

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K18316
研究課題名（和文）核酸クロマトグラフィーを用いた沖縄版ペンドレッド症候群迅速遺伝子診断法の確立

研究課題名（英文）Rapid Genetic Diagnosis for Okinawan Patients with Enlarged Vestibular Aqueduct Using Single-Stranded Tag Hybridization Chromatographic Printed-Array Strip

研究代表者
我那覇 章（Ganaha, Akira）

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：00347155
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々はアレル特異的PCRとSTH-PASを用いたSLC26A4遺伝子のc.1707+5G>Aおよびc.2168A>Gの2変異の同定法を確立した。c.1707+5G>Aおよびc.2168A>Gは沖縄県の前庭水管拡大症患者で最も多い変異である。さらに、全血および唾液を用いた、直接PCRとSTH-PASによる非侵襲的なgenotypingを確立した。本法により沖縄県の前庭水管拡大症患者の88%が診断可能である。STH-PAS法による前庭水管拡大症の遺伝子診断法は、遺伝学的背景を考慮し対象遺伝子変異を選択することにより、沖縄県出身者以外の他地域にも適応可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直接PCRとSTH-PASを用いた前庭水管拡大症の迅速遺伝子診断は、簡便でコンタミネーションのリスクが少なく、電気泳動が不要なため発癌性のある臭化エチジウムが不要なため安全で、かつ短時間で安価に実施可能である。本法による前庭水管拡大症の遺伝子診断は、医療における費用やリスクの軽減に寄与する。また、本法は1本のSTH-PASで最大12 genotypingが可能であり、人種により異なるSLC26A4遺伝子変異の頻度を考慮して検査対象の遺伝子変異を選択することにより、沖縄以外の東アジア圏でも応用が可能である。

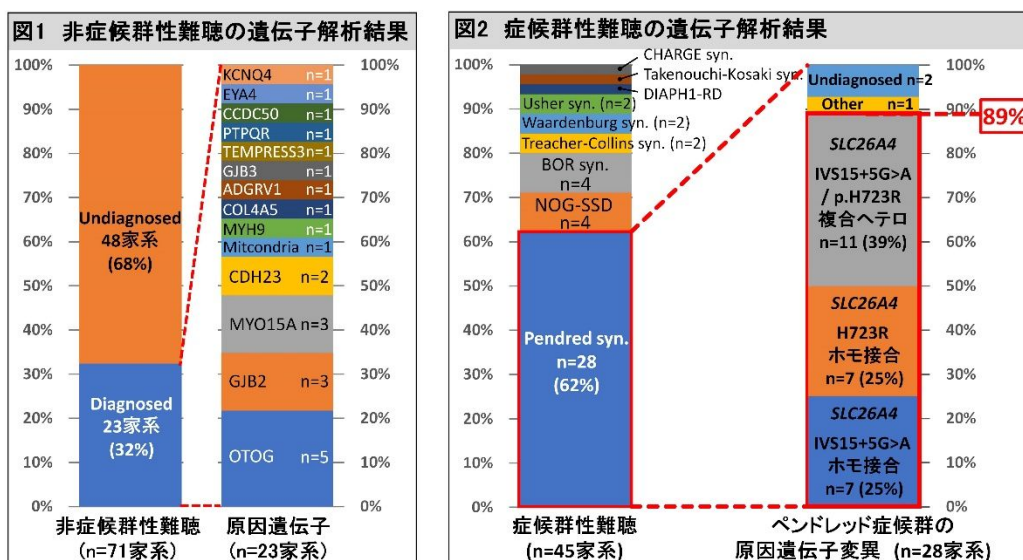
研究成果の概要（英文）：We developed a multiplex variant detection method by combining allele-specific PCR with STH-PAS to verify the presence or absence of the two SLC26A4 pathogenic variants, c.1707+5G>A and c.2168A>G, that are the most common among Okinawan patients with hearing loss and EVA. Furthermore, by combining direct PCR and STH-PAS from whole blood and saliva specimens, we developed a novel, rapid and less invasive genotyping method. The diagnostic accuracy of STH-PAS genotyping for the two pathogenic variants was 88% correct in Okinawan patients with EVA. The STH-PAS genotyping method appropriately tailored to the genetic variations in targeted ethnicities could be applied broadly in other geographical regions.

研究分野：難聴遺伝子

キーワード：前庭水管拡大症 沖縄 SLC26A4 STH-PAS

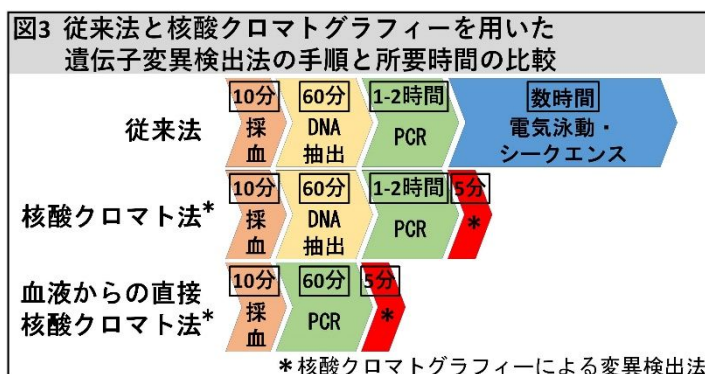
1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、沖縄県出身の難聴患者 116 家系に対し、98 難聴遺伝子を対象とした難聴遺伝子診断パネルを作成し、次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス解析を行った(図1, 2)。その結果、沖縄県における症候群性難聴において、ペンドレッド症候群を 62% (28/45 家系) と最も多く認めた(図2)。また、沖縄県におけるペンドレッド症候群の原因遺伝子変異は、p.H723R と IVS15+5G>A の 2 か所の変異が、89%を占めていた(図2) [Ganaha et al. 2013]。したがって、この 2 か所の変異を検出することで、沖縄県におけるペンドレッド症候群の約 90%の診断が可能であると考えられる。



2. 研究の目的

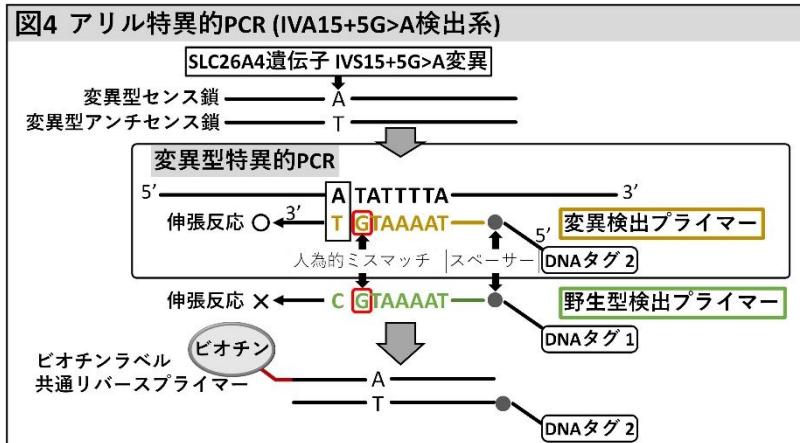
本研究は、核酸クロマトグラフィーとアレル特異的 PCR を組み合わせた、簡便、迅速かつ低コストな「沖縄版ペンドレッド症候群迅速遺伝子診断法」を確立することが目的である。本研究による迅速遺伝子診断法は、従来法のようにアガロースゲル電気泳動の必要がなく、簡便、迅速、低コストで遺伝子変異の検出を可能とする(図3)。



3. 研究の方法

(1) SLC26A4 遺伝子の p.H723R と IVS15+5G>A 変異を検出するアレル特異的 PCR プライマーの設計(図4)

はじめに、対象の遺伝子変異を特異的に検出できるような対立遺伝子特異的プライマー配



列の探索を行う。プライマー長は20mer程度とし、オリゴDNAの3'端に変異が位置するように設計する。また、3'端の隣に人為的ミスマッチ塩基を配置したプライマーを野生型及び変異型検出プライマーにおいて、

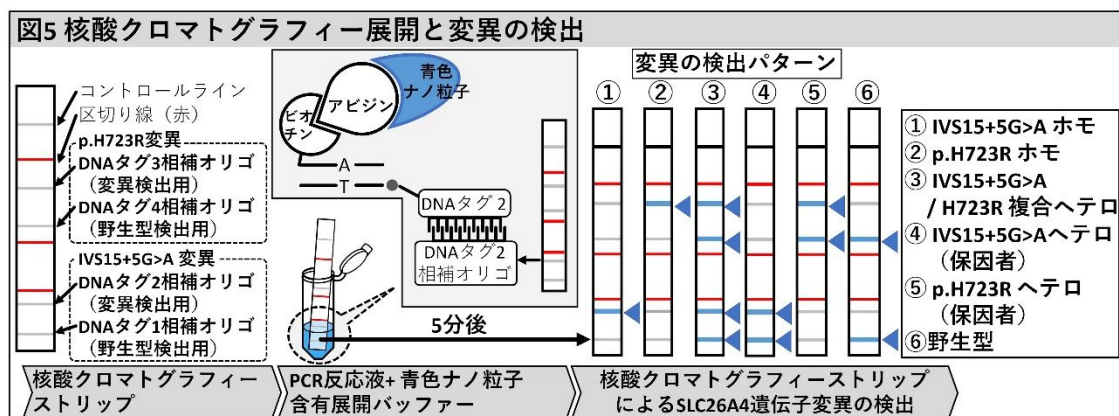
それぞれ4種類作製する。研究協力者(平塚:東北大学)のこれまでの検討から、アリル特異的PCRの際にプライマー3'端の隣にミスマッチ塩基を挿入することで非特異的なPCR増幅を回避できることが判明している [Hiratsuka et al. Biol. Pharm. Bull., 2000]。ここでは、野生型及び変異型検出プライマーの、どのミスマッチプライマーセットが最も非特異的PCR増幅を抑えられるかを検討する。なお、リバープライマーは野生型と変異型を均等に増幅できるように共通配列で設計する。

(2) Multiplex PCR 条件の設定

1本のPCRチューブに野生型及び変異型検出プライマーの両方を含む Multiplex PCR の最適反応条件について、プライマーの精製グレード(ゲル濾過、OPC精製、HPLC精製)、DNAポリメラーゼ、反応温度等を検討する。得られたPCR産物をシーケンス解析し、非特異的増幅が起こらない条件を決定する。

(3) 最適なDNAタグ配列の探索と核酸クロマトグラフィー展開条件の設定 (図4、5)

野生型及び変異型検出プライマーの5'側に10塩基程度のDNAタグを連結し、対象の遺伝子変異の検出に最適なタグの組み合わせを検討する。なお、プライマーとタグDNAの連結部にスペースを入れることで、タグ部分がPCR時に2重鎖にならず、その後のストリップ上での相補配列との結合を効率的なものにする。共通リバープライマーの5'端にはビオチンをラベルする。PCR終了後、反応物にアビジン結合青色ナノ粒子を含む展開バッファーを混合し、核酸クロマトグラフィー上に展開する。青色のバンドが明確に目視できるような展開条件(バッファー組成など)を検討する。



(4) プライマーダイマー排除法の検討

本法はアリル特異的PCRによる変異検出法であるため、野生型DNAの鋳型に変異型対立遺

伝子検出プライマーが結合し、非特異的 DNA 増幅が起こると誤診断の原因となる。また、プライマーダイマーが形成された場合も DNA タグとビオチンが結合したごく短い二本鎖 DNA が得られるため誤診断の原因となる。(2)の検討で、できるだけプライマーダイマーが形成されないような反応条件を設定する。

(5) 末梢血検体からの直接アリル特異的 PCR の検討

作業の簡素化と変異検出時間の短縮を目的に、AmpDirect (島津製作所)を用いて、血液から直接 PCR を行う至適条件を検討する。これにより得られる PCR 産物を用いて、核酸クロマトグラフィーストリップ上で変異を検出できる手順を確立する。

4 . 研究成果

我々はアレル特異的 PCR と STH-PAS を用いた SLC26A4 遺伝子の c.1707+5G>A および c.2168A>G の 2 変異の同定法を確立した .c.1707+5G>A および c.2168A>G は沖縄県の前庭水管拡大症患者で最も多い変異である .さらに ,全血および唾液を用いた ,直接 PCR と STH-PAS による非侵襲的な genotyping を確立した .本法により沖縄県の前庭水管拡大症患者の 88%が診断可能である .STH-PAS 法による前庭水管拡大症の遺伝子診断法は ,遺伝学的背景を考慮し対象遺伝子変異を選択することにより ,沖縄県出身者以外の他地域にも適応可能である .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakashima T, Ganaha A, Tsumagari S, Nakamura T, Yamada Y, Nakamura E, Usami SI, Tono T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Is the Conductive Hearing Loss in NOG-Related Sympchalangism Spectrum Disorder Congenital?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000512668	査読の有無 有
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 Nakamura T, Ganaha A, Tono T, Yamada Y, Okuda T, Shimoara S, Matsuda Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 Combined Electric acoustic stimulation in a patient with otitis media with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 133-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2021.04.009.	査読の有無 有
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 Ganaha A, Hishinuma E, Kaname T, Hiratsuka M, Kondo S, Tono T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Rapid Genetic Diagnosis for Okinawan Patients with Enlarged Vestibular Aqueduct Using Single-Stranded Tag Hybridization Chromatographic Printed-Array Strip.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11041099.	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akira Ganaha
2. 発表標題 Diagnosis and treatment of enlarged vestibular aqueduct syndrome: clinical and genetic features of 34 Japanese patients
3. 学会等名 13th ASIA PACIFIC SYMPOSIUM（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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
研究協力者	平塚 真弘 (Hiratsuka Masahiro)		
研究協力者	要 匡 (Kaname Tadashi)		
研究協力者	菱沼 英史 (Hishinuma Eiji)		

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
---------	---------