

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6月8日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791607

研究課題名（和文） CDH23 遺伝子の大規模スクリーニングと難聴発症のメカニズムに関する研究

研究課題名（英文） Prevalence and clinical features of hearing loss patients with CDH23 mutations.

研究代表者

我妻 道生 (WAGATSUMA MICHIO)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00419409

研究成果の概要（和文）：

CDH23 遺伝子変異は、遺伝子変異の種類によって臨床像が異なる事が報告されており、過去の報告では、ナンセンス変異やフレームシフト変異では、両側感音難聴と網膜色素変性症を合併する Usher 症候群を呈するが、ミスセンス変異の場合には感音難聴のみを呈することが報告されている。本研究では、日本人感音難聴患者を対象に CDH23 遺伝子解析を行い、遺伝子変異の種類と頻度を明らかにするとともに、その臨床像のとりまとめを行った。その結果 26 種類の新規遺伝子変異を見出すとともに、その臨床的特徴を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

CDH23 is likely to be an important cause for hearing loss patients but the prevalence of CDH23 mutation in Japanese hearing loss patient is not clear. To assess the importance of CDH23 mutations in non-syndromic hearing loss, two-step screening was applied and clinical characteristics of the patients with CDH23 mutations were examined in this study and found 26 possible pathogenic mutations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：感音難聴, 内耳, 遺伝性難聴, CDH23

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1000 人に 1 人程度に認められる障害であり最も頻度の高い障害のひとつである。また、出生時は聴力が正常でも、壮年期頃より徐々に聴力が低下し老人性難聴になることは一般的に知られている。このように、難聴は非常に身近な病気である

が、原因・治療ともに不明な点が多く、発症時期の予測・予後等を予測することは困難であった。

近年、難聴には遺伝子が大きく関わっている事が明らかとなっており原因遺伝子が多数特定されており、また、遺伝子変異の種類ごとにその臨床的特徴が異なる事が報

告されている。当研究室では、これまで精力的に先天性難聴の原因遺伝子解析を行い、数多くの難聴原因遺伝子の特定を行ってきた。

CDH23 遺伝子は、感音難聴および網膜色素変性症を特徴とする Usher 症候群 (USH1D) の原因遺伝子でもあり、また、常染色体劣性遺伝形式を取る非症候群性感音難聴 (DFNB12) の原因遺伝子である事が報告されている。視覚および聴覚の2つの感覚器の機能に重要な遺伝子である。*CDH23* 遺伝子により産生される蛋白質は、有毛細胞上の動毛・不動毛を結合する細胞間接着因子の Tip Link の主成分である事が証明されている。また、Tip Links は、動毛・不動毛を結びつけ形態を保つ働きをするとともに、機械的刺激で開閉するイオンチャンネル (MET channel) を制御している事が数多くの電気生理学的実験で証明されている。

当研究室は、従来より国内における難聴遺伝子研究のセンター的役割を果たしており、難聴患者の DNA と臨床データが共に既に 4500 名分以上蓄積されている (研究開始当時・現在は約 6000 名分)。予備的研究において、常染色体劣性遺伝形式を取る非症候群性感音難聴者 64 家系に対し、直接シーケンス法を用い *CDH23* 遺伝子検索を行ったところ、5 家系より 17 種類の遺伝子変異を見出した (Wagatsuma et al., 2007)。しかし、見出された 17 種類の遺伝子変異のうち、家系図などから確実に難聴の原因遺伝子変異であることが確認されたのは 4 種類であり、*CDH23* 遺伝子の遺伝子診断を臨床に応用するためには大規模を対象に解析することが必要である状況であった。

2. 研究の目的

先天性難聴は新生児 1000 人に 1 人程度に認められる障害であり最も頻度の高い障害のひとつである。また、高度の難聴では、音声言語によるコミュニケーションの障害となるため、適切な医学的介入が必要である。

従来、難聴は原因不明であるとされていたが、近年の遺伝子解析技術の発達により数多くの遺伝子変異が見出されており、徐々にその遺伝的背景が明らかとなってきた。

CDH23 遺伝子変異は、遺伝子変異の種類によって臨床像が異なる事が報告されており、過去の報告では、ナンセンス変異やフレームシフト変異のようにタンパク質が途中で合成されなくなってしまうようないわゆるトランケートド変異では、両側感音難聴と網膜色素変性症を合併する Usher 症候群を呈するが、タンパク質の構造変化をもたらすようなミスセンス変異の場合には感音難聴のみを呈することが報告されている。

しかしながら、本邦における *CDH23* 遺伝子変異による難聴患者に関する報告は少なく、

また、遺伝子変異の種類や頻度および各遺伝子変異の臨床像は明らかとなっていない。

本研究では、日本人感音難聴患者を対象に *CDH23* 遺伝子解析を行い、遺伝子変異の種類と頻度を明らかにするとともに、その臨床像のとりまとめを行い、日本人難聴患者における本遺伝子の特徴を明らかにする事を目的とした。

特に研究代表者が、予備的研究として日本人難聴患者 64 家系を解析した結果、17 種類の *CDH23* 遺伝子変異を見出したが、見出された 17 種類の *CDH23* 遺伝子変異のうち、家系解析などから難聴の原因遺伝子変異であることが確定できたのは 4 種類であり、残りの変異については難聴への関与が未定となっていた。

そこで、本研究では大規模集団を用いたスクリーニング解析を行うことで、病的変異が多型かに関して確定を行うことおよびその臨床像を取りまとめることもあわせて目的とした。

3. 研究の方法

研究計画立案前に、予備的研究として日本人難聴患者 64 家系を解析した結果、17 種類の *CDH23* 遺伝子変異を見出した。見出した *CDH23* 遺伝子変異のうち、家系解析などから難聴の原因遺伝子変異であることが確定できたのは 4 種類であり、残りの変異については難聴への関与が未定となっていた。

そこで、本研究では大規模集団を用いた解析を行うことで、病的変異が多型かに関して確定を行うことおよびその臨床像を取りまとめることを計画した。

① 約 300 例を対象に、*CDH23* 遺伝子の全エクソン領域とスプライシング領域を PCR 法により増幅した後に、直接シーケンス法により遺伝子変異の探索を行った。

② 約 1000 家系を対象に、既知の *CDH23* 遺伝子変異 (4 種類) をインバーダー法で調べる大規模スクリーニング解析を行い *CDH23* 遺伝子のうち既報 4 変異の頻度を調べる。

また、*CDH23* 遺伝子 4 変異のスクリーニング検査の結果、*CDH23* 遺伝子変異がヘテロ接合体として見つかった家系を対象にダイレクトシーケンスを行い、新規の遺伝子変異を同定する。

また、見出された新規遺伝子変異に関してはコントロール 192 例の直接シーケンス解析を行い、変異の頻度を確認した。

③ *CDH23* 遺伝子変異のデータベース構築

従来より、遺伝子変異の種類と臨床型が相関することが知られている。我々は日本人から見出された *CDH23* 遺伝子変異は、高音漸傾

型の聴力像を取り難聴は進行性であることを報告してきた。本研究では、前項の①～②で見出した *CDH23* 遺伝子変異を有する患者の臨床データを収集してデータベースを構築し、遺伝子型と臨床型の相関解析を行う。

特に *CDH23* 遺伝子変異は、遺伝子変異の種類によって臨床像が異なる事が報告されているため、視覚症状に関しても臨床像の収集を行う。過去の報告では、ナンセンス変異やフレームシフト変異のようにタンパク質が途中で合成されなくなってしまうようないわゆるトランケートド変異では、両側感音難聴と網膜色素変性症を合併する Usher 症候群を呈するが、タンパク質の構造変化をもたらすようなミスセンス変異の場合には感音難聴のみを呈することが報告されているため、本邦の *CDH23* 遺伝子変異による難聴患者においても同様の結果となるかについて検討を行う。

4. 研究成果

①直接シーケンス法による解析

当研究施設で従来より管理している日本人難聴遺伝子データベースに登録されている、日本人非症候群性両側感音難聴患者かつ劣性遺伝家系または孤発例 304 家系（過去に報告済みの 64 症例を含む）を対象に *CDH23* 遺伝子の全エクソン領域とスプライシング領域を PCR 法により増幅した後に、直接シーケンス法により遺伝子変異の探索を行った。その結果、明らかな多型（同義置換変異およびコントロールに高頻度で認められる変異）を除き、26 種類の遺伝子変異が見出された。（※見出された 26 種類の変異には過去に報告された 4 種類の変異（p. P240L, p. R301Q, p. Q1716P, p. R2029W）を含む）。

②TaqMan genotyping 法による *CDH23* 遺伝子の大規模遺伝子変異スクリーニング

見出された遺伝子変異 26 種類に対して、TaqMan Genotyping Assay を設計し、1396 検体に対して *CDH23* 遺伝子変異解析を実施した。

その結果、家系解析から病的変異であることが推定された遺伝子変異が 10 種類、および病的変異が稀な多型かが不明である変異が 16 種類同定された。

家系解析により病的変異であることが推定された 10 種類の遺伝子変異に関してはヒト～ゼブラフィッシュ (*Homo sapiens*, *P. troglodytes*, *B. taurus*, *M. musculus*, *R. norvegicus*, *G. gallus*, *D. rerio*) まで高度に保存された領域に存在していた。また、アミノ酸置換の影響を予測するプログラムを用いたコンピューター予測 (PolyPhen2: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) の結果、10 種類ともタンパク質構造に大きな

影響を及ぼすことが示唆された。

さらに、10 種類の変異のうち 5 種類は、*CDH23* の EC ドメイン内の DRE モチーフ、DXNDN モチーフ、DXD モチーフの中に存在していた。これらのモチーフは、アスパラギン産 (D) やグルタミン酸 (E) などの酸性アミノ酸が Ca²⁺イオンと結合することで EC ドメインの立体構造を形成するために重要である事が報告されており (Sotomayor et al., PNAS. 2010)、今回見出された変異においても同様に、EC ドメインの立体構造に影響を及ぼす事で難聴を引き起こしている可能性が示唆された (表 1)。

表 1 本研究で病的変異であることが確認された新規 *CDH23* 遺伝子変異

Amino acid change	Nucleotide change	EXON	Ca ²⁺ binding motif	アレル頻度 (1396名中)
p.P240L	c.719C>T	7	-	1.612
p.R301Q	c.902G>A	9	DRE	0.107
p.E956K	c.2866G>A	25	DRE	0.107
p.T1368M	c.4103C>T	32	-	0.036
p.R1417W	c.4249C>T	35	-	0.143
p.D1626A	c.4877A>C	39	DXNDN	0.036
p.Q1716P	c.5147A>C	39	-	0.107
p.R2029W	c.6085C>T	46	DRE	0.43
p.N2287K	c.6861T>G	50	DXNDN	0.072
p.E2438K	c.7312G>A	52	-	0.036

また、病的かどうかスクリーニングからは不明であった 16 種類のミスセンス変異のうち、2 種類 (p. A1443G, p. R1588W) は家系解析より病的変異ではなく、レアな多型である事が示唆された。また、1 種類 (p. V1807M) に関しては、遺伝子変異周辺の配列により TaqMan Genotyping Assay の設計が不可能であったため、多検体を用いた解析を行う事が出来なかった。

また、16 種類の変異のうち 2 種類は、*CDH23* の EC ドメイン内の DRE モチーフ、DXNDN モチーフ、DXD モチーフの中に存在していた (表 2)。

③ *CDH23* 遺伝子変異の種類と臨床像のとりまとめ

見出された変異に関して臨床像のとりまとめを行ったところ、多くのケースで低音域に残存聴力を有する高音漸傾型の難聴を呈すること、また進行性の難聴となることを明らかにした。また、見出された変異のうち R2099W 変異のホモ接合体変異では発症年齢が 50 歳代と非常に遅く、遅発性あるいは緩やかな進行性の経緯をとることが明らかと成った (図 1)。このことは C57BL6J マウスが加齢性難聴の表現型を呈する原因遺伝子変異が *CDH23* に見つかるという過去の報告と

一致する興味深いものであった。

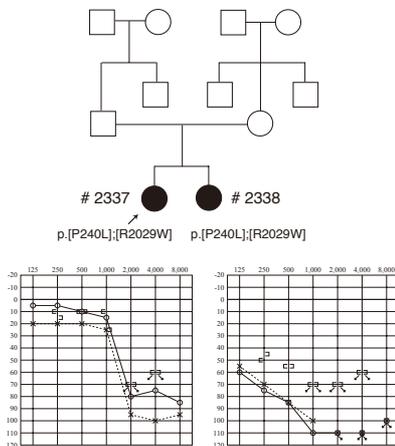
また、以上の結果を取りまとめて論文として報告を行った (Miyagawa et al., in press)。

表 2 本研究で同定された病的変異の可能性のある新規 *CDH23* 遺伝子変異

Amino acid change	Nucleotide change	EXON	Ca ²⁺ binding motif	アレル頻度 (1396名中)
p.D160N	c.478G>A	4	DXD	0.072
p.V803I	c.2407G>A	23	-	0.107
p.S1415I	c.4244G>T	35	-	0.036
p.A1443G *	c.4328C>G	35	-	0.143
p.R1588W **	c.4762C>T	38	-	0.931
p.V1711I	c.5131G>A	40	-	0.072
p.V1807M	c.5419G>A	42	-	N/A
p.S1876N	c.5627G>A	43	-	0.215
p.V1908I	c.5722G>A	44	-	0.43
p.A2130V	c.6389C>T	48	-	0.036
p.R2171C	c.6511C>T	48	DXNDNR	0.036
p.Q2227P	c.6680A>C	48	-	0.036
p.L2473P	c.7418T>C	53	-	0.036
p.I2669V	c.8005A>G	56	-	0.036
p.F2801V	c.8401T>G	59	-	0.036
p.G2912S	c.8734G>A	61	-	0.036
p.R3175C	c.9523C>T	68	-	0.036

* not confirmed by segregation study
 **one normal hearing subject with homozygotes
 N/A:TaqMan probe did not designed in Applied Biosystems web site.

図 1 R2029W 変異が homo で見出された 1 家系 # 2337 / 2338



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 2 件)

① Usami S. Miyagawa M. Nishio S. Moteki H. Takumi Y. Suzuki M. Kitano Y. Iwasaki S. Patients with *CDH23* mutation and the 1555A>G mitochondrial mutation are good candidates for

electric acoustic stimulation (EAS), *Acta Otolaryngol*, 査読あり, 132 巻 2012,377-384

②宮川麻衣子、茂木英明、工 穰、宇佐美真一、人工内耳埋め込み術を行った *CDH23* 遺伝子変異による難聴症例、耳喉頭頸、査読あり, 84 巻, 2012, 59-63

[学会発表] (計 1 件)

①工 穰、岩佐陽一郎、吉村豪兼、矢野卓也、内藤武彦、宮川麻衣子、茂木英明、西尾信哉、宇佐美真一、先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」の現状、第56回 日本聴覚医学会総会・学術講演会、2011年10月27日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我妻 道生 (WAGATSUMA MICHIO)
 信州大学・医学部附属病院・特任研究員
 研究者番号：00419409

(3) 連携研究者

宮川麻衣子 (MIYAGAWA MAIKO)
 信州大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：60467165

西尾 信哉 (NISHIO SHIN-YA)
 信州大学・医学部・助教
 研究者番号：70467166