに、新たな視点からの予防医学への応用に資する成果を目指すことを目的とする。その目的達成のために、期間内に以下の4項目における成果を目指す。

- 〈1〉 難聴・耳鳴研究のみならず健診データ解析にも適した研究リソースと研究基盤の構築
- 〈2〉 NRF2 を含む候補遺伝子解析による難聴・耳鳴の予防に資する遺伝子の同定
- 〈3〉 ゲノムワイド関連解析 (GWAS) による難聴・耳鳴の関連遺伝子の同定
- 〈4〉 得られた成果をもとにしたゲノム個別化予防の観点からの予防医学への応用

3. 研究の方法

「本研究の目的」の欄に記した〈1〉から〈4〉の成果を挙げるために、本研究では以下の(1)から(4)の4項目を順次実施した。

まず、研究体制について説明する。研究組織のうち、研究代表者(四ノ宮成祥)が研究の総括を行い、研究分担者の山本健(久留米大学医科学教室)がゲノムワイド解析を含む大規模遺伝子解析を実施し、松尾洋孝は分子遺伝疫学解析を行うとともに、さらに必要な2次解析および次世代シーケンサー(NGS)を用いたターゲットシーケンシングを実施する。連携研究者には、防衛医大・耳鼻咽喉科学講座の塩谷彰浩、水足邦雄の両氏が加わっており、耳鼻咽喉科学的な知見から臨床データの解析について共同研究をしていた体制にある。本研究では、さらに自衛隊中央病院における自衛隊員の50歳健診受験者を対象とした難聴の解析が主眼の1つであるため、自衛隊中央病院耳鼻咽喉科の森田一郎部長、他ジオグラムの評価を含む臨床医学的解析を継続して実施していく研究体制にある。

そのような研究体制のもと、5項目の研究計画・方法についてそれぞれ説明を加える。

(1) 難聴及び健診データの網羅的遺伝子解析に適した研究リソース及び共同研究体制の整備

本研究におけるもっとも重要な研究リソースは、自

衛隊の50歳健診受験者対象者のオージオグラムを含む臨床情報とゲノムサンプルである。一部はGWASのための遺伝子タイピングも実施しているため、非常に重要な研究リソースである。これらのサンプルは年齢が50歳と均一でオージオグラムのデータがあるだけでなく、それ以外の臨床データ(血液、尿検査、内視鏡、X線・超音波等の画像検査)も存在するため、この研究リソースは、難聴・耳鳴以外の健診データの網羅的遺伝子解析にも活用できるという優れた特長を有するものである。すなわち、生活習慣病を含む種々の臨床データも活用可能で、他研究への応用可能性もあるだけでなく、それらのデータとの相互作用の解析も可能である。そのような観点からも、研究リソースの整備を行い、将来の他研究への活用可能性等も意識して共同研究体制を含めた研究基盤の構築を目指す。

(2) NRF2 を含む難聴の候補遺伝子解析と分子機能解析

GWASに先立ち、まずは難聴の候補遺伝子解析を実施する。既に、NRF2遺伝子については、図2のように、難聴の候補遺伝子解析において、有意な関連を認めている(図1)。NRF2の酸化的ストレスから保護的に作用する機能は既に知られておりNRF2ノックアウトマウスを用いた動物モデルの解析によっても、その病態の解析が実施できたため、後述のようなNRF2を介した難聴の分子病態モデルを報告することができている。そのような視点から、NRF2遺伝子の解析をさらに対象例数を増やして実施してサブタイプ解析を含めて実施した。

NRF2以外にも、これまでの知見から重要な候補遺伝子群をすでに選択済みであり、一部については興味深い知見が得られつつある。このように、今回の主対象とする自衛隊の50歳健診受験者対象者は、難聴の遺伝子解析に非常に適したサンプルであることが分かっており、以降の(3)を含めて、丁寧な解析を進めていくことで、重要な難聴感受性遺伝子の同定や、その中から予防遺伝子の同定が大いに期待される。

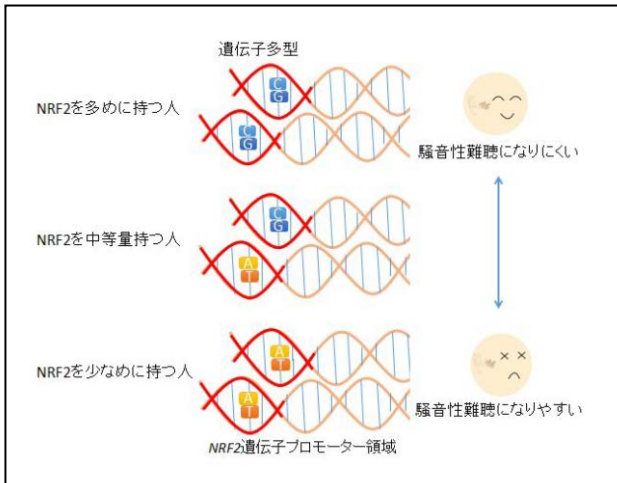


図2 NRF2 遺伝子多型による騒音性難聴

(3) 難聴のゲノムワイド関連解析 (GWAS) の実施
 すでに自衛隊の50歳健診受験者については1000人以上についてGWASのための遺伝子タイピングデータ(イルミナ社HumanOmniExpressのチップを使用)があるが、分子遺伝疫学的解析はこれからの状況にある。難聴および耳鳴についてのGWASを実施した。

(4) 難聴・耳鳴のゲノム個別化予防を含め、更なる応用のための研究。図2の例に示すようなゲノムの個人差が難聴・耳鳴のなりやすさを規定することを、複数の遺伝子座で明らかにすることで、ゲノム個別化予防に活用することが期待できる。例えば、NRF2の量や機能が少ない人は、騒音性難聴になりやすいことが申請者らの2016年1月に発表した上述の論文で明らかになったが、①騒音性難聴になりやすい方はより予防に努めること(耳栓などの適切な使用)、②NRF2の機能を高めるような食事摂取(例; ブロッコリースプラウトにはNRF2の機能を高める作用あり; 図1右の新聞記事にも記載あり)を推奨するなどといった図3のようなゲノム個別化予防への活用が期待できる。

4. 研究成果

①難聴及び健診データの網羅的遺伝子解析に適した研究リソース及び共同研究体制の整備: 自衛隊の50歳健診受験者対象者のオージオグラムを含む臨床情報とゲノムサンプルの整備を行った。これらのサンプルは年齢が50歳と均一でオージオグラムのデータがあるだけでなく、それ以外の臨床データも存在するため、難聴以外の健診データ

の網羅的遺伝子解析にも活用できる。

②NRF2を含む難聴・耳鳴の候補遺伝子解析と分子機能解析: 既に、NRF2遺伝子については、難聴の候補遺伝子解析において、有意な関連を認めている。NRF2遺伝子の解析をさらに対象例数を増やして実施してサブタイプ解析を含めて実施できる体制となった。

③難聴のゲノムワイド関連解析 (GWAS) の実施とゲノムワイド imputation の実施: すでに自衛隊の50歳健診受験者については1000人以上についてGWASのための遺伝子タイピングデータがあるが、分子遺伝疫学的解析はこれからの状況にある。さらなるGWASを実施するとともに、ゲノムワイド imputation を実施することにより、チップに搭載のSNP以外についても関連解析を実施して、より詳細な感受性SNPの探索を実施できる体制ができた。

④2次解析及び次世代シーケンサー (NGS) による fine mapping の実施と分子機能解析: ③の解析で見いだされた候補SNPについては、さらにTaqMan法などによる2次解析を実施することで、難聴の感受性SNPの同定を目指した。また、感受性SNP及び候補SNPの遺伝子領域をNGSによるターゲットシーケンスを実施することで、真の病変SNPの同定を目指している。

⑤難聴のゲノム個別化予防を含め、更なる応用のための研究について以下にも記載するように実施できる体制と基盤が構築できた。

①~⑤の研究の推進により、本研究では、GWASを含む分子遺伝疫学解析が実施できその体制を確立できた。それにより、騒音性難聴を含む難聴の関連遺伝子を同定し、その分子病態を解明して、ゲノム個別化予防への応用を目指すことができる状態となっている。現在、すでにタイピングされた解析結果などの評価のほか、よりよい成果を目指すための追加解析などを実施しており、本科学研究費の成果として、国際的に価値の高い研究成果が十分に期待できる状況となった。我々は痛風、尿酸に関連する研究も並行して実施しており、common diseaseと遺伝子の関連について複数の成果をあげてきたが、その経験を難聴の解析においても役立てることができると考えている。とくに、

難聴のゲノム個別化予防を含め、更なる応用のための研究：ゲノムの個人差が難聴のなりやすさを規定することを、複数の遺伝子座で明らかにすることで、ゲノム個別化予防に活用することが期待できる。例えば、NRF2 の量や機能が少ない人は、騒音性難聴になりやすいことを我々は明らかにしたが、そのような人には耳栓などの適切な使用、NRF2 の機能を高めるような食事摂取（例；ブロッコリースプラウトには NRF2 の機能を高める作用あり）を推奨するなどといったゲノム個別化予防への活用が期待できる。

<引用文献>

Y. Honkura, H. Matsuo, S. Murakami, M. Sakiyama, K. Mizutari, A. Shiotani, M. Yamamoto, I. Morita, N. Shinomiya, T. Kawase, Y. Katori, H. Motohashi, NRF2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea. *Sci Rep*, 6, 19329 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① A. Nakayama, H. Nakaoka, K. Yamamoto, M. Sakiyama, A. Shaukat, Y. Toyoda, Y. Okada, Y. Kamatani, T. Nakamura, T. Takada, K. Inoue, T. Yasujima, H. Yuasa, Y. Shirahama, H. Nakashima, S. Shimizu, T. Higashino, Y. Kawamura, H. Ogata, M. Kawaguchi, Y. Ohkawa, I. Danjoh, A. Tokumasu, K. Ooyama, T. Ito, T. Kondo, K. Wakai, B. Stiburkova, K. Pavelka, L. K. Stamp, N. Dalbeth, Eurogout Consortium, Y. Sakurai, H. Suzuki, M. Hosoyamada, S. Fujimori, T. Yokoo, T. Hosoya, I. Inoue, A. Takahashi, M. Kubo, H. Ooyama, T. Shimizu, K. Ichida, N. Shinomiya, T. R. Merriman, H. Matsuo; Eurogout Consortium. GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Ann Rheum Dis*, 76, 869-877 (2017) doi: 10.1136/annrheumdis-2016-209632. 査読有り

② T. Higashino, T. Takada, H. Nakaoka, Y.

Toyoda, B. Stiburkova, H. Miyata, Y. Ikebuchi, H. Nakashima, S. Shimizu, M. Kawaguchi, M. Sakiyama, A. Nakayama, A. Akashi, Y. Tanahashi, Y. Kawamura, T. Nakamura, K. Wakai, R. Okada, K. Yamamoto, K. Hosomichi, T. Hosoya, K. Ichida, H. Ooyama, H. Suzuki, I. Inoue, T. R. Merriman, N. Shinomiya, H. Matsuo. Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout. *RMD Open*, 3, e000464 (2017) doi:10.1136/rmdopen-2017-000464.

査読有り

③ T. Higashino, H. Matsuo, Y. Okada, H. Nakashima, S. Shimizu, M. Sakiyama, S. Tadokoro, A. Nakayama, M. Kawaguchi, M. Komatsu, A. Hishida, M. Nakatochi, H. Ooyama, J. Imaki, N. Shinomiya. A common variant of MAF/c-MAF, transcriptional factor gene in the kidney, is associated with gout susceptibility. *Hum Cell*, 31, 10-13 (2018). doi: 10.1007/s13577-017-0186-6. 査読有り

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松尾 洋孝

ローマ字氏名：Hiroataka Matsuo

所属研究機関名：防衛医科大学校

部局名：分子生体制御学講座

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00528292

研究分担者氏名：山本 健

ローマ字氏名：Ken Yamamoto

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：60274528

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：塩谷 彰浩

ローマ字氏名：Akihiro Shiotani

研究協力者氏名：水足 邦雄

ローマ字氏名：Kunio Mizutari

※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、研究者個人に帰属されます。