

令和元年6月21日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11176

研究課題名(和文) 遺伝学的所見に基づくANS D、中耳奇形の新分類の確立

研究課題名(英文) Development of novel classification based on genetic analysis for ANSD and middle ear anomaly

研究代表者

野口 佳裕 (Noguchi, Yoshihiro)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：50282752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA採取と純音聴力検査を実施した8例(難聴者4例、非難聴者4例)を含む常染色体優性の非症候群性中耳奇形家系および3世代にわたる常染色体優性遺伝ANS D家系を対象に全エクソーム解析を実施した。中耳奇形に関しては、7例のDNAを用い、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を行った。見出された変異のうち家族歴との整合性を確認したところ、7つの遺伝子に候補変異を同定した。このうち、HOXA2遺伝子は発生に関与する転写因子をコードしており、これまでに常染色体劣性・優性遺伝形式をとる小耳症の原因遺伝子として報告されている遺伝子であり、遺伝性中耳奇形の新規原因遺伝子であると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、遺伝的背景のほとんど明らかとなっていない遺伝性の中耳奇形に関して新規の原因遺伝子を同定することができた。このことは、今後の病態解明や治療法開発などに有用であるだけでなく、聴覚生理の理解の上でも重要な基盤となる。特に、見出された変異が転写因子であることより、発生の際にどのような役割を果たしているかの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Middle ear anomaly can occur as a part of syndromic disorders, or as isolated defects. In this study, we performed whole exome sequencing analysis and data analysis was performed for a Japanese family with autosomal dominant nonsyndromic mixed hearing loss and middle ear anomaly without apparent microtia. Four potential causative variants, including a duplication variant in HOXA2, a deletion variant in MYCT1, and two non-synonymous missense variants were detected. Direct sequencing confirmed that all the four variants were segregated with hearing loss. Among these identified variants, we considered HOXA2 to be the most potential candidate causative gene. Direct sequencing analysis was also carried out to screen HOXA2 mutations for other 19 patients with middle ear anomaly or microtia, but no mutation was detected. HOXA2 mutations were reported to cause autosomal recessive or dominant microtia in three families, but hearing loss was less constantly recognized in the families.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 遺伝子 中耳奇形 ANSD

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性難聴の遺伝子診断について

先天性高度難聴は新生児 1000 人に 1 人に認められる頻度の高い感覚器障害のひとつであり、その 60%以上に遺伝子が関与することが知られている。現在までに 100 種類を超える原因遺伝子が同定されており、非常に遺伝的異質性の高い疾患である。難聴の遺伝子解析は、難聴の原因を明らかにするだけでなく、内耳（聴覚）の分子機構を解明するためにも非常に重要である。

本邦では 2012 年 4 月より「先天性難聴の遺伝学的検査」が保険収載された。また、2015 年より次世代シーケンサーを用いた既知難聴遺伝子の網羅的解析が導入されている。難聴の遺伝学的検査は、遺伝カウンセリング、人工内耳の適応決定、予後推定などに有用であるだけでなく、原因遺伝子に基づく難聴の新分類、分類に応じた病態評価が可能になるメリットがあると考えられている。実際、2015 年 7 月に指定難病に認定された「若年発症型両側性感音難聴」では遺伝学的検査に基づいた知見が診断基準に取り入れられている。

このように、疾患を原因に基づいて再分類することで、疾患の発症メカニズムの解明や、より効果的な治療法の開発につながることを期待されている。

(2) Auditory Neuropathy Spectrum Disorder および中耳奇形について

Auditory Neuropathy Spectrum Disorder (ANSD)は、内毛細胞～聴覚伝導路のいずれかが障害されるが外毛細胞は正常な機能を有することにより発症する比較的まれなタイプの難聴であり、聴性脳幹反応 (ABR) は反応低下（あるいは無反応）であるにもかかわらず、耳音響放射 (OAE) は正常という特徴的な臨床所見を有する。ANSD の約 40%は遺伝性であることが知られており、*OTOF*、*PJKV*、*DIAPH3*、*AIFM1* などの原因遺伝子が同定されているが、未だ原因の明らかとなっていない症例も多く、新規遺伝子の関与が想定されている。

また、中耳奇形の原因遺伝子としては、*NOG*、*EYA1*、*TCOF1* 遺伝子など症候群性難聴の原因遺伝子は同定されているが、非症候群性の遺伝性中耳奇形の原因遺伝子は同定されておらず、やはり新規遺伝子の関与が想定されている。

今後、遺伝性難聴研究を発展させ医療に還元するには、遺伝性難聴の中で特定の臨床所見を有する疾患群に絞りを絞り、新規難聴遺伝子を同定すると同時に既知の難聴遺伝子を含めた遺伝学的所見に基づく新分類を確立していく必要がある。

2. 研究の目的

前述のように、先天性高度難聴の原因のうち約 60%は遺伝子が原因であるため、難聴の遺伝子解析は、原因診断のみならず分子病態解明のためにも重要である。研究代表者は、現在までに明らかとなっていない新規遺伝子の同定を目的に、全エクソーム解析にて優性遺伝形式をとる auditory neuropathy spectrum disorder、優性遺伝形式をとる非症候群性中耳奇形の解析を行い、新規の原因候補遺伝子を見出した。本研究では、今までの研究を発展させ、全国から収集された日本人難聴患者 DNA バンクから ANSD および中耳奇形の家系を選定し遺伝子解析を行うことで、ANSD および中耳奇形の 1) 遺伝学的所見に基づく新分類の確立と 2) 病態解明を目的とする。

特に、遺伝性難聴の中で特定の臨床的所見を示す疾患群 (ANSD、中耳奇形) にターゲットを絞り、全国から収集された膨大な難聴者 DNA サンプルを用いる点である。

本研究ではこれまでの研究を発展させ、6500 例以上の日本人難聴患者 DNA サンプルより、ANSD および中耳奇形という特徴的な臨床所見を有する症例を選定し解析を行うことにより、新規原因遺伝子の同定、遺伝子解析に基づいた疾患の新分類が可能になると予想される。

また、治療法に関する詳細な検討を行う。特に ANSD では蝸牛神経障害の有無により補聴器や人工内耳成績が異なるため遺伝子診断が重要である。また中耳奇形は、術前 CT では形態学的異常を正確に捉えられない例 (アブミ骨固着、微小の耳小骨奇形など) が存在するため、遺伝学的所見から各疾患群の病態を明らかにすることで、難聴の分子機構の評価、中耳手術や人工内耳の予後推定が可能となることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 遺伝学的解析

前年度までに実施したエクソーム解析により、ANSD の新規原因候補遺伝子が 34 遺伝子まで絞り込まれていたため、本研究では、全国から収集された 6500 例の日本人難聴患者 DNA バンクより、臨床所見から ANSD と診断された家系を選定し、各家系の発端者の DNA を用い、34 種類の候補遺伝子の翻訳領域を PCR にて増幅し、直接シーケンス法 (あるいは次世代シーケンス法) により遺伝子解析を行った。

見出された変異に関しては 1000 人ゲノム計画や 6500 エクソーム計画などの公的データベースに認められる多型などのフィルターをかけ選別を行なった。フィルターにより選別された候補遺伝子変異に関しては、他の家族構成員の遺伝子解析を行い、難聴の有無と変異の有無の整合性 (segregation) を確認し、原因遺伝子変異を同定した。

(2) 免疫組織学的解析

上述の遺伝学的解析により同定した原因遺伝子のうち、抗体が入手可能なものに関しては、蛍光抗体法による免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡により内耳における局在を観察した。具体的には、生後1日、3週、2カ月の近交系マウス (C57BL/6) より迷路骨胞を摘出し4%パラフォルムアルデヒド内に入れる。蝸牛頂に小孔を開けた後、前庭窓、蝸牛窓より4%パラフォルムアルデヒドを還流し、室温で1時間固定する。その後、PBS内で蝸牛膜迷路を摘出する。各遺伝子に対する抗体を用い免疫染色を行い、蝸牛および蝸牛神経での発現の有無と、その局在について検討を行った。局在に関しては、特にANSDの原因となりうる部位で局在を示すか否かについて重点的に検討を行った。

(3) ANSD および中耳奇形家系に対する遺伝子解析

日本人難聴患者 DNA バンクより、ANSD 家系および中耳奇形家系を選定し遺伝子解析を行う。ANSD 家系に対しては、既知の原因遺伝子 (*OTOF*, *PJKV*, *DIAPH3*, *AIFM1*) および新規の原因遺伝子を対象に直接シーケンス法により翻訳領域の塩基配列を決定する。中耳奇形に対しては、新規に見出された原因遺伝子のほか、既知の症候群性の中耳奇形を伴う難聴の原因遺伝子 (*NOG*, *EYAI* など) に関して遺伝子解析を行った。得られた variant の中から病因変異を同定する。また、見出された遺伝子に関してはマウス内耳の蛍光抗体法による免疫染色を行い、内耳における局在を確認した。

(4) 遺伝学的所見に基づく ANSD、中耳奇形の分類と病態評価

ANSD、中耳奇形家系それぞれにおいて、各遺伝子変異の種類と割合を検討した。さらに、変異が認められた家系を対象に、遺伝子ごとに難聴の程度、難聴の型、進行の程度、めまい随伴の有無などの臨床情報を詳細に評価した。また、ANSD に対しては補聴器や人工内耳の効果、中耳奇形に対してはCT (あるいは手術所見) より奇形の特徴を評価するとともに、中耳手術の効果に関して検討を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝性中耳奇形症例の遺伝子解析

本研究では、DNA 採取と純音聴力検査を実施した8例 (難聴者4例、非難聴者4例) を含む常染色体優性の非症候群性中耳奇形家系を対象に遺伝子解析を実施した。発端者の中耳奇形は、単脚アブミ骨と骨橋を示していた。

7例のDNAを用い、次世代シーケンサー (Ion Proton システム) による全エクソーム解析を行った。見出された変異のうち、タンパク質に影響を及ぼす変異 (ミスセンス変異、ナンセンス変異、スプライシング変異、フレームシフト変異など) を抽出し、さらに1000人ゲノム、6500エクソームデータベースにおける保因者頻度 (MAF) が1%以下の変異を抽出した。

さらに、抽出された変異に関して、家族歴との整合性を確認したところ、7つの遺伝子に候補変異を同定した (*HOXA2* 遺伝子の重複変異; *MYCT1* 遺伝子の欠失変異; *SCN1D* 遺伝子、*CCNL2* 遺伝子、*AMER3* 遺伝子、*EPC2* 遺伝子、*POPDC2* 遺伝子のミスセンス変異)。同定した変異に関しては、直接シーケンス法により変異と難聴の有無の一致を確認した。

これら見出された遺伝子変異のうち、*MYCT1* 遺伝子は癌抑制遺伝子として報告されていること、また、5種類のミスセンス変異は、いずれも *in silico* 予測プログラムにて「Tolerant あるいは Benign」と判断されたことから、病的変異の可能性は少ないと考えられた。一方、*HOXA2* 遺伝子は発生に関与する転写因子 (ホメオボックス遺伝子) をコードしており、これまでに常染色体劣性あるいは優性遺伝形式をとる小耳症の原因遺伝子として報告されている遺伝子であった。

本研究により *HOXA2* 遺伝子に同定された重複変異は homeodomain に位置しており、フレームシフトによりトランケーション変異となると予測された。このようにタンパク質が途中で作られなくなるような変異の場合には、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により、作られるタンパク質が不足するハプロ不全により難聴と耳小骨奇形が発症すると考えられた。以上の結果より、研究の成果として、他に随伴症状を伴わない「非症候群性」の中耳奇形の原因遺伝子として初めて同定することができた。そこで、各種中耳奇形あるいは小耳症を有する難聴症例19例を対象に直接シーケンス法により *HOXA2* のスクリーニングを施行したが、他の19家系からは候補となる *HOXA2* 遺伝子変異は同定されなかった。従って、*HOXA2* 遺伝子変異は中耳奇形において比較的まれな原因遺伝子であると考えられた。また、残りの19家系のうち家族サンプルの揃っている家系を対象に全エクソーム解析を行い、候補遺伝子の絞り込みを行った。

具体的には、非症候群性常染色体劣性遺伝形式の中耳奇形を示す3世代の日本人家系に遺伝子解析を行った。9例の家族構成員 (うち2例の姉妹が中耳奇形) より DNA 採取と純音聴力検査を施行した。中耳奇形の2姉妹は両側の中耳手術が施行されており、全耳にキヌタ骨長脚欠損とアブミ骨低形成を認める所見であった。中耳奇形の2姉妹、妹、両親を対象に次世代シーケンサー (Ion Proton システム) による全エクソーム解析を行い、得られた変異のアノテーション、フィルタリングを行い、原因候補遺伝子を探索したが、セグリゲーションが得られるよう

な候補遺伝子は同定できなかった。したがって、フィルタリングにて除外した上・下流領域、ncRNA 領域、非翻訳領域や今回解析の対象外となったイントロン領域に、原因となるバリエーションが存在する可能性が示唆された。今後、全ゲノム解析を含めた検討を行っていく予定である。

(2) auditory neuropathy spectrum disorder の遺伝子解析

三世代からなる常染色体優性遺伝形式をとる auditory neuropathy spectrum disorder 家系(難聴者 3 例、非難聴者 1 例)を対象に全エクソーム解析を行った。見出された変異を元にアノテーション、フィルタリングを行い家族歴との整合性(セグリゲーション)の検討を行ったところ、39 種類まで原因となる候補バリエーションを絞り込むことができた。絞り込まれた 39 種類の遺伝子の中には、機能上シナプトパチーとして ANSD を起こしうる遺伝子 X のナンセンス変異が含まれていた。この遺伝子に関して、マウス内耳の蛍光免疫染色を行ったところ、内有毛細胞に局在が認められ、聴覚機能への関与が示唆された。また、同じバリエーションが全エクソーム解析を行った別の優性遺伝家系にも同定された。しかし、京都大学の日本人大規模コントロールデータ (HGVD)において、同バリエーションのアリル頻度は 0.006 と比較的高く、優性遺伝性疾患の原因としては頻度が高いため、病原性を確定するには至らなかった。

また、他の候補変異に関して、内耳での遺伝子発現等を確認していくつか候補となる変異を選別した。現在、さらにサンプル数を増やして見出された変異の病原性の有無に関して検討を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Kobayashi M, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Fujikawa T, Ohya K, Sakaguchi H, Miyanohara I, Sugaya A, Naito Y, Morita SY, Kanda Y, Takahashi M, Ishikawa K, Nagano Y, Tono T, Oshikawa C, Kihara C, Takahashi H, Noguchi Y, Usami SI. WFS1 mutation screening in a large series of Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis. *PLoS One*. 2018;12: e0193359.
- ② Kitano T, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Oda K, Ohya K, Miyazaki H, Hidaka H, Nakamura KI, Murata T, Matsuoka R, Ohta Y, Nishiyama N, Kumakawa K, Furutate S, Iwasaki S, Yamada T, Ohta Y, Uehara N, Noguchi Y, Usami SI. POU4F3 mutation screening in Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis identified novel variants associated with autosomal dominant hearing loss. *PLoS One*. 2017;12: e0177636.
- ③ 野口佳裕. 日常診療における遺伝子診断—診療の手引きをふまえて. *Otol Jpn*. 2017;27:43-48.
- ④ 野口佳裕. 難聴遺伝子検査. *耳鼻咽喉科頭頸部外科*. 2017;89:95-99.
- ⑤ Noguchi Y, Fukuda S, Fukushima K, Gyo K, Hara A, Nakashima T, Ogawa K, Okamoto M, Sato H, Usami S, Yamasoba T, Yokoyama T, Kitamura K. A nationwide study on enlargement of the vestibular aqueduct in Japan. *Auris Nasus Larynx*. 2017;44:33-39.

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yoshihiro Noguchi, Shin-ya Nishio, Shin-ichi Usami. Two Different Sequencing Platforms Identified an Additional Phenotype Caused by a *HOXA2* Variant in a Family with Mixed Hearing Loss and Middle Ear Anomaly without Microtia. Association for Research in Otolaryngology 2019. 2019 年
- ② 高橋優宏、岩崎聡、古舘佐起子、野口佳裕、岡野光博、宇佐美真一. 一側混合性難聴に対する人工中耳(Vibrant Soundbridge)の 1 症例. 第 28 回日本耳科学会. 2018 年
- ③ Yoshihiro Noguchi, Shin-ichi Usami. A duplication mutation in *HOXA2* causes autosomal dominant nonsyndromic mixed hearing loss and middle ear anomaly. Association for Research in Otolaryngology 2018. 2018 年
- ④ 野口佳裕、喜多村健、宇佐美真一. 回転性めまいの有無による前庭水管拡大症例の臨床的検討. 第 76 回日本めまい平衡医学会. 2017 年
- ⑤ 野口佳裕、西尾信哉、和佐野浩一郎、藤川太郎、木村彰方、宇佐美真一. *HOXA2* 重複変異は常染色体優性非症候群性混合性難聴と中耳奇形を引き起こす. 第 62 回 日本人類遺伝学会. 2017 年
- ⑥ 野口佳裕、宮川麻衣子、茂木英明、宇佐美真一. ヌーナン症候群および類縁疾患における人工内耳. 第 62 回 日本聴覚医学会総会. 2017 年
- ⑦ 野口佳裕、西尾信哉、和佐野浩一郎、宇佐美真一. 外耳、中耳奇形例に対する *HOXA2* 遺伝子解析. 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会. 2017 年
- ⑧ 野口佳裕. 日常診療における遺伝子診断—診療の手引きをふまえて. 第 26 回日本耳科学会. 2016 年

- ⑨ 野口佳裕、西尾信哉、宇佐美真一. *HOXA2*変異によるアブミ骨奇形を呈する常染色体優性遺伝性混合性難聴. 第26回日本耳科学会, 2016年

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：宇佐美 真一

ローマ字氏名：Shin-ichi Usami

研究協力者氏名：西尾 信哉

ローマ字氏名：Shin-ya Nishio

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。