

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09560

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析に基づくメニエール病の原因遺伝子探索

研究課題名(英文)Exploration for causative genes of Meniere's disease based on genome wide association study

研究代表者

伊賀 朋子 (Iga, Tomoko)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：90734070

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)：メニエール病(MD)患者のゲノム上の全ての一塩基多型(SNP)を健常人と比較することにより原因遺伝子を探索。診断には従来病状の証明が難しかった部分を補完する手法(内耳造影MRI、眼振記録装置)を用いたため、より精度の高い遺伝子解析が可能となると考えた。内耳造影MRIでMDの痕跡である内リンパ水腫を認めた患者206例の血液よりSNPデータを取得。バイオバンクジャパンの健常人データと比較したゲノムワイド関連解析を実施。ゲノムワイド有意水準を満たすSNPも得られたが、集団内のSNP頻度やimputation時のR2値より不適切であると判断。上位のSNPに関するe-QTL関連も有意なものなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耳鼻咽喉科領域において頻度の高いめまい疾患であるメニエール病は、一定数の治療抵抗性の症例も存在し、一部の国民の生活の質を落としているため、原因や治療に関するこれまでにはない知見が求められていた。今回の研究は、そのような知見を得るための新しいアプローチであったが、有意な結果は得られなかった。メニエール病においては遺伝子が関連する側面もあることは知られていたが、その比重が低いために、統計的に有意な結果を得るためにはより多くの症例サンプルを用いる必要があったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We searched for causative genes by comparing all single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genome of Meniere's disease (MD) patients with those of healthy controls. For diagnosis, we used complementary methods (contrast-enhanced MRI of inner ear and nystagmus recording device), which have been difficult to prove the disease status in the past, and we thought that more accurate genetic analysis would be possible. SNP data were obtained from the blood of 206 patients with endolymphatic hydrops, a trace of MD, on contrast-enhanced MRI of inner ear. Genome-wide association study was performed comparing the SNP data with those of healthy subjects in Biobank Japan. SNPs that met the genome-wide significance level were obtained, but were judged to be inappropriate based on the SNP frequency in the population and the R2 value at the time of imputation. No e-QTL associations for the top SNPs were also significant.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：メニエール病 内耳造影MRI ゲノムワイド関連解析

1. 研究開始当初の背景

反復する回転性めまい、難聴、耳鳴りを三主徴とするメニエール病は、内耳の内リンパ水腫が主病態であることが知られている。これまでの研究では、遺伝的素因と内リンパ水腫の形成機構との関連について明確な結論は得られていない。その理由は、メニエール病の臨床的診断基準に純音聴力検査以外の客観的な検査が含まれていないことにあると考えられる。つまり、臨床症状から診断されるメニエール病において、外来時には消失していることが多い反復するめまい発作(内リンパ水腫の存在は持続している)、および随伴する難聴・耳鳴りが変動する状態の判断は、患者自身の自己申告、および問診に頼らざるを得ず、また、主病態である内リンパ水腫に関しては、死後の病理解剖により内リンパ水腫が確認されなければメニエール病の確定診断に至らないという現実があった。従って、これまでメニエール病研究の対象としていた患者群は、客観的検査を経ないヘテロな集団となっており、患者選定に均一性を持たせることが困難であったと言える。

メニエール病に対する臨床的診療は、Barány Society(2015)の定めた診断基準に代表される、臨床症状を基準とした診断に基づいている。その一つである繰り返すめまいに関しては、外来診察時にその存在を確認できる症例は少なく、患者自身の自己申告および問診に頼らざるを得なかった。我々の開発した自宅眼球運動簡易記録装置を貸し出すことにより、めまい発作時にメニエール病に特異的な興奮性眼振の有無が確認できるようになり、実際にはメニエール病の眼振が存在しない症例があることが確認された。これは、メニエール病の遺伝子研究を制限する要因となっていたのではないかと考えた。

一方、当研究代表者が中心となり施行した内耳造影 MRI のデータが蓄積されてきたため、今回十分なサンプル収集により遺伝的解析研究が行える状況にあると判断された。関連病院も含めた研究対象外来患者約 700 名の内耳造影 MRI 施行状況はすべて記録されており、それらの患者から遺伝子変異のデータを取得するのに必要な採血を行うために、大阪大学医学部附属病院および関西労災病院倫理委員会の承認も既に得られている(それぞれ承認番号 842、191103)。

これまでのメニエール病に対する遺伝学的研究においても様々な原因遺伝子が報告されている。例えば、家族性メニエール病に関しては、2011年に PIK3C2G、D5S644 の関連が示され(Irene G, et al. *Curr Genomics*, 2011)、2017年に DPT、SEMA3D の関連が報告されている(Carmen Martín-Sierra et al., *Eur J Hum Genet.* 2017)。更に、騒音誘発酸化ストレス防御に関与する NRF2 の関連(Annick G, et al. *Front Neurosci-Switz.* 2015)や、抗体誘発難聴、自己免疫性難聴の標的となる SLC44A2 中の variant のヘテロ接合が有意にメニエール病の重症化を引き起こすことも示されている(Thankam S. Nair, et al. *Genomics*, 2016)。

これらはほんの一例であるが、いずれの報告においても、異なる遺伝子がメニエール病の表現型の発生に複合的に関与し、環境因子または後天的因子の相互作用が表現型の差異を決定し得る、つまりメニエール病における遺伝的不均一性を支持している。すなわち、全ゲノム上の全ての SNP を網羅的に解析する GWAS を施行することにより、既知の関連遺伝子の他、新規の関連遺伝子の発見が期待される。

更に、本研究は内耳造影 MRI による内リンパ水腫の確認という客観的指標を用いた患者選定を行っており、他の研究と比較して結果により強い客観性を持たせることができる。本研究は、内耳造影 MRI にて内リンパ水腫が確認された患者に対する GWAS として世界初の報告となる。更に、眼振発作時の画像を集積した研究に関しても他に報告はなく、単独の研究としても論文化する方針である。

2. 研究の目的

本研究では、客観的検査として、内リンパ水腫に対して内耳造影 MRI を、反復するめまい発作に対して自宅眼球運動簡易記録装置(後述)を用いることにより、メニエール病確実例の客観的選定を行う。それらの患者に対して、ゲノム全体に分布する既知のすべての一塩基多型(SNP)を対象とした網羅的遺伝子解析(GWAS)を行うことにより、多数存在すると考えられる原因遺伝子の新規発見と、それら遺伝子の影響度および関連する生理機能からの病態原因解明を目標とする。

3. 研究の方法

我々は、メニエール病患者のめまい発作時に出現する眼球運動を記録するため、新規に自宅眼球運動簡易記録装置を開発し、これをメニエール病患者に貸し出すことによって、診察時には既に消失していることが多く捉える事が困難であった、メニエール病に特異的なめまい発作時の興奮性眼振所見を捉える事に成功した。これにより、反復性めまい発作の評価が正確かつ客観的に行えるようになった。例えば、めまい発作時にメニエール病の興奮性眼振を認めていない症例(25 例中 4 例)も存在し、問診のみによる診断の不正確さを証明することができた。

また、2007年、Nakashimaらが発表した3テスラMRIによる造影内耳画像所見にて生きたメニエール病患者の内リンパ水腫像を世界で初めて証明し、以降メニエール病における唯一の客観的診断指標となった。近年のMRI装置の技術向上および検査手法・条件の標準化などが進み、より正確で鮮明な内リンパ水腫像を得ることができるようになってきた。

これら2つの検査により、内リンパ水腫を来したメニエール病確実例を客観的に抽出する事が可能となるため、より均一な患者を対象者として選定できるようになった。

更に、メニエール病は多因子疾患であることが知られており、メニエール病の発症には多くの遺伝的素因が関与している。遺伝統計学の分野では、ゲノム配列を得る技術が急速に発達し、低価格化も進んでいる。このデータを用いた解析手法の一つとして、2002年に理化学研究所が開発したゲノムワイド関連解析(GWAS)が挙げられる。GWASはヒトの全ゲノムシーケンスに含まれる数百万、時に数千万の多型に関する有意な傾向をコンピュータソフトウェアにて検索する。特定の狭い領域の解析だけでなくゲノム全体を巨視的に見渡すことができるGWASは、単一あるいは少数の遺伝子の異常のみで説明の付く病気ではなく、複数の遺伝子が少しずつ影響することで発症する多因子疾患であるメニエール病において、非常に有用であると言える。更に、同定されたSNPの生体における意義を深く解析していくことで、発症メカニズムの解明や予防、リスクに応じた適切な治療方法の選択が可能となり、さらには新規の治療法開発につながる事が期待される。具体的には、多型の各種特徴をデータベース化して持つWebサイトなどを利用し、同定した多型の意義を調査する(アノテーション)。例えば、LocusZoomでは特定の多型の位置周辺にある多型・遺伝子との相互関連情報が得られ、Ensembleではコーディング領域の多型がもたらす変異の種類(サイレント、ミスセンス、ナンセンス変異など)も提供する。HaploRegでは特に非コーディング領域の多型に関する情報が得られ、SNIPAでは多型に関わるeQTL(転写産物のRNAが他の遺伝子発現の調節に影響するような座位のこと)の情報も得られる。これらを利用して、特に影響度の高い多型に関する情報から検索し、内リンパ水腫を引き起こす機能異常を推定する。更に、別の疾患において同様の生理機能を対象とした薬剤などがあれば、メニエール病に対する効果も期待できるものとして列挙することができる(ドラッグリポジショニング)。

本研究の具体的な進め方は以下の通りである。大阪大学医学部附属病院および共同研究施設である独立行政法人労働者健康安全機構 関西労災病院にて内耳造影MRIを施行した症例(約700例)の中で、内耳造影陽性(400例以上)かつ自宅眼球運動簡易記録装置にてめまい発作時の眼振を認めた患者を対象として採血を行った(206例)。採取した血液の細胞から、企業委託にてDNAを抽出し、更に代表的な数十万のSNPの塩基(タイピングデータ)を得た後、それらのSNPから他のSNPへの連鎖情報を基に、合計約数千万のSNPの塩基を推定した(imputation)。その際には、Linux上で動作するソフトウェアであるPLINKを使用した。こうして得た全SNPの一つ一つに対してロジスティック回帰分析を行ってp値を算出し、健常群と比較して疾患群にて有意に変化している多型をリストアップした。この解析には、Linux上で動作するソフトウェアであるSAIGEを使用した。

4. 研究成果

内耳造影MRIで内リンパ水腫を認めた患者206例の血液よりSNPデータを取得。PLINKを用いてimputationを行った。SAIGEを用いてバイオバンクジャパンの健常人データ43,859例と比較したGWASを実施。ゲノムワイド有意水準を満たすSNPも得られたが、集団内における当該SNPのアレル頻度が低いことや、imputation時のR2値が低いことより不適切であると判断。上位のSNPに関するe-QTL関連も有意なものはなかった。

耳鼻咽喉科領域において頻度の高いめまい疾患であるメニエール病は、一定数の治療抵抗性の症例も存在し、一部の国民の生活の質を落としているため、原因や治療に関するこれまでになく知見が求められていた。今回の研究は、そのような知見を得るための新しいアプローチであったが、有意な結果は得られなかった。メニエール病においては遺伝子が関連する側面もあることは知られていたが、その比重が低いために、統計的に有意な結果を得るためにはより多くの症例サンプルを用いる必要があったと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueno Yuya, Imai Takao, Higashi-Shingai Kayoko, Ohta Yumi, Sato Takashi, Kamakura Takefumi, Ozono Yoshiyuki, Inohara Hidenori	4. 巻 14
2. 論文標題 Stratification of patients with Meniere's disease based on eye movement videos recorded from the beginning of vertigo attacks and contrast-enhanced MRI findings	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2023.1348177	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0件

〔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	太田 有美 (Ohta Yumi) (00598401)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	鎌倉 武史 (Kamakura Takefumi) (30600564)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	佐藤 崇 (Sato Takashi) (30756002)	大阪大学・大学院医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	上野 裕也 (Ueno Yuya) (70846500)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

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	今井 貴夫 (Imai Takao) (80570663)	奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師 (24601)	

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