

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09865

研究課題名（和文）新規ANSD原因遺伝子の探索と臨床的特徴の解明に関する研究

研究課題名（英文）Identification of novel causative gene of auditory neuropathy spectrum disorder

研究代表者

野口 佳裕（Noguchi, Yoshihiro）

国際医療福祉大学・医学部・教授

研究者番号：50282752

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：1000人に1人の割合で先天性難聴児が産まれる。先天性難聴の半数は遺伝性難聴が原因である。難聴の遺伝子解析は確定診断とともに人工内耳の効果推定に有用である。今回の研究では、常染色体優性遺伝形式のauditory neuropathy spectrum disorderと常染色体優性遺伝形式の後天性感音難聴の2家系に遺伝子解析を行った。前者の家系では新規原因遺伝子の同定に至らなかったが、後者の家系ではTNC遺伝子に病的バリエーションを認めた。TNCバリエーションを有する患者では人工内耳が効果的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では、2012年4月より「先天性難聴」の遺伝子診断が保険収載されている。しかし、非症候群性遺伝性難聴においても現時点で120以上の原因遺伝子が同定されており、保険での検査で原因が同定されない遺伝性難聴も多数存在する。難聴の遺伝子解析は、分子病態評価、指定難聴の診断とともに人工内耳の予後予測に有用である。今回、優性遺伝性難聴の1家系にTNCバリエーションを同定し、人工内耳効果が良好であることを明らかにした。希少な難聴の原因遺伝子においても病態や治療効果を評価することが、社会的に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：One in 1000 infants are born with congenital hearing loss. The etiology is hereditary hearing loss in a half of the infants with congenital hearing loss. The genetic analysis of hearing loss is useful in definite diagnosis as well as prediction of cochlear implant efficacy. In the present study, genetic analysis was performed in a family with autosomal dominant auditory neuropathy spectrum disorder and another family with autosomal dominant late-onset sensorineural hearing loss. Novel causative gene was not able to be found in the former family, whereas a pathogenic variant in TNC was detected in the latter family. Cochlear implant was effective in patients with TNC variant.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝子 難聴 ANSD 内耳奇形

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性難聴は出生数 1000 人に 1 人と高頻度で発症する感覚器障害であり、原因の半数以上は遺伝性難聴である。また、若年発症型両側性感音難聴を始めとする後天性難聴の中にも遺伝性難聴が存在する。難聴の遺伝子解析は、確定診断とともに内耳(蝸牛)の分子病態の解明に有用である。

(2) 本邦では、2012 年 4 月より「先天性難聴」の遺伝子診断が保険収載された。そして、2015 年 8 月より次世代シーケンサーが解析手法として導入されている。難聴の遺伝子解析は、遺伝カウンセリング、「若年発症型両側性感音難聴」「アッシャー症候群」などの指定難病の診断などに有用である。さらに、原因遺伝子に基づく難聴の新分類、分類ごとの分子病態評価が可能になる点で大きな利点がある。

(2) 遺伝子診断の有用性を示す 1 つとして、人工内耳医療への臨床応用が挙げられる。すなわち、2014 年に改定された「小児人工内耳適応基準」では例外的適応条件として難聴遺伝子変異に関する項目が明記されている。そして、研究分担者(宇佐美、西尾)らは *GJB2* を始めとする内耳に発現する遺伝子に変異が認められた場合の人工内耳成績は良好であることを明らかにした。一方、蝸牛神経に発現する遺伝子に変異が認められた場合、補聴器や人工内耳の効果は限定される可能性がある。

(3) auditory neuropathy spectrum disorder (以下、ANSD) は、正常に保たれた外有毛細胞機能(正常な耳音響放射あるいは蝸電図 CM)と高度に障害された ABR という機能検査所見から診断される感音難聴である。ANSD では、内有毛細胞、シナプス、ラセン神経節細胞、蝸牛神経、蝸牛神経核までの異なる部位に障害が生じうる。障害部位により人工内耳の効果が限定されるが、現存の機能検査から障害部位を明らかにすることは困難である。伝子が同定されているが、未だ原因が明らかとなっていない症例も多く新規原因遺伝子の関与が想定されている。

2. 研究の目的

(1) 先天性高度難聴の半数以上は遺伝子が原因であり、難聴の遺伝子解析は確定診断のみならず分子病態解明のためにも重要である。研究代表者らは、三世代にわたる常染色体優性遺伝形式の ANSD 家系に対して全エクソーム解析を行い 23 の原因候補遺伝子を同定している。

(2) 若年発症型両側性感音難聴などの後天性難聴の中にも遺伝性難聴は存在する。日本人難聴患者 DNA バンクから ANSD 家系を選定するにあたり、研究代表者らは五世代の常染色体優性遺伝形式の後天性難聴家系を見出した。これまでの遺伝学的検査では原因遺伝子が同定されていなかった。

(3) 本研究では、ANSD 家系、後天性難聴の 2 家系に対して遺伝学的解析を行い、新規原因遺伝子の同定と病態解明、人工内耳予測に関する臨床応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ANSD 家系に関しては、信州大学の日本人難聴患者データベース(約 10000 家系)の中から臨床所見より優性遺伝の ANSD と診断される家系を選定する。選定された家系の発端者に対して、23 遺伝子の翻訳領域を PCR にて増幅し直接シークエンス法(あるいは次世代シークエンス法)により遺伝子解析を行う。同定されたバリエーションに対して、公的データベース(1000 人ゲノム計画や 6500 エクソーム計画など)におけるアリル頻度、*in silico* 解析結果などからフィルタリングを行う。絞り込まれた原因候補遺伝子バリエーションに対しては、家族構成員の遺伝子解析を行い、難聴の有無との整合性(セグリゲーション)を確認し、原因遺伝子を同定する。

同定された原因遺伝子の中で、抗体が入手可能なものであれば、蛍光抗体法による免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡にて内耳、蝸牛神経内の局在を確認する。具体的には、生後 1 日、3 週、2 カ月の近郊系マウス(C57BL/6 など)から迷路骨胞を摘出し、4%パラフォルムアルデヒドにて還流固定する。各遺伝子に対する抗体により免疫染色を行い、内耳、蝸牛神経内における発現の有無と局在を観察する。特に ANSD を起こしうる部位に局在を示すか否かを十分に検討する。

(2) 後天性難聴家系に関しては、発端者以外の家族構成員(正常者含む)から DNA 抽出のための採血を行い、臨床経過の聴取、純音聴力検査、歪成分耳音響放射、温度刺激検査、CT、MRI を施行した。遺伝子解析として、全エクソーム解析(Ion Proton シークエンサー、Ion AmpliSeq Exome キット)を用いた。得られたバリエーションは、直接シークエンス法にて確認した。

4. 研究成果

(1) ANSD 家系

信州大学の日本人難聴患者データベース(約 10000 家系)の中に常染色体優性遺伝形式の ANSD 2 家系が存在した。発端者に対して 23 の原因候補遺伝子の翻訳領域を直接シーケンス法にて解析したが病的と考えられるバリエーションは認められなかった。そのため、今回の研究では新規 ANSD 原因遺伝子の同定には至らなかった。

(2) 後天性難聴家系

五世代の常染色体優性遺伝性難聴家系(図 1)を対象とした。発端者(V:3)は 13 歳、男児であり、小学校 5 年の健診で難聴を指摘された。遺伝学的検査目的に信州大学耳鼻咽喉科を受診し、両感音難聴 7 例、正常聴力 3 例、一側聾 1 例に対して遺伝子解析を行った。両感音難聴 7 例の難聴は、小学校 5 年から 30 代で発症し、進行性であった。めまいの自覚は認められなかった。オーディオグラム(図 2)は左右差のない感音難聴を示し、聴力型は高音障害型、水平型、皿型であった。歪成分耳音響放射は、V:3 は高音域、他の例は測定された全ての周波数で両耳反応が低下していた。III:8、III:10、IV:13 に人工内耳手術を施行した。術前の温度刺激検査では、III:8 の右耳にのみ反応低下がみられた。側頭骨 CT、頭部 MRI にて明らかな異常はなく、人工内耳成績は良好であった。

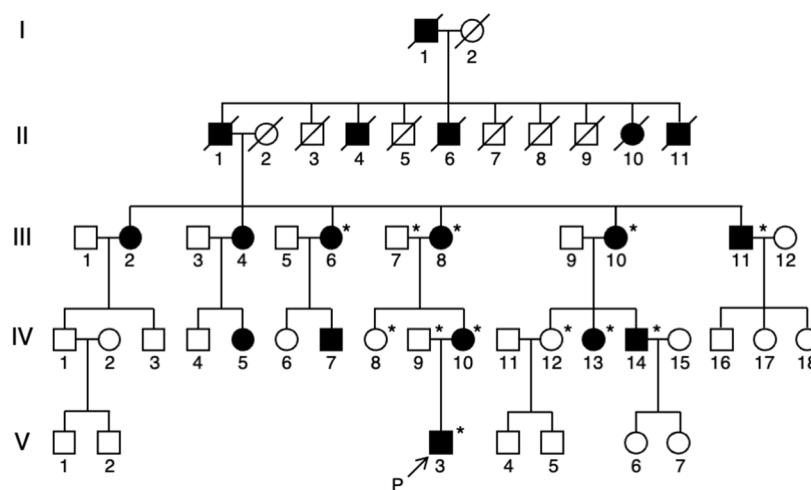


図1 家系図

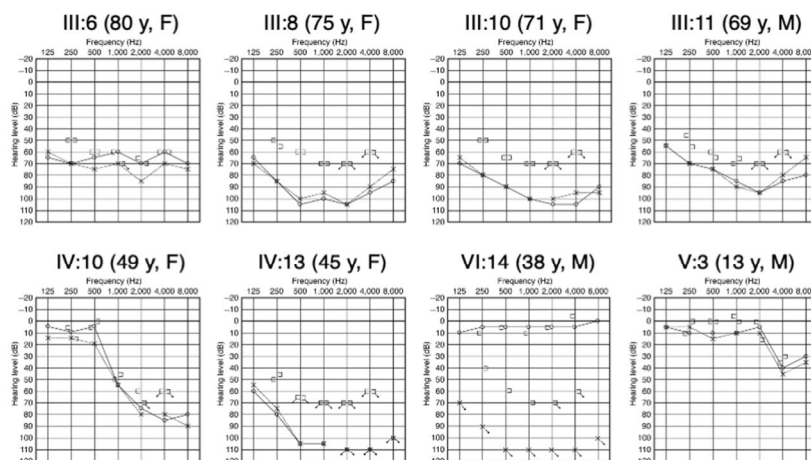


図2 オーディオグラム

10 例を対象に全エクソーム解析を行った。また、全 11 例を対象に候補バリエーションの有無を直接シーケンス法にて確認した。一側聾例を除く 10 例のセグリゲーション解析により、2 つの候補遺伝子 (*TPST2*, *TNC*) に絞られた。一側聾例は *TPST2* バリエーションを認めたが、*TNC* バリエーションは認められなかった。一側聾例は表現型模写の可能性が高く、*TNC* は難聴遺伝子として報告されていることから、*TNC* の新規ミスセンスバリエーションが難聴の原因と考えられた。

TNC がコードする tenascin-C は細胞外マトリックス糖タンパクであり、ヒト蝸牛において支持細胞下部の基底膜、骨ラセン板に局在する (A Ishiyama ら、2009)。collagen IV などの他の基底膜に発現するタンパクと同様に、内耳内イオンホメオスタシスを担うと考えられている。一方、*TNC* は常染色体優性非症候群性遺伝性難聴 (DFNA56) の原因遺伝子として 2013 年に報告された (J Wang ら、2013)。Wang らは中国人 2 家系を報告しており、今回の家系は 3 家系目に相当するため、*TNC* は稀な難聴遺伝子と考えられた。中国人の 1 家系は低音障害型感音難聴であり DFNA56 に特徴的な聴力型はないが、めまいのない後天性の進行性難聴を示した。今回の結果から人工内耳の効果は良好と考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

野口佳裕、上斗米愛実、この 1 冊でわかる遺伝学的検査 - 基礎知識と臨床応用 遺伝性難聴、耳鼻咽喉科・頭頸部外科、査読無、94 巻、2022 年、1024-1027

野口佳裕、遺伝性難聴入門、Audiology Japan、査読無、65 巻、2022 年、169-176

野口佳裕、西尾信哉、宇佐美真一、次世代シーケンサーによる遺伝子診断の有用性とピットフォール、Otology Japan、査読有、31巻、2021年、125-130

〔学会発表〕（計2件）

野口佳裕、教育セミナー2、遺伝性難聴入門、第66回日本聴覚医学会総会・学術講演会、2021

野口佳裕、臨床セミナー めまい・平衡障害にかかわる遺伝性疾患、第80回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会、2021

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

（1）研究分担者

研究分担者氏名:宇佐美 真一
ローマ字氏名:Shin-ichi, Usami
所属研究機関名:信州大学
部局名:医学部
職名:特任教授
研究者番号(8桁):10184996

研究分担者氏名:西尾 信哉
ローマ字氏名:Shin-ya, Nishio
所属研究機関名:信州大学
部局名:医学部
職名:特任講師
研究者番号(8桁):70467166

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 野口佳裕, 岡 愛子, 宇佐美真一	4. 巻 93
2. 論文標題 人工聴覚器手術（内耳奇形を含めて）	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 42-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1411202674	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡 愛子, 鬼頭良輔, 野口佳裕	4. 巻 93
2. 論文標題 <各論 - ステロイド投与の実際（実際の処方例も含めて）> 急性感音難聴	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 694-698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.1411202779	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野口佳裕, 西尾信哉, 宇佐美真一	4. 巻 31
2. 論文標題 次世代シークエンサーによる遺伝子診断の有用性とピットフォール	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 125-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11289/otoljpn.31.125	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野口佳裕, 岡 愛子	4. 巻 37
2. 論文標題 急性感音難聴（突発性難聴、低音障害型感音難聴、外リンパ瘻など）	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 1063-1070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野口佳裕	4. 巻 123
2. 論文標題 遺伝性疾患としての内耳奇形の診断	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho	6. 最初と最後の頁 210～216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3950/jibi inkoka.123.210	査読の有無 無
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 野口佳裕	4. 巻 123
2. 論文標題 急性感音難聴の診断と治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho	6. 最初と最後の頁 71～77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3950/jibi inkoka.123.71	査読の有無 無
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 Sato Yuki, Obuchi Chie, Kagomiya Takayuki, Ogane Sayaka, Shiroma masae, Noguchi Yoshihiro, kaga Kimitaka	4. 巻 63
2. 論文標題 Gender categorization by children with normal hearing and children with cochlear implants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AUDIOLOGY JAPAN	6. 最初と最後の頁 181～188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4295/audiology.63.181	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 Shinagawa J, Moteki H, Nishio SY, Noguchi Y, Usami SI.	4. 巻 11
2. 論文標題 Haplotype Analysis of GJB2 Mutations: Founder Effect or Mutational Hot Spot?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11030250.	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7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野口佳裕
2. 発表標題 臨床セミナー めまい・平衡障害にかかわる遺伝性疾患
3. 学会等名 第80回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口佳裕
2. 発表標題 教育セミナー2 遺伝性難聴入門
3. 学会等名 第66回日本聴覚医学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口佳裕
2. 発表標題 日本耳科学会30周年記念シンポジウム1 遺伝性難聴
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口佳裕
2. 発表標題 教育セミナー5 人工聴覚器手術
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口佳裕
2. 発表標題 テーマセッション1 「次世代シーケンサー時代の難聴遺伝子診断と臨床応用」 Keynote2 次世代シーケンサーによる遺伝子診断の有用性とピットフォール
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口佳裕、西尾信哉、茂木英明、藤川太朗、宇佐美真一
2. 発表標題 TNCバリエーションによる常染色体優性非症候群性遺伝性難聴
3. 学会等名 第29回 日本耳科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口佳裕、西尾信哉、宇佐美真一
2. 発表標題 2つの全エクソーム解析技術によりH0XA2バリエーションが同定された常染色体優性混合性難聴家系
3. 学会等名 第81回 耳鼻咽喉科臨床学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	宇佐美 真一 (Usami Shin-ichi) (10184996)	信州大学・医学部・特任教授 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	西尾 信哉 (Nishio Shin-ya) (70467166)	信州大学・医学部・特任講師 (13601)	

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