

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791645

研究課題名(和文) 全ゲノム連鎖解析により7番染色体にマップされた非症候群性家族性難聴原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Identification of autosomal recessive deafness causing gene mapped on chromosome7 by the whole genome linkage analysis

研究代表者

小島 サビヌ和子 (KOJIMA SABINE KAZUKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10445439

研究成果の概要(和文): トルコ人常染色体劣性非症候群性難聴家系を用いて全ゲノム連鎖解析を行ない、染色体領域 7q21.11-q21.13 の約 8.7Mbp を最も連鎖の可能性が高い領域として同定し、この座位を DFNB78 と名付けた。さらに SNPs を利用したホモ接合性マッピングにより、候補遺伝子を 11 個まで絞り込み変異探索を進めている最中に、以前パキスタン人家系の連鎖解析から 7q11.22-q21.12 の 18Mb 内にマッピングされていた DFNB39 の原因が肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF) 遺伝子の非コーディング領域の突然変異であることが報告された。DFNB78 家系についてもまったく同じイントロン 4 内の TGA の 3 塩基欠失変異 (c.482+1986_1988delTGA) が認められ、中近東から南アジアに共通の創始者変異と考えられた。

研究成果の概要(英文): I have mapped an autosomal-recessive nonsyndromic deafness locus (DFNB78) to an 8.7-Mb interval on human chromosome 7q21.11-q21.13 by whole genome linkage analysis of a large Turkish family. Furthermore, I have narrowed down the DFNB78 locus by the homozygosity mapping using SNPs in the candidate region. During I was performing mutation search on the 11 candidate genes, it was reported that the cause of DFNB39 which was previously mapped in 18-Mb region on 7q11.22-q21.12 by the linkage analysis of the Pakistani family is the mutation of non-coding region in a hepatocyte growth factor (HGF) gene. In the DFNB78 family, I found exactly the same 3-bases deletion in intron4 (c.482+1986_1988delTGA) of HGF gene. I considered this mutation a common founder mutation in South Asia and the Near and Middle East.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	0	0	0
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉頭科学

キーワード：非症候群性難聴、家族性難聴、連鎖解析、変異探索

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

難聴は様々な原因で生じるが、内耳由来の難聴は頻度の高い疾患で、出生約 1000 人当たり 1 人は言語習得前に高度難聴あるいは聾となり、しかもその半数は遺伝性とされている。この遺伝性難聴では、遺伝子の異常が難聴の原因で、これらの遺伝子を難聴遺伝子と呼んでいる。

近年の分子遺伝学の発展により、難聴遺伝子が次々と同定されている。しかしながら音が聞こえるまでのプロセスは非常に複雑で多くの遺伝子が関与しており、その種類の多さや症状が多岐におよぶことで遺伝的原因の診断も複雑さを増す。

遺伝性難聴は、難聴以外に症状がみられる症候群性難聴と、難聴以外には他の臨床症状を示さない非症候群性難聴の 2 種類に分類される。どちらのタイプの遺伝性難聴でも多くの難聴遺伝子が見つかってきているが、非症候群性難聴の難聴遺伝子は、聴覚機構に特化したものであると予想されるため、聴覚生理や難聴の原因あるいは治療を考える上で重要である。

非症候群性難聴に関しては、ヒトゲノム機構 (HUGO) において難聴遺伝子座が遺伝形式ごとに報告順に命名されている。優性遺伝は DFNA、劣性遺伝は DFNB、X 連鎖遺伝は DFN である。2008 年の時点で非症候群性難聴として 85 箇所の原因遺伝子座が報告されていたが、そのうち原因遺伝子が同定されたものは 39 個に過ぎなかった。さらに本研究のように未発表のもの、さらにまだマップされていないものなど、まだ多数の難聴原因遺伝子が存在するものと推定されていた。

多くの候補領域からの原因遺伝子の発見が期待されていたが、原因遺伝子の特定変異を同定する事ができれば、遺伝子診断による診断の確定や、家族内発症の予測が可能になり、さらには治療方法の開発や予防への応用が期待されていた。

(2) これまでの研究成果

申請者は、共同研究者であるトルコの

Hacettepe 大学医学部小児科遺伝学部門の Dilek Aktas 教授がインフォームドコンセントを得た上で常染色体劣性非症候群性難聴の血族婚 1 大家系から収集した DNA サンプルを用いて全ゲノムを対象とした連鎖解析を行なった。本家系は、構成員数が非常に多く、かつ近親婚も含んでいて複雑であった。22 名から DNA の提供を受けていたが、さらに連鎖解析の対象とするサンプルを選抜した。対象サンプルは家系図 (図 1) の星印のついた 6, 11, 16, 13, 14, 35, 12, 18, 23, 24, 26, 3, 4, 5 の 13 人である。図 1 に解析対象者のみを抜粋した家系図を示す。すでに約 400 個の多型マーカーを用いて難聴患者と非患者の全ゲノム連鎖解析を終え、染色体領域 7q21.11-q21.13 の約 10Mbp を最も連鎖の可能性が高い領域として同定し、この遺伝子座位を DFNB78 と名付けた。近年ではこのような大家系のサンプルを得られる事は日本ではもちろん世界でも非常に難しくなっており、特に大家系を得難い劣性遺伝の難聴にの新規原因遺伝子の同定が期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、連鎖解析により 7q21.11-q21.13 領域にマップされた常染色体劣性非症候群性難聴 DFNB78 の原因遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

連鎖解析により絞り込まれたトルコ人非症候群性家族性難聴原因遺伝子の候補領域 7q21.11-q21.13 の詳細な解析を行い、候補領域のさらなる絞り込みを試みた。

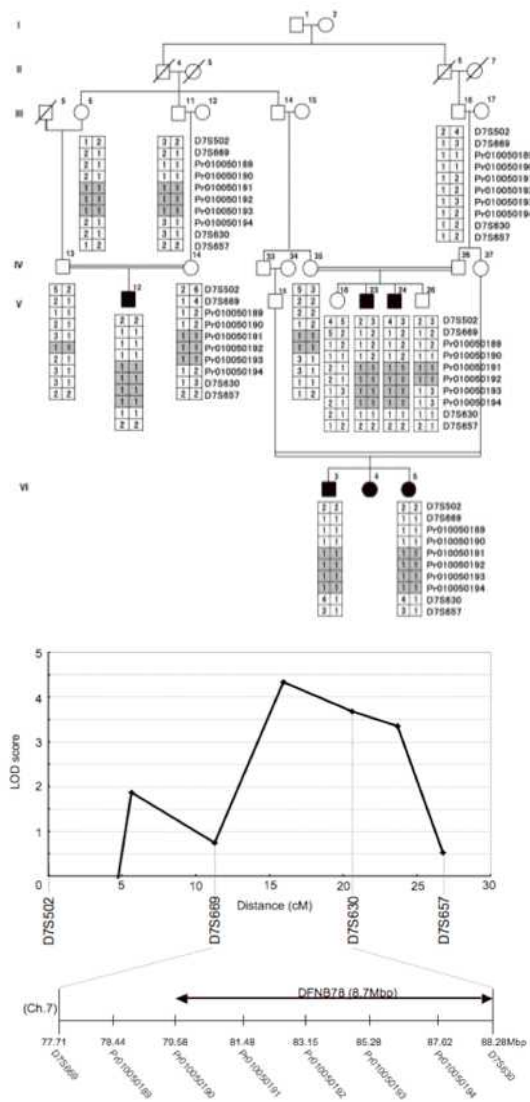
候補領域のマーカー D7S669 と D7S630 の間に新たにマイクロサテライトマーカーを 6 個 (Pr010050189-Pr010050194) 作成し、連鎖解析を行い候補領域の絞り込みを行った。具体的には、5ng の鋳型の DNA をもとにマイクロサテライトマーカーを増幅させ、増幅産物のエンドを蛍光標識した後に ABI Gene Mapper を用いてタイピングを行った。

候補遺伝子については変異探索を行った。

具体的には、候補遺伝子のエキソン領域の塩基配列を増幅するためにPCRプライマーを設計しPCR増幅後DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 候補領域の絞り込みと候補遺伝子の変異探索



(図1) マイクロサテライトマーカーによるDFNB78候補領域の絞り込み

(上) 常染色体劣性非症候群性難聴の家系図(抜粋版)と、(下) 絞り込んだ8.7Mbpの領域

候補領域のマーカーD7S669とD7S630の間に新たに作成したオリジナルのマикроサ

テライトマーカー6個(Pr010050189-Pr010050194)を用いた連鎖解析の結果、候補領域はオリジナルマーカーPr010050190からD7S630間の約8.7Mbpに絞り込まれた(図1)。

この領域内には23個の候補遺伝子が存在したが、そのなかでもSLC25A40遺伝子はDFNB4の原因遺伝子であるSLC26A4のファミリー遺伝子であったため最初に変異探索を行った。残念ながら病気の原因になり得る変異は発見されなかったが、患者家族内におけるSNPsにより、ホモ接合性マッピングの原理により、さらに候補領域を狭めることができた。

さらに候補領域内の既知のSNPsをデータベースより集め、患者家族内でも調べることで候補領域を縮め23個あった候補遺伝子を最終的に11個の遺伝子にまで絞り込むことができた。

- GNAI1 :Guanine nucleotide binding protein G(i), alpha-1 subunit
- GNAT3 :guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 3
- CD36 :Platelet glycoprotein IV (GPIV)
- SEMA3C :Semaphorin-3C precursor (Semaphorin E) (Sema E).
- HGF :Hepatocyte growth factor precursor (Scatter factor) (Hepatopoeitin A)
- CACNA2D1 :Dihydropyridine sensitive L-type, calcium channel alpha-2/delta subunits precursor
- Novel
- Q9Y6V0-3 :PCL0_HUMAN Isoform 3 of Q9Y6V0
- PCL0 :Piccolo protein
- SEMA3E :Semaphorin-3E precursor.
- SEMA3A :Semaphorin-3A precursor (Semaphorin III)

これらを原因遺伝子の候補とし、順次、変異探索を行った。

以下の8個の遺伝子については全エキソンの変異探索を終了した(カッコ内にはgeneID, exon数, Transcript lengthを示す)。GNAI1 (ENSG00000127955. 8 exons, 3312 bps),

GNAT3 (ENSG00000214415, 8 exons, 1068 bps), CD36 (ENSG00000135218, 14 exons, 2044 bps), SEMA3C (ENSG00000075223, 18 exons, 5174 bps), Novel (ENSG00000214409, 3 exons, 408 bps), Q9Y6V03 (ENSG00000214408, 9 exons, 3069 bps), SEMA3E (ENSG00000170381, 17 exons, 6474 bps), SEMA3A (ENSG00000075213, 17 exons, 2520 bps)。

しかしながら、残念なことに遺伝子機能の欠損に結び付くと思われる変異はこれら 8 個の遺伝子のエキソン内には見出せなかった。

(2) DFNB39 の原因遺伝子 HGF の遺伝子診断元々、DFNB78 の候補領域 7q21.11-q21.13 の近傍には、2003 年にパキスタンの常染色体劣性非症候群性難聴家系を解析して 7q11.22-q21.12 の 18Mb 内にマップされた DFNB39 遺伝子座が知られていた。両者の候補領域は一部重なってはいたものの、先天性難聴の遺伝子座数が非常に多いため、独立した家系でマッピングされた遺伝子座は、原因遺伝子が決定されて同一の遺伝子であるか否かの結論が出るまでは、家系毎に別の遺伝子座名を与えようという慣例に従って、独自に原因遺伝子の探索を進めてきたものであった。我々が候補遺伝子群の変異探索を進めている最中、DFNB39 の候補領域内に存在する肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (HGF) 遺伝子の非コーディング領域に難聴の原因と思われる突然変異を発見したという論文が報告された (Schultz JM et al., Am J Hum Genet. 85(1):25-39, 2009)。HGF 遺伝子は、DFNB78 の候補領域 8.7Mb の中に存在しており、従って、DFNB78 についても有力な候補遺伝子と考えられたため、HGF 遺伝子変異の有無を調べたところ、DFNB39 と同じ非コーディング領域の変異が同定された。

Schultz 等の論文の内容は、具体的には、最初にマッピングに用いられた DFNB39 家系に加えて、同領域にマップされた実に 40 もの近親婚を含む家系を収集し、計 41 家系のうち 38 家系で HGF のイントロン 4 内の TGA の 3 塩基欠失 (c.482+1986_1988delTGA) が患者共通に見られ、残る 2 家系ではイントロン

4 内の上記欠失と隣接した 10 塩基欠失 (c.482+1991_2000delGATGATGAAA) を、さらに残る 1 家系では、エキソン 5 内の TCG から TCA への同義置換を見出したという報告であったが、DFNB78 家系においてもまったく同じイントロン 4 内の 3 塩基欠失が患者共通で確認された (表 1)。

(表 1) DFNB78 家系における HGF のイントロン 4 のシーケンス結果

解析対象者	HGF -intron4 の塩基配列
正常対照	AAAGATGATGAAAGAT
患者 1	AAAGATGA --AAGAT
患者 2	AAAGATGA --AAGAT
患者 3	AAAGATGA --AAGAT
患者 4	AAAGATGA --AAGAT
患者 5	AAAGATGA --AAGAT
患者 6	AAAGATGA --AAGAT

この結果から、c.482+1986_1988delTGA 変異は、南アジアから中近東にかけて共通の創始者変異であると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 サビヌ和子 (KOJIMA SABINE KAZUKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 10445439