

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462637

研究課題名(和文) 難聴大家系の全ゲノム解析による原因遺伝子究明

研究課題名(英文) Identification of causative genetic locus of a large family with hearing loss

研究代表者

関根 章博 (Sekine, Akihiro)

千葉大学・予防医学センター・教授

研究者番号：30425631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：優性遺伝様式を示す、遺伝子診断で原因未知とされた難聴大家系(罹患者12名、非罹患者24名)の次世代シーケンサによる全ゲノム解析で得られたvariationを用いたパラメトリック連鎖解析とGWAS arrayによる家系内相関解析にて原因の探索を行った。両解析共に染色体13番長腕79kb領域に原因候補領域が存在することを確認した(LOD score ~2.71)。さらに、当該領域のtarget captureを用いたPacBioRSによるlong readの高精度塩基配列決定を実施し、高い連鎖不平衡を示す原因を含む4座位の絞込みに成功した。

研究成果の概要(英文)：To identify the causative genetic loci in a large family (affected:12, unaffected:24) with hereditary hearing loss, we performed a parametric linkage analysis using variations detected by whole genome sequencing (HiSeq) and genome wide association study (affected vs unaffected individuals) by human Omni2.5M+exon array. Highest LOD score (2.01~2.71) by parametric linkage mapping was observed a 79kb region in chr13p. Also, 79Mb (p value~1x10-6, odds ratio~14.4) in chr13p included the preceding 79kb was indicated the sole candidate region by genome wide association study. Therefore, sequencing of target 79kb region by PacBioRSII, and succeeded in narrowing the 4 loci included a causative locus exhibiting mutually high linkage disequilibrium.

研究分野：ゲノム研究

キーワード：遺伝性難聴 パラメトリック連鎖解析 大家系 全ゲノム解析 原因未知

1. 研究開始当初の背景

家族集積性の高い(遺伝リスクが高いことが推測される)既知原因遺伝子(GJB2、KCNQ4、MYO7A等の既知原因遺伝子座)診断で原因未知と判定された発症者との話し合いにより、血縁者の協力を得て、難聴大家系の試料集積を行い、原因遺伝子の探索を実施した。当家系構成員の協力の下、91名から成る家系図が作成され、生存者49名、うち、16歳未満の未成年者や同意の得られなかった血縁者を除く36名の協力を得た。36名の内訳は、罹患者12名、非罹患者24名であり、家系図からは本疾患が常染色体優性遺伝形式を示している。成人の間診により、難聴を自覚するのは30歳以降で、その多くが40歳代であることが判明したので、試料(血液由来ゲノム)の収集の際に、確定診断を兼ねて聴力検査を実施したところ、発症の早い血縁者では10歳代後半に高音域の聴力が低下している参加者が発覚し、罹患者高年齢者ではほぼ全音域の聴力が低下していることから、進行型であることが推察された。当家系の遺伝要因を調査するため、その聴力検査を指標として40歳以上で難聴の症状を示す場合とそれ以下で聴力検査によって高音域の障害を呈する方を罹患者と判定し、40歳以上で障害を示さなかった方を非罹患者として、解析を実施した。なお、40歳以下で高音域障害以上の症状を示さなかった方々は、未判定とした。なお、遺伝子診断にも関わらず、原因未知と判定された患者はそれまでの経験則に沿った医療以外には医療の進展が見込めない。本疾患ではその発症は成人してからの場合が多く、原因が判明することで、発症前に医師と相談しながら予防策に努めることができる(本分担研究者である岡野医師はすでに当家系において定期的な聴力試験、経過観察を行い、予防のための取り組みを行っている)。また、原因が判明することで、初めてオミックス解析を始動でき、長期の時間がかかる可能性はあるが、発症分子メカニズムの解明や創薬ターゲットの抽出など新たな医療への展開が導き出せる可能性もある。

2. 研究の目的

発症に強い遺伝リスクの関与が疑われる疾患では、その原因(遺伝子)探索にはゲノム解析が極めて有効な手段となることは周知である。多くの遺伝性疾患の原因はexon上に多く存在するのではないかとされる仮説の下、これまで世界的に精力的に展開されてきたexome解析は確かに遺伝性疾患の多くの原因座位を同定し、これによって多岐に渡る遺伝性疾患の遺伝子診断が実現され、あるいはされようとしている。その代表例として挙げられる疾患の1つに家族性乳癌が知られるが、これらの原因となる既知遺伝子BRCA1/2の遺伝子診断による診断率は50-60%で、残された40%強の患者さんは原因未知のまま、発症前診断も実現せず、医療進展への

期待も持つことができなくなる。一方、本対象となる難聴や幾つかの薬剤誘発の副作用などの多くの疾患で遺伝子診断によって原因の特定率が60%程度で頭打ちになる表現型が多い。つまり、これまでに同定されている原因遺伝子座は、GWAS(Genome-Wide Association Study)あるいはexome解析によって同定された遺伝子で、同法を用いても原因を明らかにできる可能性は低いことが推察される。原因遺伝子(座)同定のためのアプローチは制限される上に、難易度を増す。通常考えられる選択肢としては、サンプルサイズを拡大した相関解析を計画するか、大家系集積によるパラメトリック連鎖解析を実施することが原因同定の可能性のある手段となる。前者は本邦においても別研究組織が実施しているので、そちらの研究成果を期待することとして、本事業ではパラメトリック連鎖解析によって原因が同定できるかが課題となる。実現できれば、現遺伝子診断によって原因未知と判定された罹患者の大きな希望となる。これらのことを考慮し、本試験では全ゲノム解析(WGS:Whole Genome Sequence)を手段とした。一方、HiSeqやIon Protonのようなshort readを基本とするシーケンス法によるWGS解析には一部の配列決定に誤りが混入し、しかも、structure variationのような構造変異を見抜くことが難しくなる。それ故、WGSで得られたvariation情報のうち、GWAS arrayと合致するvariationを連鎖不平衡tagとして最重要視し、詳細ハプロタイプについてはWGSによってのみ得られたvariationを用い、さらに、原因候補領域についてはlong read sequencer(PacBioRS)を用いて詳細な分析を行った。また、一般集団(多数のWGSを得ることは費用的に困難なため)との相関解析を実施する目的でもGWAS arrayによって得られたvariationを活用した。なお、本研究では、原因未知と判定されたプロバンドの患者さんとその血縁者の方々の協力により、大家系の試料集積を実現できた。本来、大家系の試料収集は極めて難しいとされるが、大家系に疾患が集積する場合には、家系内罹患者では原因は同祖由来と考えることが基本となるため、パラメトリック連鎖解析を用いることで遺伝子診断で未知と診断された患者さんたちが原因を究明できる手段となる可能性があり、患者さんの大きな希望ともなる。

3. 研究の方法

口頭および文書での十分な研究説明の上、同意の得られた家系構成員の方々から採血に協力頂き、匿名化後に研究に携わる研究者が個人を特定できない状況下で、血液由来ゲノム試料を精製した。ゲノム上のvariationsの検出は、以下の2法で行った。1つ目の方法は、GWAS(Genome-Wide Association Study)用arrayであるIllumina社humanOmni2.5M+exon(V8, ver1.1)でvariationを同

定した。得られたデータは解析ソフトである GenomeStudio にて variation 検出を行い、call rate >98.0%であることを確認した後、X 染色体について男性でヘテロ接合体(>0.1)を示す variation を除外した。また、すでに我々が所有する健常者集団約 3,000 例の GWAS array data において HWE(HardyWeinberg Equation) < 0.001 を示す variations は除外して解析に利用した。2 つ目の方法は、次世代シーケンサ (Next Generation Sequencer) である HiSeq1000 および HiSeq1500 による pair-end 法 (DNA 断片毎 100b_100b read) を用いた全ゲノム解析 (WGS:Whole-Genome Sequence) によって求めた。得られたデータは、CASAVA(Fastq への変換) BWA(mapping) Picard GATK (variations 検出) を実施した。各々から得られた variations を用いて Merlin¹⁾ によるパラメトリック連鎖解析を実施した。前記 2 試験による原因を含む候補座位を照合した。さらに、家系内罹患者 vs 一般集団の相関解析について PLINK²⁾ を用いて実施した。これら 3 試験によって得られた原因を含む候補領域を照合するとともに、これら領域から原因候補座位を絞り込むために、目的領域の正確な塩基配列を決定し、かつ、variations を漏れなく抽出するために、当該領域を抽出する Ajilent 社の custom sure select によるオリゴ合成を行い、当ツールを用いて断片化したゲノム DNA の目的領域をキャプチャーして PacBioRS によるシーケンスを実施した。データは、SMRT-Analysis によって解析した後、得られた variation の中で、罹患者に認められ、非罹患者に認められない対立遺伝子を抽出して候補座位とした。

4. 研究成果

ゲノム広域および全域解析から得た variation を用いてパラメトリック連鎖解析を実施した結果、染色体 13 番長腕に約 79kb の領域で Lod Score 2.01~2.71 を示す領域を観察した。なお、当該領域の除く他の染色体領域では Lod Score は全て 0.5 以下であった。一方、家系内罹患者 vs 家系内非罹患者での GWAS array tag を用いた相関解析では染色体 13 番長腕に約 7.9Mb の候補領域が選出され、tag の odds 比は 10~14.4 を示した (図 1)。

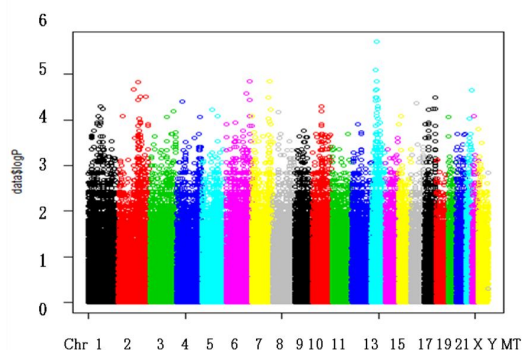


図 1. 家系内相関解析

相関解析によって求められた原因候補領域の中には、前記パラメトリック連鎖解析で高い Lod Score 値を示す領域を含んでいた。以上から、パラメトリック連鎖解析によって求められた 79Kb の領域内あるいはその近傍に当家系の難聴の原因となる座位が存在している可能性が最も高いと判断された。上記結果を導き出す tag SNP には 3SNPs が原因を同定する強いマーカーとして働いていたことが判明したが、3SNPs のうちの 1SNPs は罹患者および非罹患者での MAF (Minor Allele Frequency) がそれぞれ 0.67 と 0.15 で、残る 2SNPs が各々 0.80 と 0.21 となり、これらが優れた tag マーカーとして機能していたが、原因座位そのものではないことが推察された。そこで、この候補領域の詳細な塩基配列を決定しなおすために、前記 79Kb を中心に、その周囲のゲノム領域を抽出するカスタムオリゴを合成し、キャプチャー後、PacBioRS による塩基配列の決定を実施した。その結果、罹患者および非罹患者での MAF に矛盾がない互いに連鎖不平衡 1.0 となる structure variation を含む 4 variations が選出された。いずれも exon 上に存在する variation ではないため機能解析が難しく、1 座位に絞り込むことは困難であるが、4 座位の遺伝子型を同時に決定出来れば当該家系の“診断”は可能となるため、予防処置を講じるための家系内未成年者の遺伝子型決定について御両親との相談を開始した。なお、当該原因遺伝子座については近い将来に論文で公表する (作成中)。一方、これまでに遺伝性難聴の原因遺伝子は 16 遺伝子以上で、その遺伝継承様式からも良く分類されている。本家系の原因候補は染色体 13 番であるが、同染色体上の既知原因遺伝子として GJB2 や GJB6 が知られている。本研究によって同定された座位についてはこれらの遺伝子とは異なる領域に存在する新規原因遺伝子座であることが判明した。

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. Yumi I, Matsumoto H, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Murase K, Ito I, Oguma T, Muro S, Asai K, Tabara Y, Takahashi K, Bessho K, Sekine A, Kosugi S, Yamada R, Nakayama T, Matsuda F, Niimi A, Chin K, Mishima M; Nagahama Study Group.: Mouth Breathing, another Risk Factor for Asthma: the Nagahama Study.; Allergy. 2016 inpress PMID:26991116 doi: 10.1111/all.12885. 査読有り
2. Sakurai K, Miyaso H, Eguchi A, Matsuno Y, Yamamoto M, Todaka E, Fukuoka H, Hata A, Mori C; Chiba study of Mother and Children's Health group. Chiba study of

- Mother and Children's Health (C-MACH): cohort study with omics analyses. *BMJ Open.* 2016 6(1):e010531. 2016 PMID:26826157 doi: 10.1136/bmjopen-2015-010531. 査読有り
3. Tabara Y, Takahashi Y, Setoh K, Kawaguchi T, Gotoh N, Terao C, Yamada R, Kosugi S, Sekine A, Nakayama T, Matsuda F; Nagahama Study group. Synergistic association of elevated serum free fatty acid and glucose levels with large arterial stiffness in a general population: The Nagahama Study. *Metabolism.* 65(1):66-72. 2016 PMID:26683797 doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.011. Epub 2015 Oct 9. 査読有り
 4. Maekawa K, Nakamura R, Kaniwa N, Mizusawa S, Kitamoto A, Kitamoto T, Ukaji M, Matsuzawa Y, Sugiyama E, Uchida Y, Kurose K, Ueta M, Sotozono C, Ikeda H, Yagami A, Matsukura S, Kinoshita S, Muramatsu M, Ikezawa Z, Sekine A, Furuya H, Takahashi Y, Matsunaga K, Aihara M, Saito Y; Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium. Development of a simple genotyping method for the HLA-A*31:01-tagging SNP in Japanese. *Pharmacogenomics.* 16(15):1689-1699 2015 PMID:26490229 doi: 10.2217/pgs.15.115. Epub 2015 Oct 2. 査読有り
 5. Murase K, Tabara Y, Ito H, Kobayashi M, Takahashi Y, Setoh K, Kawaguchi T, Muro S, Kadotani H, Kosugi S, Sekine A, Yamada R, Nakayama T, Mishima M, Matsuda S, Matsuda F, Chin K. Knee Pain and Low Back Pain Additively Disturb Sleep in the General Population: A Cross-Sectional Analysis of the Nagahama Study. *PLoS One.* 10(10):e0140058. 2015. PMID:26444713 doi: 10.1371/journal.pone.0140058. eCollection 2015. 査読有り
 6. Tabara Y, Takahashi Y, Kumagai K, Setoh K, Kawaguchi T, Takahashi M, Muraoka Y, Tsujikawa A, Gotoh N, Terao C, Yamada R, Kosugi S, Sekine A, Yoshimura N, Nakayama T, Matsuda F; Nagahama study group. Descriptive epidemiology of spot urine sodium-to-potassium ratio clarified close relationship with blood pressure level: the Nagahama study. *J Hypertens.* 33(12):2407-2413 2015 PMID:26378682 doi: 10.1097/HJH.0000000000000734. 査読有り
 7. Akagi-Kurashige Y, Yamashiro K, Gotoh N, Miyake M, Morooka S, Yoshikawa M, Nakata I, Kumagai K, Tsujikawa A, Yamada R, Matsuda F, Saito M, Iida T, Sugahara M, Kurimoto Y, Cheng CY, Khor CC, Wong TY, Yoshimura N; Nagahama Cohort MMP20 and ARMS2/HTRA1 Are Associated with Neovascular Lesion Size in Age-Related Macular Degeneration. *Research Group. Ophthalmology.* 122(11):2295-2302 2015 PMID:26337002 doi: 10.1016/j.ophtha.2015.07.032. Epub 2015 Sep 1. 査読有り
 8. Setoh K, Terao C, Muro S, Kawaguchi T, Tabara Y, Takahashi M, Nakayama T, Kosugi S, Sekine A, Yamada R, Mishima M, Matsuda F. Three missense variants of metabolic syndrome-related genes are associated with alpha-1 antitrypsin levels. *Nat Commun.* 6:7754. 2015 PMID:26174136 doi: 10.1038/ncomms8754. 査読有り
 9. Tabara Y, Takahashi Y, Kawaguchi T, Setoh K, Terao C, Yamada R, Kosugi S, Sekine A, Nakayama T, Matsuda F. 7C.07: ASSOCIATION OF SERUM FREE FATTY ACID LEVEL WITH REDUCED REFLECTION PRESSURE WAVE MAGNITUDE AND CENTRAL BLOOD PRESSURE: THE NAGAHAMA STUDY. *J Hypertens.* 33 Suppl 1:e98. 2015 PMID:26102984 doi:10.1097/01.hjh.0000467614.38730.87. 査読有り
 10. Miyake M, Yamashiro K, Tabara Y, Suda K, Morooka S, Nakanishi H, Khor CC, Chen P, Qiao F, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Gotoh N, Tsujikawa A, Meguro A, Kusuhara S, Polasek O, Hayward C, Wright AF, Campbell H, Richardson AJ, Schache M, Takeuchi M, Mackey DA, Hewitt AW, Cuellar G, Shi Y, Huang L, Yang Z, Leung KH, Kao PY, Yap MK, Yip SP, Moriyama M, Ohno-Matsui K, Mizuki N, MacGregor S, Vitart V, Aung T, Saw SM, Tai ES, Wong TY, Cheng CY, Baird PN, Yamada R, Matsuda F; Nagahama Study Group, Yoshimura N. Identification of myopia-associated WNT7B polymorphisms provides insights into the mechanism underlying the development of myopia. *Nat Commun.* 6:6689. 2015 PMID:25823570 doi: 10.1038/ncomms7689. 査読有り
 11. Terao C, Asai K, Hashimoto M, Yamazaki T, Ohmura K, Yamaguchi A, Takahashi K, Takei N, Ishii T, Kawaguchi T, Tabara Y, Takahashi M, Nakayama T, Kosugi S, Sekine A, Fujii T, Yamada R, Mimori T, Matsuda F, Bessho K; Nagahama Study Group. Significant association of periodontal disease with anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese healthy population - The

- Nagahama study. J Autoimmun. 59:85-90. 2015 PMID:25819755
doi: 10.1016/j.jaut.2015.03.002. Epub 2015 Mar 26. 査読有り
12. Nakata I, Yamashiro K, Kawaguchi T, Nakanishi H, Akagi-Kurashige Y, Miyake M, Tsujikawa A, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N; Nagahama Study Group. Calcium, ARMS2 genotype, and Chlamydia pneumoniae infection in early age-related macular degeneration: a multivariate analysis from the Nagahama study. Sci Rep. 5:9345. 2015 PMID:25792034
doi: 10.1038/srep09345. 査読有り
13. Ueta M, Sawai H, Sotozono C, Hitomi Y, Kaniwa N, Kim MK, Seo KY, Yoon KC, Joo CK, Kannabiran C, Wakamatsu TH, Sangwan V, Rathi V, Basu S, Ozeki T, Mushiroda T, Sugiyama E, Maekawa K, Nakamura R, Aihara M, Matsunaga K, Sekine A, Gomes JÁ, Hamuro J, Saito Y, Kubo M, Kinoshita S, Tokunaga K. IKZF1, a new susceptibility gene for cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis with severe mucosal involvement. J Allergy Clin Immunol. 135(6):1538-1545.e17. 2015 PMID:25672763
doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1916. Epub 2015 Feb 8. 査読有り
14. Asai K, Yamori M, Yamazaki T, Yamaguchi A, Takahashi K, Sekine A, Kosugi S, Matsuda F, Nakayama T, Bessho K; Nagahama Study Group. Tooth loss and atherosclerosis: the Nagahama Study. J Dent Res. 94(3 Suppl):52S-58S. , 94(7):1016-1017. 2015 PMID:25406168
doi: 10.1177/0022034514559127. 査読有り
15. Kumagai K, Tabara Y, Yamashiro K, Miyake M, Akagi-Kurashige Y, Oishi M, Yoshikawa M, Kimura Y, Tsujikawa A, Takahashi Y, Setoh K, Kawaguchi T, Terao C, Yamada R, Kosugi S, Sekine A, Nakayama T, Matsuda F, Yoshimura N; Nagahama Study group. Central blood pressure relates more strongly to retinal arteriolar narrowing than brachial blood pressure: the Nagahama Study. J Hypertens. 33(2):323-329. 2015 PMID:25380155
doi: 10.1097/HJH.0000000000000391. 査読有り

〔学会発表〕(計 3件)

1. 第 98 回日本皮膚科学会大分地方会
特別講演 1：弾性線維腫の大家系パラメトリック連鎖解析による原因遺伝子の探索

関根章博、竹村亮、真下陽一、北原輝栄、藤原作平

日時：2016年3月5日(土)～6日(日)
場所：大分県労働福祉会館ソレイユ(大分県・大分市)

2. 第 60 回日本人類遺伝学第 60 回大会.
P212. ショートリードを用いた Whole Genome Sequence で得られた変異に対する評価.

竹村亮、北原輝栄、関根章博

日時：2015年10月16日
場所：京王プラザホテル(東京都・新宿区)

3. 第 39 回日本遺伝カウンセリング学会各術集会

シンポジウム 3 次世代シーケンサ 時代の臨床遺伝

遺伝カウンセリングに必要な全ゲノム解析情報の精度と検証

関根章博、竹村亮、真下陽一、北原輝栄、山下泰生、羽田明

日時：2015年6月26日(金)～28日(日)
場所：三井ガーデンホテル(千葉県・千葉市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://cpms.chiba-u.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 章博(SEKINE Akihiro)
千葉大学・予防医学センター・教授
研究者番号：30425631

(2) 研究分担者

岡野 高之(OKANO Takayuki)
京都大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60642931

(3)連携研究者

北尻 真一郎 (KITAJIRI Shinichiro)
京都大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00532970

山本 典生 (YAMAMOTO Norio)
京都大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70378644

竹村 亮 (TAKEMURA Ryo)
千葉大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：50747516

北原 輝栄 (KITAHARA Terue)
千葉大学・予防医学センター・特任研究員
研究者番号：70761162

真下 陽一 (MASHIMO Yoichi)
千葉大学・大学院医学研究院・技術職員
研究者番号：90422253