

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年9月3日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06760

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる遺伝子解析の難聴診断・治療への応用

研究課題名(英文)Target sequencing of hearing loss patients using next generations sequencing

研究代表者

坂田 阿希 (Sakata, Aki)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：80783860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：東大病院耳鼻科難聴外来を受診した難聴患者が19名、およびその家族42名を対象に解析。ターゲットシーケンスは、難聴遺伝学的検査でも取り上げられている19遺伝子とUsher症候群とWaardenburg症候群の原因遺伝子をカバーするように計32遺伝子アミノ酸コード配列全体を対象にし、AgilentのSureSelectを用い、illumina Miseqを用いて解析を行った。結果、19難聴遺伝学的検査でも調べられている、いわゆるhot spotについて3人の患者サンプルに病因とみられる変異が見つかった

研究成果の概要(英文)：We performed target exon sequencing using a next generation sequencer about 19 hearing loss patients and 42 family members. The gene panel covered about 18 genes and Usher syndrome genes, and Waardenburg syndrome genes. We used Sureselect and Illumina Miseq. We assessed SNPs and indels using ANNOVAR software. We prioritized these by their minor allele frequency less than 3% using allele frequency data from several public database including the 1000 Genomes Project and the NHLBI-6500 Exomes, DB exome data from Kyoto university, and in house variant database. Pathogenic gene candidates identified by exome sequencing, inherited pattern of 3 genes were confirmed as 19 genes. Three cases of autosomal recessive genes CDH23, USH2A, TMPRSS3, was recognized variations which were not reported before. The NGS analysis could identify the extensive gene variation not covered all in the existing genetic test.

研究分野：医学

キーワード：遺伝

1. 研究開始当初の背景

(1)

小児難聴の5割が遺伝性とされており、一部の後天性や進行性難聴でも遺伝子変異が関与すると考えられている。変異遺伝子により蝸牛の障害部位やどの周波数が難聴をきたすのかに違いがあることが報告されており、病因遺伝子を同定することは人工内耳などの治療の方針を決めるのに役立つ。これまでに100以上の難聴病因遺伝子変異が報告されているが、現在の難聴遺伝子検査では、日本人で高頻度に見られる遺伝子の変異部位のみを解析しているため、検出率はおよそ1/2～3/5に過ぎない。

(2)

疫学調査から出生1000人に2人の割合で重度・高度難聴児が発症することが分かっている。この割合はその他の先天性疾患の中でも非常に多い。重度・高度難聴は適切な療育がなされない場合、コミュニケーションの障害・言語力の低下をもたらす、社会参加に対しても大きな足かせとなるため、早急に確実に対応する必要がある課題である。近年人工内耳の進歩で、両側重度・高度難聴児に対しても早期の補聴および療育を行い、重度難聴で補聴の効果がないと判明した場合は早期に人工内耳を行うことで、普通学級への進学も可能となるレベルの言語・聴取能力獲得が可能となってきている。世界的にも本邦においても人工内耳の適応年齢が早まってきているのが実情である。しかしながら、難聴の程度や補聴効果をより早期に予測する手段としては、従来から用いられている聴性脳幹反応(ABR)や条件詮索反応聴力検査(COR)では限界があると言わざるを得ないのが現状である。また、進行性に難聴をきたす症例もあり、このような症例では新生児聴覚スクリーニングをパスするため難聴の発見が遅くなり十分な治療効果が得られない結果となる症例も散見されている

2. 研究の目的

近年難聴遺伝子の研究が進み、難聴にかかわる遺伝子はおおよそ100種類と想定されるようになった。現在、遺伝子異常が原因の先天性難聴患者の割合は5割程度といわれているが、今後進行性難聴者を含めたさらなる遺伝子の検索が行われることで、難聴者に占める遺伝子異常の割合はさらに多くなると予想されている。難聴遺伝子の解明は、これまで分類不能であった難聴患者を原因別に詳細に分類することが可能となり、さらに遺伝子がコードするタンパクの機能および局在を解明することで難聴のメカニズム解明も可能となる。その結果、難聴の程度や進行の有無をより高精度で予測し、臨床現場で難聴患者へのより早期の適切な対応を行うことが可能となることが期待される。実際例として、GJB2/Cx26遺伝子(内耳支持細胞同士ギャップ結合タンパクをコードする)異常はその多くが重度難聴を呈し人工内耳の効果が高いことが分かってきており、早期人工内耳に踏み切る重要な情報源として用いられるようになってきている。またMYO7Aの症例(Usher症候群)では難聴に加えて視力障害が予想されることが判明しており、将来的な視力障害を見据えて、音の方向感獲得を目的に、両側人工内耳を推奨するなど人工内耳治療戦略に重要な役割を果たすようになってきている。

次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子の解析を行うことを目的とした。東京大学先端科学研究所ゲノムサイエンス分野において研究を行うことで、本研究室は次世代シーケンサーを用いた研究では世界をリードしており、多数のwhole exomeデータを有し、copy number解析でも多数の優れた報告を排出しているため、これらデータが利用可能であることは今後の遺伝子解析の遂行に極めて有利な位置にあると考えた。

東京大学耳鼻咽喉科は全国でも有数の難聴

患者数を持ち、検体の収集にも有利である。また、人工内耳をはじめとした重度難聴疾患の治療も積極的に行っており臨床データも豊富にあるため、遺伝子変異と臨床所見の関連性をより正確に見極めることが可能と考えられた。

3. 研究の方法

本研究は東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス講座の協力のもと施行した。

東京大学耳鼻咽喉科の難聴外来また小児難聴外来を受診、同意が得られた難聴患者とその家族に対して採血もしくは口腔内の粘液採取を行い検体を採取。より解析の精度を上げるため、可能な範囲で正常聴力の親族にも同意が得られた場合は対象とする。難聴患者は先天性、もしくは家族歴などから遺伝の関与が疑われる後天性進行性難聴の患者とする。研究患者には未成年者を含む。

採取した組織より遺伝子を抽出の上、先端科学技術研究センターにおいて次世代シーケンサーを用いて全エクソン塩基配列解析を行う。遺伝形式や、聴力図等の臨床データも参考に、原因遺伝子の探索研究を行った。

4. 研究成果

難聴の症例とその両親についてターゲット検査を行った。解析は、東大病院耳鼻科難聴外来受診した難聴患者が 19 名、およびその家族 42 名を対象にした。東京大学医学部倫理委員会の審査・認証を経て、同意を得られた患者を対象にしている。ターゲットシーケンスは、難聴遺伝学的検査でも取り上げられている 19 遺伝子と Usher 症候群と Waardenburg 症候群の原因遺伝子をカバーするように計 32 遺伝子アミノ酸コード配列全体を対象にし、Agilent の SureSelect の試薬を用い、illumina Miseq を用いて解析を行った。得られた変異のうちの除外については、

dbSNP と 1000 Genomes, ToMMO, 当科でのデータベースに登録されている minor allele frequency 3%以上の変異は一塩基多型 (SNP) として除外した。結果、19 難聴遺伝学的検査でも調べられている、いわゆる hot spot について 3 人の患者サンプルに病因とみられる変異が見つかった(3/19 = 15.8%)。3 人について *CDH23*, *USH2A*, *TMPRSS* の常染色体劣性遺伝子に複合ヘテロでの候補の position に新規の変異を認めた。

従来の変異子検査では解析しえなかった難聴遺伝子の新規の変異部位の探索が可能であった。遺伝子の種類により難聴の程度や進行の有無を高精度に予測することが可能になったため、解析結果によって人工内耳の選択等臨床的に有用な情報を得ることができて速やかな対応が可能となった。元々の試薬から変更し、ミトコンドリアと常染色体を同じ実験系でターゲット解析を行えるようになり当初より進展した難聴遺伝子解析が可能となった

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 阿希 (SAKATA, Aki)

東京大学・医学部付属病院・登録診療員
研究者番号：80783860

(3) 連携研究者

山岨 達也 (YAMASOBA, Tatsuya)

東京大学・医学部付属病院・教授
研究者番号：60251302

榎尾 明憲 (KASHIO, Akinori)

東京大学・医学部付属病院・講師
研究者番号：20451809

油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)

東京大学先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：10202657

辰野 健二 (TATSUNO, Kenji)

東京大学先端科学技術研究センター・特任研
究員

研究者番号：80775239