

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25年 5月 30日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22249057

研究課題名（和文） 次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子の網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive genetic analysis of hearing loss using next generation sequencer.

研究代表者

宇佐美 真一 (USAMI SHINICHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：10184996

研究成果の概要（和文）：

難聴の原因遺伝子はおおよそ 100 種類ぐらい存在すると考えられているが、従来の直接シーケンシング法ではスループットが低いため、数遺伝子を解析するのが限界であり、遺伝子変異を検出できない例が多く認められる状況であった。本研究では、次世代シーケンサーを用いることで、難聴の原因候補遺伝子の全塩基配列を決定し、網羅的に解析を行うことで、より診断率を向上させることを計画した。信州大学が従来より管理する日本人難聴遺伝子データベースに登録されている難聴患者 216 名を対象に、難聴との関連が報告されている 112 遺伝子のエクソン領域の網羅的解析を行った。その結果、効果的に遺伝子解析が実施され、複数の難聴の原因遺伝子変異を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：

Target exon resequencing using Massively Parallel DNA Sequencing (MPS) is a new powerful strategy to discover causative genes in rare Mendelian disorders such as deafness. We attempted to identify genomic variations responsible for deafness by massive sequencing of the exons of the 112 target candidate genes. By the analysis of 216 (120 early-onset and 96 late-detected) randomly selected Japanese deafness patients, who had already been evaluated for common genes/mutations, we efficiently identified causative mutations and/or mutation candidates in 51 genes that could be used to initiate searching for responsible genes. Approximately 63.4% (137/216) of the patients had at least one mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2010年度 | 16,200,000 | 4,860,000 | 21,060,000 |
| 2011年度 | 13,000,000 | 3,900,000 | 16,900,000 |
| 2012年度 | 7,800,000 | 2,340,000 | 10,140,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 37,000,000 | 11,100,000 | 48,100,000 |

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：耳科学，次世代シーケンサー，遺伝子，ゲノム，難聴

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1,000 名に 1 名に認め

られる比較的頻度の高い障害である。従来は、原因も発症メカニズムも不明であるケース

が殆どであったが、遺伝学的解析手法の進歩により、多くの先天性難聴の原因遺伝子変異が同定され、発症メカニズムも徐々に明らかとなってきた。また、疫学的な解析より、先天性難聴の原因の少なくとも50%に遺伝子が関与すると報告されており、原因診断として遺伝子解析が重要であることが示唆されていた。

当研究室では、従来より難聴の遺伝子解析に精力的に取り組んでおり、数多くの遺伝子変異を発見・報告していた。また、臨床上の有用性が明らかとなった10遺伝子47変異に関しては、2008年には先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」として承認を受けて臨床現場での利用が開始していた。

遺伝子診断により原因が明らかになることで、難聴の程度、難聴の型、進行性の有無などが、あらかじめ予測可能となるため、治療法選択・治療計画立案の際に有用な情報となる。また、甲状腺腫や糖尿病などの随伴症状があらかじめ予測可能となり、適切なフォローアップが可能となるなどのメリットがあるため、患者ひとりひとりに応じた難聴のオーダーメイド医療を推進するためには、原因診断である遺伝子診断は欠かせないツールとなりつつあった。

研究開始の数年前までは、難聴の遺伝子解析には直接シーケンス法およびマイクロサテライトマーカーを利用した連鎖解析が用いられてきたが、100種ある候補遺伝子のごく一部しか解析できない。少子化により1家系あたりの家族数が少なくなったため、劣性遺伝形式を取る場合や孤発例の新規原因遺伝子探索は極めて困難。という問題点があり、新規原因遺伝子の解析は非常に困難な状況にあった。

研究開始当時、次世代シーケンサーが徐々に実用化され始め、数多くの原因遺伝子変異を一時に解析する事が実現可能となってきた。本研究では難聴の遺伝子解析にゲノムワイド相関解析と次世代シーケンサーを応用することで、一度に100種類の候補遺伝子の塩基配列をすべて決定する。従来の連鎖解析では解析不能であった劣性遺伝形式や孤発の難聴の原因を解析する。などの難聴遺伝子解析への応用を検討している段階であった。

2. 研究の目的

先天性難聴は新生児1,000名に1名に認められる比較的頻度の高い障害である。従来は、原因も発症メカニズムも不明であるケースが殆どであったが、近年、遺伝学的解析手法の進歩により、多くの先天性難聴の原因遺伝子変異が同定され、発症メカニズムも徐々に明らかとなってきた。また、疫学的調査の結果より、先天性難聴のうち少なくとも50%は遺伝子が関与することが明らかとなっ

ており、遺伝子解析が重要である。遺伝子診断により原因が明らかになることで、難聴の程度、難聴の型、進行性の有無などが、あらかじめ予測可能となるため、治療法選択・治療計画立案の際に有用な情報となる。また、甲状腺腫や糖尿病などの随伴症状があらかじめ予測可能となり、適切なフォローアップが可能となるなどのメリットが大きい。このように、患者ひとりひとりに応じた難聴のオーダーメイド医療を推進するためには、原因診断である遺伝子診断は欠かせないツールである。

従来、遺伝子解析には直接シーケンス法およびマイクロサテライトマーカーを利用した連鎖解析が用いられてきたが、100種ある候補遺伝子のごく一部しか解析できない。少子化により1家系あたりの家族数が少なくなったため、劣性遺伝形式を取る場合や孤発例の新規原因遺伝子探索は極めて困難。という問題点があり、新規原因遺伝子の解析は非常に困難な状況にあった。

しかし、次世代シーケンサーが実用化され、1ランあたり数百億塩基を読み取ることが可能となったため、一度に100種類の候補遺伝子の塩基配列をすべて決定することや、従来の連鎖解析では解析不能であった劣性遺伝形式や孤発の難聴の原因を解析することが可能となってきた。

そこで、本研究では、次世代シーケンサーという最新の分子遺伝学研究ツールを難聴の遺伝子解析に応用することで、従来の手法では解析不可能であった原因を高効率に探索し臨床に還元することを目的とした。

3. 研究の方法

難聴の原因遺伝子はおおよそ100種類ぐらい存在すると考えられているが、従来の直接シーケンス法ではスループットが低いため、数遺伝子を解析するのが限界であった。

本研究では次世代シーケンサーをもちいることで、難聴の原因遺伝子候補の全塩基配列を決定し、網羅的に解析を行うことを目的としている。具体的には、難聴患者約200名を対象に、Covaris（超音波断片化装置）を用いてDNAをおおよそ200塩基に断片化した後に、末端の修復、アダプターの付加を行い、SureSelectのRNAプローブとハイブリダイゼーションを行い、候補遺伝子領域を含むDNA断片の濃縮を行う。濃縮後はシーケンス用のアダプターを付加した後に、ブリッジPCRを用いてDNAの増幅を行ない、次世代シーケンサーにより全塩基配列の決定を行った。SureSelect等を用いた候補遺伝子領域の選択的濃縮に際しては、海外の文献や、Hereditary Hearing loss Homepage (<http://webh01.ua.ac.be/hhh/>)などを参考

に、既に報告されている難聴の原因遺伝子や、まだ遺伝子までは明らかになっていない原因座位に対するビオチン化オリゴをカスタム合成して使用した。

次世代シーケンズ解析後は、得られた塩基配列情報よりクオリティの低いものを除去した後に、ヒトゲノム (hg19) に BWA を用いてマッピングし、Samtools を用いて塩基置換部位の検出を行った。検出された塩基置換部位に ANNOVAR を用いてアノテーションの付加を行い、アミノ酸置換等タンパク質に及ぼす影響の推定を行った。

また、検出された難聴の原因遺伝子変異候補に関しては、実際に直接シーケンズ法による解析を行い、変異の有無を確認した。

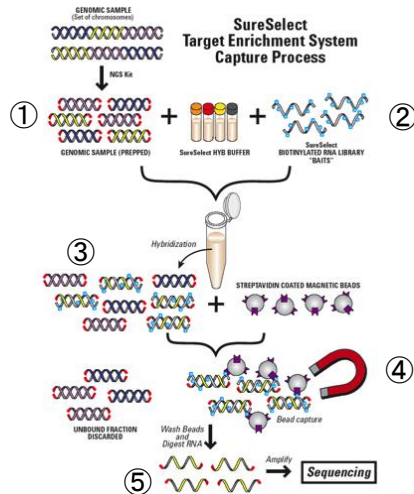


図1：ターゲットキャプチャーの原理

① 200塩基に断片化し、アダプター配列を付加した DNA サンプルに、② エクソン領域と相補な配列を持つビオチン化 RNA プローブ (ベイト) を混合し、③ ハイブリダイゼーションを行った後に、④ ストレプトアビジン磁性ビーズを用いてハイブリダイゼーションした領域だけを回収することで、⑤ 目的とする遺伝子のエクソン領域だけを選別することができる。

4. 研究成果

本研究では、次世代シーケンサーという最新の分子遺伝学研究ツールを難聴の遺伝子解析に応用することで、従来の手法では解析不可能であった原因を高効率に探索し臨床に還元することを目的に、信州大学が従来より管理する日本人難聴遺伝子データベースに登録されている難聴患者 216 名を対象に、難聴との関連が報告されている 112 遺伝子のエクソン領域の網羅的解析を行った。

候補遺伝子のエクソン領域を解析することにより 216 名で 10 万カ所以上の遺伝子変

異が検出された (擬陽性も含む)。

膨大な遺伝子変異より、真の原因遺伝子変異を絞り込む事を目的に、216 名を対象に、*GJB2* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子、*CDH23* 遺伝子に関しては網羅的に直接シーケンズ解析を行い、感度・特異度を最適化するためのカットオフラインを検討した。

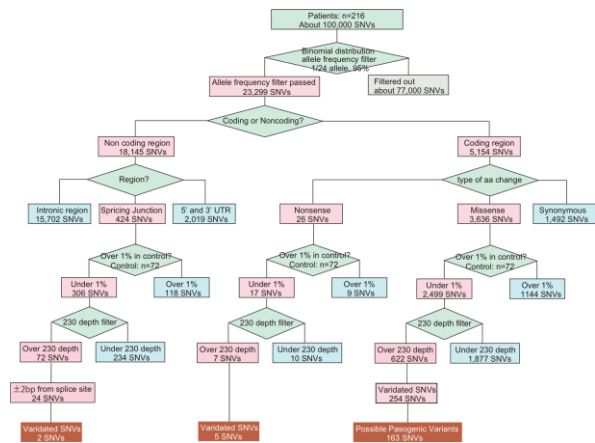


図2：本研究で用いた変異選定アルゴリズム 216 名を対象に、*GJB2* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子、*CDH23* 遺伝子に関しては網羅的に直接シーケンズ解析を行ったデータを基に、depth などのカットオフラインの設定を行った。

上記のフィルターを適応した後、実際に原因遺伝子変異が認められるかを、直接シーケンズ法により確認するとともに、家系サンプルを用いたセグリゲーション解析を実施した。その結果、難聴患者 216 名中 137 名 (63.4%) より難聴の原因遺伝子変異が同定された。また、同定された遺伝子変異の中には、比較的頻度が低く、日本人難聴患者では見つかっていない遺伝子変異も複数見出す事ができた。本研究では、このように、非常に効果的に遺伝子解析が実施され、複数の難聴の原因遺伝子変異を同定することができ、次世代シーケンサーの臨床応用の重要性を明らかにすることができた。

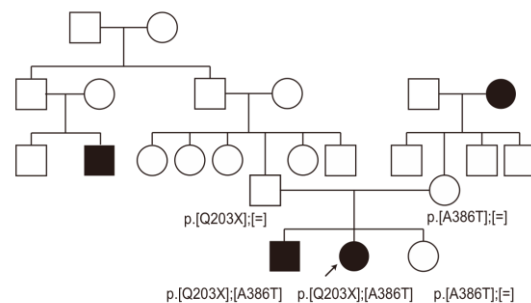


図3：本研究により日本人で初めて見出された *TMPRSS3* 遺伝子変異家系

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析により、罹患者頻度が低い難聴の原因遺伝子を効率的に解析することが可能となり、レアな遺伝子変異を効率的に解析することが可能となった。

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 15 件)

① Naito T, Nishio SY, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, Ishikawa K, Kojima H, Namba A, Oshikawa C, Usami S.

Comprehensive Genetic Screening of KCNQ4 in a Large Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss Cohort: Genotype-Phenotype Correlations and a Founder Mutation. *PLoS One*. 2013;8(5):e63231. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0063231.

② Miyagawa M, Nishio SY, Usami S. Prevalence and clinical features of hearing loss patients with CDH23 mutations: a large cohort study. *PLoS One*. 2012;7(8):e40366. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0040366.

③ Moteki H, Nishio SY, Hashimoto S, Takumi Y, Iwasaki S, Takeichi N, Fukuda S, Usami S. TECTA mutations in Japanese with mid-frequency hearing loss affected by zona pellucida domain protein secretion. *J Hum Genet*. 2012;57(9):587-92. 査読あり
doi: 10.1038/jhg.2012.73.

④ Usami S, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Takumi Y, Suzuki M, Kitano Y, Iwasaki S. Patients with CDH23 mutations and the 1555A>G mitochondrial mutation are good candidates for electric acoustic stimulation (EAS). *Acta Otolaryngol*. 2012;132(4):377-84. 査読あり
doi: 10.3109/00016489.2011.649493.

⑤ Usami S, Nishio SY, Nagano M, Abe S, Yamaguchi T; Deafness Gene Study Consortium. Simultaneous screening of multiple mutations by invader assay improves molecular diagnosis of hereditary hearing loss: a multicenter study. *PLoS One*. 2012;7(2):e31276. 査読あり

り doi: 10.1371/journal.pone.0031276.

⑥ Usami S, Abe S, Nishio S, Sakurai Y, Kojima H, Tono T, Suzuki N. Mutations in the NOG gene are commonly found in congenital stapes ankylosis with symphalangism, but not in otosclerosis. *Clin Genet*. 2012;82(6):514-20. 査読あり
doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01831.x.

⑦ 宇佐美真一 残存聴力活用型人工内耳 (EAS:electric acoustic stimulation) ~ 低侵襲手術、聴力保存成績、術後聴取能、遺伝的背景について ~ 耳鼻臨床 132:3-12. 2012 査読あり

⑧ 宇佐美真一 両側性特発性感音難聴 JOHNS. 28 (5) :775-778. 2012 査読なし

⑨ 宇佐美真一 難聴遺伝子はどこまで解明されたのか。JOHNS. 28 (3) :292-293. 2012 査読なし

⑩ Moteki H, Naito Y, Fujiwara K, Kitoh R, Nishio SY, Oguchi K, Takumi Y, Usami S. Different cortical metabolic activation by visual stimuli possibly due to different time courses of hearing loss in patients with GJB2 and SLC26A4 mutations. *Acta Otolaryngol*. 2011;131(11):1232-6. 査読あり
doi: 10.3109/00016489.2011.593719.

⑪ 宇佐美真一、茂木英明、宮川麻衣子、内藤武彦、西尾信哉、工 穰、岩崎聡. 残存聴力活用型人工内耳 (electric acoustic stimulation) ~ 手術法と聴力保存成績について ~ *Otol Jpn*. 21(5):763-770. 2011 査読あり

⑫ 宇佐美真一. 補聴器と人工内耳の融合 残存聴力活用型人工内耳について. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科*. 83 (6) :393-401. 2011 査読なし

⑬ 宇佐美真一. 難聴の遺伝子診断 *Audiology Japan* 54:44-55. 2011 査読あり

⑭ 宇佐美真一 難聴の遺伝子診断 *日本臨牀*. 69 (2) :357-367. 2011 査読あり

⑮ Tsukada K, Nishio S, Usami S; Deafness Gene Study Consortium. A large cohort study of GJB2 mutations in Japanese hearing loss patients. *Clin Genet*. 2010;78(5):464-70. 査読あり
doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01407.x.

[学会発表] (計 21 件)

①西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、宇佐美真一 次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析 (1) ~方法論および変異検出アルゴリズムについて~第 22 回日本耳科学会総会 2012.10.4~6 名古屋国際会議場

②宮川麻衣子、内藤武彦、西尾信哉、宇佐美真一 次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析 (2) ~見出された原因遺伝子および表現型について~第 22 回日本耳科学会総会 2012.10.4~6 名古屋国際会議場

③矢野卓也、西尾信哉、宇佐美真一 ミトコンドリア遺伝子全領域シーケンスによる難聴の遺伝子解析第 22 回日本耳科学会総会 2012.10.4~6 名古屋国際会議場

④矢野卓也、小林有美子、佐藤宏明、宇佐美真一 MYO15A 遺伝子変異を認めた両側高度感音難聴の 1 症例第 74 回耳鼻咽喉科臨床学会 2012.7.5~6. 東京ドームホテル

⑤Miyagawa M, Nishio S, Fukuoka H, Tsukada K, Usami S. Mutation spectrum and clinical characteristics of hearing loss patients caused by SLC26A4 mutations: a large cohort study. 27th Barany Society Meeting. 2012. 6. 10-13 Uppsala, Sweden

⑥宇佐美真一 難聴のパーソナル医療: 遺伝子診断から人工内耳まで 第 36 回 日本遺伝カウンセリング学会 2012. 6. 8-6. 10 信大附属病院外来棟 4F

⑦岩佐陽一郎、宇佐美真一. 日本人高度感音難聴患者における OTOF 遺伝子変異の頻度の検討 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2012. 5. 10-12

⑧宇佐美真一 難聴の遺伝子診断の進歩と臨床応用 第 116 回日本眼科学会総会 2012. 4. 5-8 東京国際フォーラム

⑨Usami S. Genetics and presbycusis Presbycusis Research Meetings 2012. 1. 13-14 ミュンヘン/ドイツ

⑩宇佐美真一 人工内耳の新しい流れ: EAS と低侵襲手術 第 21 回日本耳科学会総会 2011. 11. 24~26 沖縄コンベンションセンター

⑪Usami S. The genetic background of the patients with cochlear implantation The 8th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related science (APSCI 2011)

2011. 10. 25~28 Korea

⑫Usami S. Achievement of hearing preservation in the presence of an electrode covering the residual hearing region. The 8th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related science (APSCI 2011) 2011. 10. 25~28 Korea

⑬Usami S. Genetic markers and hearing preservation Collegium Oto-Rhino-laryngologium Amicitiae Sacrum 2011. 9. 5~7 ベルギー

⑭Usami S. 難聴の遺伝子解析と臨床応用に関する研究 北京国際耳科学会 2011. 8. 4~8. 5 北京/中国

⑮Usami S. Genetics markers and hearing preservation with Japanese children. 13th Symposium on Cochlear Implants Children 2011. 7. 14-16 シカゴ/アメリカ

⑯Usami S. background of patients with residual hearing: EAS is a good therapeutic option for hearing loss due to CDH23 gene mutations. Hearing Implants: A Remarkable Past and a Brilliant Future. 2010. 12. 9~11 フランクフルト/ドイツ

⑰ Usami S. The responsible genes for Japanese deafness patients and clinical application using Invader assay 2nd East Asian Symposium in Otology 2010. 11. 26~29 国立台湾大学/台湾

⑱宇佐美真一 遺伝性難聴 日本人類遺伝学会 2010. 10. 27~30 大宮

⑲Usami S. Gene expression pattern after insertion of dexamethasone eluting electrode HEARING PRESERVATION WORKSHOP IX 2010. 10. 21-24 MIAMI, FLORIDA/アメリカ

⑳宇佐美真一、熊川孝三、東野哲也、福島邦博先進医療 (先天性難聴の遺伝子診断) の現況 第 111 回日本耳鼻咽喉科科学会総会・学術講演会 2010. 5. 20~22. 仙台国際センター

㉑Usami S. Gene-related hearing loss and cochlear implantation in Japan シーボルト記念シンポジウム 2010. 4. 1~3 長崎大学

[図書] (計 1 件)

①宇佐美真一 きこえと遺伝子 2 金原出版 2012 126 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇佐美 真一 (USAMI SHINICHI)
信州大学医学部・教授
研究者番号：10184996

(2) 研究分担者

熊川 孝三 (KUMAKAWA KOZO)
(財) 冲中記念成人病研究所・虎の門病院・研究員
研究者番号：40142252

佐藤 宏昭 (SATO HIROAKI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：40215827

東野 哲也 (TONO TETSUYA)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：80145424

古屋 信彦 (FURUYA NOBUHIKO)
群馬大学・医学部・教授
研究者番号：80107606

長井 今日子 (NAGAI KYOKO)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：50302469

工 穰 (TAKUMI YUTAKA)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：70312501

茂木 英明 (MOTEKI HIDEAKI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：60422698

(3) 連携研究者

宮川 麻衣子 (MIYAKAWA MAIKO)
信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)
研究者番号：60467165

内藤 武彦 (NAITO TAKEHIKO)
信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)
研究者番号：50467164

西尾 信哉 (NISHIO SHINYA)
信州大学・医学部・助教 (特定雇用)
研究者番号：70467166