

平成22年5月30日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791189
 研究課題名（和文） アッシャー症候群本邦症例の変異解析：変異-病態スペクトラムの構築と臨床への応用
 研究課題名（英文） Mutation analysis among Japanese patients with Usher syndrome for constructing genotype-phenotype correlation
 研究代表者
 中西 啓 (NAKANISHI HIROSHI)
 浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント
 研究者番号：20444359

研究成果の概要（和文）：アッシャー症候群タイプ2患者10人を対象として、*USH2A*の遺伝子解析を行い、8人において14種の疾患原変異を同定した。14種の変異の中で11種は新規であり、さらに1種（c.8559-2A>G）は4人に共通して同定された。このことより、本邦では欧米人とは全くことなる変異によりアッシャー症候群を発症していること、c.8559-2A>Gは本邦*USH2A*患者における高頻度変異である可能性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mutation analysis of *USH2A* in 10 unrelated Japanese patients with Usher syndrome type 2 revealed 14 different pathogenic mutations in 8 patients. Of these, 11 mutations were novel. Splicing mutation c.8559-2A>G was identified in 4 of 10 patients. These results indicate that mutation spectrum for *USH2A* among Japanese patients differs from that of European Caucasians and c.8559-2A>G may be a frequent mutation in Japanese patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝子、感音難聴、網膜色素変性症、アッシャー症候群

1. 研究開始当初の背景

五感の中で視覚と聴覚は最重要であり、そのうち一方だけに障害があっても極めて重大であるが、両方の障害を合わせ持つ人は、他人とのコミュニケーションや外界からの情報手段が二重に限定され、計りしれないほど多大なハンディキャップを負うことになる。

現在までに、約40種類の視覚障害に聴覚

障害を合併する疾患が知られている。その中で、最も高頻度でそれらの患者の約半数を占める疾患がアッシャー症候群（USH）である。USHは、人口10万人に対して3～6人の頻度で認められ、網膜色素変性症に感音難聴を合併する常染色体劣性遺伝性疾患である。

USHは、難聴の程度と前庭機能障害の有無により、タイプ1～3の3つのタイプに分類され（表1）、さらに原因遺伝子がマッピング

またはクローニングされたものは、サブタイプとして分類されている。現在までに 1B~1H、2A、2C、2D、3A、3B の 12 のサブタイプが知られており、そのうち 9 種については原因遺伝子が同定されている (表 2)。

USH に関しては、以下のような臨床医学上の留意点・問題点がある。

(1) 難聴が発症してから数~十数年後に網膜色素変性症が発症するため、発症初期の難聴のみの段階では非症候群性難聴と臨床的に区別することは困難である。

(2) タイプにより重篤度が異なり、難聴に対する治療や対処法を適切に選択する必要がある (表 1)。

(3) USH の原因遺伝子に変異を認める症例の中には、難聴のみで網膜色素変性症を合併しないもの、逆に網膜色素変性症のみで難聴を合併しないものなども存在するが、これは原因遺伝子の種類によって、さらには同一原因遺伝子の中でも変異の種類によって異なる (表 3)。

表1 USHタイプ分類と臨床症状

タイプ	難聴	前庭機能障害	言語獲得
1	重度難聴	合併する	人工内耳埋込術が必要
2	中等度~高度難聴	合併しない	補聴器装用にて可能
3	進行性難聴	様々	治療なしで可能

表2 USHサブタイプと原因遺伝子、産物蛋白質

サブタイプ	遺伝子座	遺伝子	産物蛋白質
1B	11q13.5	MYO7A	Myosin VIIa
1C	11q15.1	USH1C	Harmonin
1D	10q22.1	CDH23	Cadherin 23
1E	21q21	?	?
1F	10q21.1	PCDH15	Protocadherin 15
1G	17q25.1	USH1G	USH1G
1H	15q22-q23	?	?
2A	1q41	USH2A	Usherin
2C	5q14.3	GPR98	GPR98
2D	9q32	DFNB31	Whirrin
3A	3q25.1	USH3A	Clarín 1
3B	20q	?	?

表3 USH原因遺伝子における表現型の多様性

遺伝子	遺伝子変異	表現型
MYO7A	A826T	アッシャー症候群(USH1B)
	2657del9	非症候群性難聴(DFNA11)
USH1C	M599I	非症候群性難聴(DFNB2)
	238insC	アッシャー症候群(USH1C)
CDH23	R608P	非症候群性難聴(DFNB18)
	4488G>C	アッシャー症候群(USH1D)
PCDH15	D188N	非症候群性難聴(DFNB12)
	R2X	アッシャー症候群(USH1F)
USH2A	G262D	非症候群性難聴(DFNB23)
	2299delG	アッシャー症候群(USH2A)
GPR98	C759F	網膜色素変性症
	Q2301X	アッシャー症候群(USH2C)
DFNB31	S2652X	熱性痲痺
	Q103X	アッシャー症候群(USH2D)
	R778X	非症候群性難聴(DFNB31)

これらを解決するためには、早期の遺伝子診断を実施することが極めて有効であり、欧米では既にその体制が整いつつある。すなわ

ち、それぞれの原因遺伝子に対する大規模な解析が行われ、個々の遺伝子について特有の頻度が高い遺伝子変異が存在することが分かってきた。現在、この結果をもとにマイクロアレイを用いたUSHの遺伝子診断が検討されている。

2. 研究の目的

しかし、本邦ではUSHの認知度が専門医の間でさえもかなり低く、体系的な研究がされておらず、各タイプの存在率、本邦症例での遺伝子変異の種類、変異と病態との関連に関する基礎データの報告が全くない。そこで本研究は、上記の問題点に対処するため、さらに発症機序の解明に役立てるために、以下を目的として行う。

(1) USHの遺伝子診断システムを構築するため、できるだけ多数症例の遺伝子解析を行い、日本人での原因遺伝子の種類と、変異の探索、日本人特有の変異の同定を行う。

(2) 日本人におけるUSHの原因遺伝子の変異と病態の対応関係(変異-病態スペクトラム)の基盤データを創出する。

3. 研究の方法

(1) 検体採取

本邦でUSHの研究があまり行われていない理由として、患者が1つの施設には単発的にしか受診しないため十分な検体が得られないことが考えられる。そこで、下記の方法を用いてUSHの患者に本研究への協力を依頼する。

① 患者の会を通じて協力を依頼

網膜色素変性症に難聴を合併する患者会“アイヤ会”の会報や講演会を通じて、本研究を紹介するとともに協力を依頼する。

② 県内基幹病院の耳鼻科や眼科と連携して協力を依頼

網膜色素変性症患者の約6人に1人は難聴を合併し、USHであると報告されている。しかし、耳鼻科医が網膜色素変性症患者の聴力検査等を通じて、USH患者を診察する機会は極めて少ない。その理由として、USHを十分認識して診療に当たっている医師が少ないこと、忙しい日常診療の中では眼科と耳鼻科の連携が容易でないことが考えられる。そこで、難聴の合併が疑われる網膜色素変性症患者を積極的に耳鼻科へ紹介するよう眼科医に依頼し、網膜色素変性症患者の中に潜むUSH患者の評価および診断を行う。

協力が得られた患者には、当院耳鼻咽喉科外来にて、遺伝子検査について十分な説明を行う。インフォームド・コンセントが得られた患者に対し、詳細な問診、耳鼻科・眼科的検査を行い、その結果よりUSHの確定診断およびタイプ分類をする。確定診断された患者より、検体として血液を20ml採取する。検

体は連結可能匿名化し、5ml より白血球を分離し EB ウィルスを用いて株化培養する。残りの血液はフリーザーにて保存する。

(2) 遺伝子解析

末梢血よりゲノム DNA を抽出し、PCR ダイレクトシーケンス法を用いて、遺伝子解析を行う。遺伝子変異を同定することができた患者では、家族の検体を用いて変異と発症の対応解析を行うとともに、正常コントロールでの当該塩基変化の存否の解析、他種生物における相同遺伝子のホモロジー解析等を行う。

4. 研究成果

(1) 検体採取

タイプ 1 患者 3 人、タイプ 2 患者 12 人より検体を採取し、全症例において EB ウィルスを用いた株化培養に成功した。

(2) 遺伝子解析

タイプ 2 患者 10 人を対象として、タイプ 2 の原因遺伝子の 1 つである *USH2A* の遺伝子解析を行い、8 人において 14 種の疾患原因と考えられる変異を同定した (表 4、5)。14 種の変異の中で 11 種は新規であり、さらに 1 種 (c.8559-2A>G) は 4 人に共通して同定された。同定された変異は、*USH2A* のコード領域にほぼ均等に分布しており、明らかな変異ホットスポットは認めなかった。

欧米の症例では、タイプ 2 患者の 74~90% が *USH2A* に遺伝子変異を持ち、創始者効果による高頻度変異 (c.2299delG) が存在することが報告されている。我々は、本邦で初めて *USH2A* の遺伝子解析を行い、上記の結果より以下のことを明らかにした。

- ① タイプ 2 患者の 80% (8/10 人) において遺伝子変異が同定されたことより、本邦でも欧米と同様に *USH2A* に変異を持つ症例が多い。
- ② 同定された変異は 11 種が新規であり、本邦では欧米人とは全くことなる変異により USH を発症している。
- ③ c.8559-2A>G は 4 人の患者において同定され、本邦 *USH2A* 患者における高頻度変異である可能性が高い。

これらの事実は、USH の遺伝子診断を実現する上で極めて重要である。つまり

- ① タイプ 2 患者においては、まず、*USH2A* の c.8559-2A>G 変異を調べることにより効率的に遺伝子診断を実施することが可能である。
- ② 欧米とは変異スペクトラムが異なっているので、USH の遺伝子診断システムを構築するためには、本邦患者において遺伝子解析を実施しデータを蓄積する必要がある。

(3) 遺伝子変異を同定することができた患者の臨床症状

疾患原因変異を同定することができた 8 人の患者は、網膜色素変性症に中等度~高度感音難聴を合併していた。難聴の進行について評価することができた 5 人の患者の中で、患

者 C152 は右耳に軽度の進行を、患者 C237 は両耳に高度の進行を認めた。前庭機能は、全患者において正常であった。

欧米からの報告によると、*USH2A* 遺伝子変異例では、難聴は進行しないことが多いとされている。しかし、C152 は難聴が急速に進行しており、非典型的臨床症状を示す遺伝子変異例と考えられた。C152 では、*USH2A* 変異に加えて修飾遺伝子が臨床症状に影響していると考え、*MYO7A*、*CDH23*、*USH3A* の遺伝子解析を行ったが、変異を同定することは出来なかった。しかし、*USH2A* 遺伝子変異例の中にも非典型的な症状を示す患者がいることは、遺伝子検査を臨床応用する上で留意する必要があると思われる。

表4 疾患原因変異を同定することができた8人の患者の遺伝子型と臨床症状

患者	疾患原因変異		難聴	難聴の進行
	アレル1	アレル2		
C712	p.Ser180Pro	p.Leu1720X	高度	なし
C116	p.Gln1298ArgfsX12	p.Pro2628GlnfsX13	中等度	なし
C152	c.6485+5G>A	c.8559-2A>G	中等度	軽度
C452	c.8559-2A>G	p.Asp3515Gly	中等度	なし
C557	c.8559-2A>G	p.Thr3571Met	中等度	
C237	c.8559-2A>G; p.Trp3150X		高度	高度
C212	p.Cys691Tyr; p.Gly2752Arg; p.Tyr3747Cys		中等度	
C332	p.Ser1369del; p.Ala461Val	未同定	中等度	

表5 日本人USHタイプ2患者に同定された疾患原因変異

ヌクレオチドの変化 産物蛋白質への影響 エキソン/イントロン番号 報告の有無			
ナンセンス変異			
c.9449G>A	p.Trp3150X	エキソン48	有
欠失変異			
c.3891delT	p.Gln1298ArgfsX12	エキソン18	無
c.4104_4106delTTC	p.Ser1369del	エキソン19	無
c.5158delC	p.Leu1720X	エキソン25	無
c.7883delC	p.Pro2628GlnfsX13	エキソン41	無
スプライシング変異			
c.6485+5G>A		イントロン33	無
c.8559-2A>G		イントロン42	有
ミスセンス変異			
c.538T>C	p.Ser180Pro	エキソン3	無
c.2072G>A	p.Cys691Tyr	エキソン12	無
c.8254G>A	p.Gly2752Arg	エキソン42	無
c.10544A>G	p.Asp3515Gly	エキソン53	無
c.10712C>T	p.Thr3571Met	エキソン54	有
c.11240A>G	p.Tyr3747Cys	エキソン58	無
c.13832C>T	p.Ala461Val	エキソン64	無

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 4 件)

① 中西啓、岩崎聡、瀧澤義徳、橋本泰幸、水田邦博、峯田周幸、非典型的臨床症状を示した *USH2A* 遺伝子変異例、耳鼻咽喉科臨床、査読有、103 巻、2010、413-419

② Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S, Identification of 11 novel mutations in *USH2A* among Japanese patients with Usher syndrome type 2, *Clinical Genetics*, 査読

有, 76, 2009, 383-391

③中西啓、岩崎聡、今井篤志、林理佐子、水田邦博、峯田周幸、SLC26A4 に遺伝子変異を認めた前庭水管拡張症の2例、耳鼻咽喉科臨床、査読有、102巻、2009、713-718

④中西啓、荒井真木、細川誠二、岩崎聡、水田邦博、峯田周幸、Lemierre 症候群例、耳鼻咽喉科臨床、査読有、101巻、2008、473-477

〔学会発表〕(計7件)

① Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hosokawa S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S, Identification of 11 novel mutations in USH2A among Japanese patients with Usher syndrome type 2, Association for Research of Otolaryngology, 2010年2月6日-10日, Anaheim, CA, USA

②中西啓、岩崎聡、姜洪仁、橋本泰幸、水田邦博、峯田周幸、本邦におけるアッシャー症候群の遺伝子解析、日本耳科学会、2009年10月8日-10日、京王プラザホテル

③中西啓、大坪正史、岩崎聡、堀田喜裕、水田邦博、峯田周幸、蓑島伸生、本邦におけるアッシャー症候群の遺伝子解析、日本人類遺伝学会、2009年9月24日-26日、グランドプリンスホテル高輪

④中西啓、堀田喜裕、大坪正史、岩崎聡、水田邦博、峯田周幸、蓑島伸生、本邦におけるアッシャー症候群の遺伝子解析、日本眼科学会、2009年4月15日-18日、東京国際フォーラム

⑤中西啓、大坪正史、岩崎聡、細野克弘、中西伸夫、堀田喜裕、水田邦博、峯田周幸、蓑島伸生、本邦のアッシャー症候群患者の遺伝子変異解析、日本分子生物学会・日本生化学会、2008年12月9-12日

⑥中西啓、岩崎聡、姜洪仁、橋本泰幸、水田邦博、峯田周幸、本邦におけるアッシャー症候群の遺伝子解析、日本耳科学会、2008年10月16-18日、神戸国際会議場

⑦中西啓、大坪正史、岩崎聡、姜洪仁、堀田喜裕、水田邦博、峯田周幸、本邦におけるアッシャー症候群患者の遺伝子解析、日本人類遺伝学会、2008年9月28-30日、パシフィコ横浜

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：ヒト USH2A 突然変異体

発明者：中西啓

権利者：中西啓

種類：特許

番号：特願第 2009-172503

出願年月日：2009年7月23日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 啓 (NAKANISHI HIROSHI)

浜松医科大学・医学部・リサーチアシスタント

研究者番号：20444359