

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11337

研究課題名(和文) 沖縄県の難聴患者における効率的難聴遺伝子診断の構築

研究課題名(英文) An effective diagnostic strategy for deaf patients in Okinawa Islands using a next-generation sequencing and exome sequencing.

研究代表者

我那覇 章 (GANAHA, AKIRA)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：00347155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：41家系110例に対してターゲットリシーケンス解析を行った。10家系において病的変異と考えられるバリエーション(CCDC50, PTPQR, CDH23, MYO15A, TRIOBP, TEMPRESS3, KCNQ4, EYA4, USH2A)を確認した。ターゲットリシーケンス解析により原因遺伝子を特定し得なかった15家系62例に対してエクソーム解析を行いOTOG, CDC42, WFS1, TANGO6の遺伝子変異をそれぞれ3, 1, 1, 1家系に認めた。OTOG遺伝子変異は軽度難聴の原因として論文報告した。CDC42遺伝子変異例は臨床所見と併せて武内・小崎症候群と診断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が用いたターゲットリシーケンス解析は、現在の保険医療による先天性難聴難聴の遺伝子診断では診断できない新規変異による難聴の8家系を同定し、難聴の遺伝子診断において有用であることを確認した。ターゲットリシーケンスにおいて原因不明であった15家系中、2家系において難聴の原因遺伝子を2家系において難聴の原因が疑われる遺伝子を同定し、ターゲットリシーケンス解析後にエクソーム解析を行うことの有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Targeted resequencing for hearing loss was performed in forty-one families. Pathogenic substitutions in CCDC50, PTPQR, CDH23, DIAPH1, TEMPRESS3, KCNQ4, EYA4 and USH2A genes were identified in one family respectively. The substitution of MYO15A was identified in two families. Whole-exome sequencing was performed in fifteen families who were not identified in targeted resequencing. OTOG, CDC42, WFS1 and TANGO6 were identified in three, one, one and one family respectively. We published articles on the substitutions of DIAPH1 and OTOG gene. The patient with substitution of CDC42 was diagnosed as Takenouchi-Kosaki syndrome.

研究分野：耳科学，難聴遺伝子

キーワード：難聴遺伝子 次世代シーケンス解析 エクソーム解析

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでに 98 難聴遺伝子を対象とした難聴遺伝子診断パネルを作成し、沖縄県の症候群性難聴の 41 家系、非症候群性難聴の 40 家系に対して次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス解析を行った。その結果、症候群性難聴の 34 家系 (83%)、非症候群性難聴の 15 家系 (38%)において難聴の原因と考えられる遺伝子変異を同定し、作成した難聴遺伝子診断パネルの有用性を確認した。原因遺伝子変異を同定した症例のうち、症候群性難聴の 8 家系、非症候群性難聴の 9 家系において新規変異の関与を認め、これらの症例は現在の保険医療で行われている検査では診断できない。また、症候群性難聴で最も頻度の高い前庭水管拡大症およびペンドレッド症候群においては、27 家系中 24 家系 (89%)において SLC26A4 遺伝子の p.H723R または IVS15+5G>A の 2 変異を調べることで診断可能である結果であった。原因不明であった症候群性難聴に対しては、既知の原因遺伝子に加えプロモーター領域を含めた解析を行ったが、原因となる遺伝子変異を特定できなかった。以上より、沖縄県においては遺伝学的背景が本土とは異なることを考慮しこれまでに作成した難聴遺伝子診断パネルによる解析に加え、全エクソーム解析を含めた段階的な難聴遺伝子診断の構築が必要である。

## 2. 研究の目的

ターゲットリシーケンス解析および全エクソーム解析を用いた難聴患者の遺伝子解析を行い、沖縄県の難聴患者における原因遺伝子の解明、沖縄県における難聴の原因遺伝子を検討した効率的な遺伝子診断の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では沖縄県出身者のうち、以下を対象とする。

臨床的に難聴を認め、その診断が確立している患者

患者の親族 (患者で見出された遺伝子変異が病的なものかを決定する)

コントロール (患者に見出された遺伝子変異が病的なものかを確認する)

直接シーケンス、ターゲットリシーケンス解析

1. 難聴者とその家族より全血 10ml を採取し gDNA、total RNA を抽出する。
2. EVA または PS の臨床診断例は直接シーケンスによる SLC26A4 の解析を行う。他の難聴者に対しては、既知の 98 遺伝子のエクソン領域をターゲットとした Sure Select target DNA enrichment を用いた次世代シーケンサーにより塩基配列を決定する。
3. リファレンスゲノム、dbSNP 等との照合による変異部位、SNP の抽出、アミノ酸配列に影響を与える変異を抽出する。多型の判定にはデータベース NCBI dbSNP、1000Genome database、DEAFNESS VARIATION DATABASE 等を用いる。

全エクソーム解析による原因遺伝子同定

ターゲットリシーケンス解析で原因を特定できなかった症例に対して、全エクソン領域に対して塩基配列決定と変異の抽出を行う。その際、Trio 解析を基本とする。

疾患の原因と思われる変異の検証

抽出した変異に対し、疾患関連予測 (in silico 解析)および家系情報、健聴者コントロール、臨床情報により、変異が疾患の原因かを検証する。スプライシング受容部位の変異など、必要に応じて発現解析・機能解析を加える。

## 4. 研究成果

難聴患者をリクルートし研究計画の難聴遺伝子診断の流れ (図 1) に則り難聴の遺伝子解析を行った。これまでの症例を加え、沖縄県のペンドレッド症候群の 28 家系に対して SLC26A4 遺伝子の p.H723R および IVS15+5G>A の 2 変異を調べることで、26 家系 (93%) の診断が可能であった。以上より臨床的にペンドレッド症候群と診断された症例は既知の 2 変異を調べることで効率的な遺伝子診断が可能であることが再確認された。

ペンドレッド症候群以外の難聴例 (41 家系、110 例)において、難聴の 98 遺伝子に対するターゲットリシーケンス解析を行った。41 家系の内訳は非症候群性難聴が 40 家系、症候群性難聴 (Usher 症候群)が 1 例であった。家系内解析を同時に行い、41 家系中 10 家系において病的変異を疑うバリエーション (表 1) を確認した。CDH23 遺伝子の変異以外は新規変異であり、沖縄の難聴遺伝子変異は従来の保険医療による難聴遺伝子診断では診断困難である結果であった。

ターゲットリシーケンス解析で原因を特定できなかった家系のうち、家系内でトリオ解析以上の家系内解析が可能な検体数を収集し得た 15 家系 62 例に対して全エクソーム解析を行った。6 家系において難聴の原因が疑わ

表 1 原因疑い変異 (ターゲットリシーケンス解析)

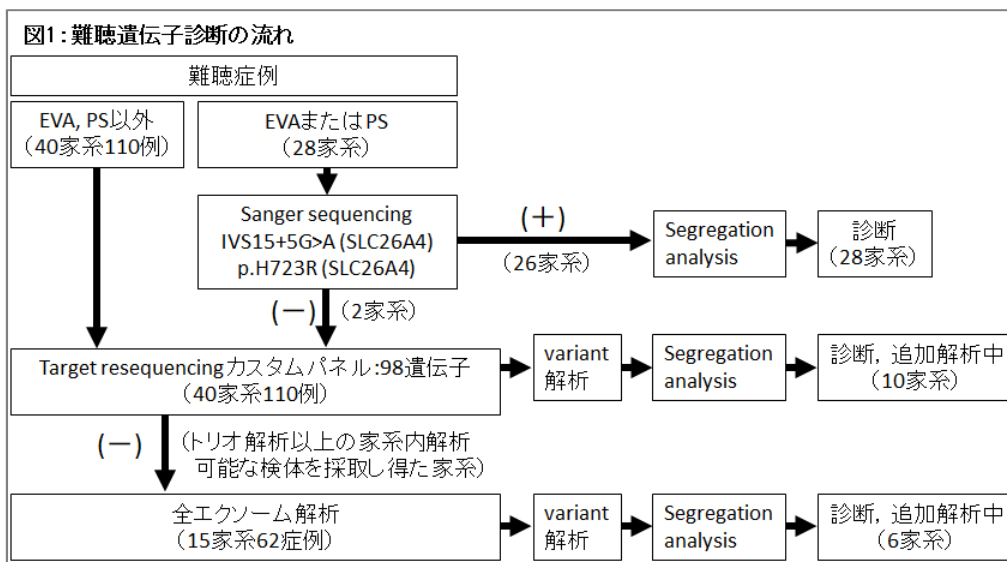
NM_174908(CCDC50):c.868C>T,p.(R290W)
NM_001145026(PTPRQ):c.6261G>A,p.W2016*
NM_001171923(CDH23):c.719C>T,p.P240L
NM_016239(NYO15A):c.671A>G,p.Tyr224Cys
NM_016239(NYO15A):c.3658G>A,p.Gly1220Arg
NM_001039141(TRIOBP):c.951G>T,p.E317D
NM_001039141(TRIOBP):c.4484A>T,p.E1495V
NM_172163(KCNQ4):c.1807G>A,p.V603L
NM_004100(EYA4):c.602_605delCCAT,p.(Ala201Alafs*93)
NM_032119(ADGRV1):c.12535C>T,p.Arg4179*
NM_032119(ADGRV1):c.14515C>G,p.Gln4839Glu
NM_016239(MYO15A):c.743G>A,p.R248Q
NM_016239(MYO15A):c.5393C>G,p.1798R
NM_206933(USH2A):c.11328T>G,p.Tyr3776*

れるバリエーション (OTOG: 3 家系, CDC42: 1 家系, TANGO6: 1 家系, WFS1: 1 家系) (表 2) を同定した。そのうち, OTOG 遺伝子変異は長期聴覚経過の臨床像を含めて論文報告した。CDC42 遺伝子変異を認めた例は, 同じ変異が米国で 1 例報告されており, 臨床所見と併せて Takenouchi-Kosaki 症候群の診断に至った。他 2 遺伝子については追加解析中である。

表 2 原因疑い変異 (全エクソン解析)

NM_001791(CDC42):c.G203A,p.Arg68Gln
NM_001277269(OTOG): c.330C>G, p.Tyr110*
NM_024562(TANGO6):exon14:c.A2664C:p.E888D
NM_006005(WFS1):exon4:c.G413A:p.R138H

以上の結果より, 沖縄県の難聴遺伝子解析においては, ペンドレッド症候群は SLC26A4 遺伝子の 2 既知変異の解析により診断し, それ以外の難聴例では研究代表者が作成した難聴遺伝子診断パネルによるターゲットリシーケンス解析を行った後, 原因不明例に対して全エクソン解析を行うことで, 約 40% (追加解析例含む) の難聴例において遺伝子診断が可能となり, 現行の保険医療では診断できない新規変異を含めて効率的な診断を可能にした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ganaha A, Kaname T, Shinjou A, Chinen Y, Yanagi K, Higa T, Kondo S, Suzuki M.	4. 巻 173
2. 論文標題 Progressive macrothrombocytopenia and hearing loss in a large family with DIAPH1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A.	6. 最初と最後の頁 2826-2830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.38411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ganaha A, Tono T, Kaname T, Yanagi K, Higa T, Kondo S, Maeda H, Suzuki M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Suprameatal Cochlear Implantation in a CHARGE Patient With a Novel CHD7 Variant and KALLMANN Syndrome Phenotype: A Case Report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Otol Neurotol.	6. 最初と最後の頁 990-995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000001481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ganaha A, Kaname T, Yanagi K, Tono T, Higa T, Suzuki M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical characteristics with long-term follow-up of four Okinawan families with moderate hearing loss caused by an OTOG variant.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 6:37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-019-0068-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 我那覇章、與那覇綾乃、鈴木幹男、東野哲也
2. 発表標題 OTOG遺伝子変異による難聴
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会学術講演会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Ganaha, Tadashi Kaname, Kumiko Yanagi, Mikio Suzuki, Tetsuya Tono
2. 発表標題 Cochlear implantation in a patient with Takenouchi-Kosaki syndrome
3. 学会等名 European Academy of Otolology & Neuro-Otology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	要 匡 (Kaname Tadashi)  (40264288)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・部長  (82612)	