

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16900

研究課題名(和文) 優性遺伝形式をとる遺伝性難聴に対する次世代シーケンサーを用いた網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive Genetic Analysis of Japanese Autosomal Dominant Sensorineural Hearing Loss Patients

研究代表者

岩佐 陽一郎 (Yoh-ichiro, Iwasa)

信州大学・医学部・助教(特定雇用)

研究者番号：10613002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：優性遺伝形式をとる難聴は、先天性非症候群性難聴の10%程度であるとされており、比較的頻度の低い稀な疾患である。現在までに約30種類の遺伝子が同定されているが、家系ごとに原因遺伝子変異の種類や臨床経過が大きく異なるため、優性遺伝形式をとる難聴の臨床像は必ずしも明らかとなっていない。本研究では、当研究室が管理する日本人難聴患者DNAデータベースより、原因遺伝子が特定できていない優性遺伝形式をとる遺伝性難聴家系をピックアップし、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行った。その結果、今回変異検索を行った207例中、86名(41.5%)に少なくとも一つの難聴の原因となりうる遺伝子変異を認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により日本人難聴患者の原因遺伝子変異の種類や頻度を明らかにするとともに、どのような難聴を呈するかといった臨床的特徴を明らかにすることができた。特に、原因遺伝子の種類により聴力像が異なるという情報は、補聴器や人工内耳といった難聴に対する治療法を決める上で有用な情報として活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In general, autosomal dominant inherited hearing loss does not have a founder mutation, with the causative mutation different in each family. For this reason, there has been a strong need for efficient diagnosis methods for autosomal dominant sensorineural hearing loss (ADSNHL) patients. This study sought to verify the effectiveness of our analysis algorithm for the screening of ADSNHL patients as well as the usefulness of the massively parallel DNA sequencing (MPS). In this study, we analyzed seventy-five Japanese ADSNHL patients from 53 ENT departments nationwide participated in this study. We conducted genetic analysis of 75 ADSNHL patients using the Invader assay, TaqMan genotyping assay and MPS-based genetic screening. A total of 46 (61.3%) ADSNHL patients were found to have at least one candidate gene variant.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝子 難聴 常染色体優性遺伝 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性難聴の原因に関して

先天性難聴は新生児 1,000 名に 1 名に認められる比較的頻度の高い障害である。従来は、原因も発症メカニズムも不明であるケースが殆どであったが、近年の遺伝学的解析手法の進歩により、多くの原因遺伝子変異が同定され、発症メカニズムも徐々に明らかとなってきている。

疫学調査によると、優性遺伝形式をとる難聴は、先天性非症候群性難聴の 10%程度であるとされており、比較的頻度の低い稀な疾患である。現在までに約 30 種類の遺伝子が同定されているが、家系ごとに原因遺伝子変異の種類や臨床経過が大きく異なるため、優性遺伝形式をとる難聴の臨床像は必ずしも明らかとなっていない。加えて、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の場合、罹患者数が少なく、また、家系ごとに原因遺伝子や臨床経過が大きく異なるため、効果的な診断法や治療法は未だ確立していない。さらに、優性遺伝形式をとるため再発率（子が同じ難聴となる確率）が 50%であることより、患者の心理的負担が非常に大きく、診断法・治療法の開発が期待されている。

(2) 優性遺伝形式をとる難聴の聴力像に関して

前述のように、優性遺伝形式をとる難聴は、先天性非症候群性難聴の 10%程度であるとされており、比較的頻度の低い稀な疾患であるため、罹患者数が少なく、臨床的特徴が不明確であった。

興味深いことに、優性遺伝形式をとる難聴の場合、原因遺伝子により典型的な聴力像を呈する 경우가多く（例：*KCNQ4* 遺伝子：高音障害型難聴、*TECTA* 遺伝子：皿型、*WFS1* 遺伝子：低音障害型難聴）例が知られており、原因遺伝子毎の聴力の特徴を明らかにすることが、将来的には、難聴の程度、難聴の型、進行性などの予測につながるため、治療法選択・治療計画立案の際に有用な情報となると期待されている状況であった。

2. 研究の目的

(1) 日本人難聴患者における優性遺伝形式をとる難聴の遺伝子変異の頻度・種類の解明

先天性難聴は新生児 1,000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い障害であり、その原因のうち約 50~60%に遺伝子が関与することが示唆されている。優性遺伝形式をとる難聴は、先天性非症候群性難聴の 10%程度であるとされており、比較的頻度の低い稀な疾患であるため、罹患者数が少なく、その詳細な変異の種類や頻度に関しては必ずしも明らかとなっていない。

そこで、本研究では、従来の遺伝子解析手法では解析不能であった優性遺伝形式をとる難聴患者を対象に、次世代シーケンサーを用いた候補遺伝子の網羅的解析を行い、遺伝子変異の種類および頻度を明らかにすることを目的とした。

(2) 臨床像について詳細に検討し、遺伝子型と表現型の相関の検討

前述のように、優性遺伝形式をとる難聴は比較的稀な疾患であるが、原因遺伝子変異の種類により、難聴の程度、難聴の型、進行性などが異なっていることが知られている。これらの情報は、患者ひとりひとりに応じた難聴のオーダーメイド医療を推進するために有用かつ重要な情報となる。非常に興味深いこととして、優性遺伝形式をとる難聴の原因遺伝子の中には、特徴的な聴力型を示す原因遺伝子が知られている（*WFS1* 遺伝子：低音障害型、*TECTA* 遺伝子：皿型、*KCNQ4* 遺伝子：高音障害型）。

本研究では、(1)の次世代シーケンス解析により原因遺伝子変異を同定された症例に関して、聴力像などの臨床情報を収集し分析を行うことで、各原因遺伝子の臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 日本人難聴患者における優性遺伝形式をとる難聴の遺伝子変異の頻度・種類の解明

本研究では、当研究室が管理する日本人難聴患者 DNA データベース（約 6,500 例）より、原因遺伝子が特定できていない優性遺伝形式をとる遺伝性難聴家系をピックアップし、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行った。

具体的には、当研究室が管理する日本人難聴患者 DNA データベースより、原因遺伝子が特定できていない優性遺伝形式をとる遺伝性難聴家系の患者 100 例をピックアップし、その DNA の濃度をインターカレーター法を用いて正確に測定する。Ion AmpliSeq Designer を用いて、既知難聴原因遺伝子の全エクソン領域を増幅するプライマーセットを設計する。解析する原因遺伝子としては hereditary hearing loss ホームページ (<http://hereditaryhearingloss.org/>) を参照し、過去に難聴との関連が報告されている 35 遺伝子を対象にした。

Ion AmpliSeq library kit ver 2.0 を用いてマルチプレックス PCR 法により難聴の原因遺伝子の

全エクソン領域を増幅し、エマルジョン PCR を行ってビーズを調整し、Ion Proton システムを用いて次世代シーケンス解析を行った。また、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の中で高頻度に見出される KCNQ4 の c. 211delC 変異は次世代シーケンスにて検出されないため、Taqman 法を用いて変異の解析を行なった。

得られたシーケンスデータは Ion Proton サーバーに内蔵の TMAP ソフトウェアにより hg19 にマッピングした。変異の部分は Ion Torrent Suit の variant caller plug in を用いて検出した。得られた変異に対して、ANNOVAR を用いてアノテーションを行い、病原性の判断を実施した。病原性の判断は ACMG ガイドライン 2015 に準拠して実施した。

(2) 遺伝子型と表現型の相関の検討

上記の次世代シーケンス解析により変異を同定することのできた家系を対象に、罹患者の聴力像などの詳細な臨床情報を収集し、遺伝子毎に取りまとめて臨床的特徴の検討を行なった。また、米国アイオワ大学との共同研究により、KCNQ4 遺伝子、TECTA 遺伝子、WFS1 遺伝子の 3 遺伝子に関して、米国の難聴患者と日本人難聴患者の聴力像の比較検討を行なった。

4. 研究成果

(1) 日本人難聴患者における優性遺伝形式をとる難聴の遺伝子変異の頻度・種類の解明

方法に記載したとおり、信州大学の管理する日本人難聴患者 DNA データベースより原因遺伝子が特定できていない優性遺伝形式をとる遺伝性難聴家系の患者のパネル解析を行った。具体的には、Ion AmpliSeq Designer を用いて、過去に難聴関連遺伝子として報告のある遺伝子のエクソン領域をマルチプレックス PCR 法により増幅し、IonProton システムを用いて次世代シーケンス解析を行った。また、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の中で高頻度に見出される KCNQ4 の c. 211delC 変異は次世代シーケンスにて検出されないため、Taqman 法を用いて変異の解析を行った。また、家系図からは母系遺伝と優性遺伝形式の判別がつきにくい場合もあるため、ミトコンドリア遺伝子変異 (mit1555A>G、mit3243A>G) の解析もインベーター法を用いて実施した。さらに難聴の原因として最も頻度の高い GJB2 遺伝子に関しては直接シーケンス法により解析を行なった。

その結果、今回変異検索を行った 207 例中、4 例で GJB2 遺伝子変異の複合ヘテロ接合体変異が見出された。その後の家族解析から、4 家系とも GJB2 遺伝子変異による難聴患者と保因者が結婚して難聴児が生まれた Pseudo dominant の家系であることが明らかとなった。また、時制シーケンサーで検出困難な KCNQ4 遺伝子の c. 211delC 変異が 2 例から、ミトコンドリア m. 1555A>G、m. 3243A>G がそれぞれ 2 例から検出された。また、次世代シーケンス解析により、86 名 (41. 5%) に少なくとも一つの難聴の原因となりうる遺伝子変異を認めた (表 1)。

Patients	Gene	Nucleotide Change	Amino acid Change	Control (chromosome)	Functional Prediction								Severity*	Type	References	
					SIFT	PolyPhen2	LRT	Mutation Taster	Mut Assessor	FATHMM	RadialSVM	LR				
Pathogenic variants																
964	ACTG1	NM_001614	c.353A>T	p.K118M	0/538	D(1)	B(0.40)	D(1)	A(1)	H(0.789)	D(0.54)	D(0.733)	D (0.932)	moderate	high	Zhu et al., 2003 [30]
858	COCH	NM_004086	c.1115T>C	p.I372T	0/538	D(1)	D(0.996)	D(1)	D(1)	M(0.727)	D(0.456)	D(0.621)	D (0.746)	moderate	high	Tsukada et al., 2015[28]
962	COCH	NM_004086	c.1115T>C	p.I372T	0/538	D(1)	D(0.996)	D(1)	D(1)	M(0.727)	D(0.456)	D(0.621)	D (0.746)	severe	high	Tsukada et al., 2015[28]
883	COL11A2	NM_080681	c.3937_3948del12	p.T312_1315del4	0/538	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	mild	flat	Iwasa et al., 2015[32]
14	MYO7A	NM_000260	c.652G>A	p.D218N	0/538	D (0.99)	D(1)	D(1)	D(1)	M(0.736)	T(0.421)	D(0.558)	D0.61	moderate	mid-high	Sun et al., 2011 [29]
555	WFS1	NM_006005	c.2507A>C	p.K836T	0/538	T (0.38)	D(0.999)	D(1)	D(1)	L(0.566)	D(0.52)	DD(0.568)	D0.778	mild	low	Fujikawa et al., 2010[27]
Probable pathogenic variants																
1051	CCDC50	NM_178335	c.820C>T	p.R274X	0/538	NA	NA	N (0.753)	A(1)	NA	NA	NA	NA	moderate	flat	This study
1043	DIAPH1	NM_005219	c.3637C>T	p.R1213X	0/538	T(0)	NA	D(1)	D(1)	NA	NA	NA	NA	severe	high	This study
610	DIAPH1	NM_005219	c.663G>C	p.L221F	0/538	D(1)	D(1)	D(1)	D(1)	M(0.679)	D(0.512)	D0.618	D (0.827)	moderate	mid-high	This study
963	EYA4	NM_004100	c.1790delT	p.V597fs	0/538	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	moderate	flat	This study
954	GRHL2	NM_024915	c.937dupC	p.E312fs	0/538	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	moderate	flat	This study
946	KCNQ4	NM_004700	c.754G>C	p.A252P	0/538	D(1)	D(1)	D(1)	D(1)	M(0.75)	D(0.563)	D(0.523)	D (0.532)	moderate	mid-high	This study
995	KCNQ4	NM_004700	c.463G>A	p.G155R	0/538	D(1)	D(1)	D(1)	D(1)	L(0.60)	D(0.48)	T(0.30)	T(0.23)	moderate	high	This study
87	MYH14	NM_001077	c.823C>T	p.R275C	0/538	D (0.99)	D(1)	NA	D(1)	H(0.79)	T(0.423)	D(0.543)	D (0.595)	mild	mid	This study
1020	MYO6	NM_004999	c.897+2T>C	—	0/538	NA	NA	NA	D(1)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	This study
1021	MYO6	NM_004999	c.1455T>A	p.N485K	0/538	D(1)	D(1)	N(1)	D(1)	H(0.877)	D(0.488)	D(0.587)	D (0.832)	moderate	flat	This study
433	MYO6	NM_004999	c.2287-2A>G	—	0/538	NA	NA	NA	D(1)	NA	NA	NA	NA	mild	mid	This study
694	MYO7A	NM_000260	c.479C>G	p.S160C	0/538	D(1)	D(1)	D(1)	D(1)	H(0.881)	D(0.545)	D(0.713)	D(0.97)	NA	NA	This study
673	MYO7A	NM_000260	c.1978G>A	p.G660R	0/538	D(1)	D(1)	D(1)	D(1)	H(0.882)	D(0.587)	D(0.696)	D (0.986)	mild	low	This study
1080	TECTA	NM_005422	c.4302C>A	p.Y1434X	0/538	T(0)	NA	D(1)	A(1)	NA	NA	NA	NA	moderate	low-mid	This study
963	WFS1	NM_006005	c.1147C>T	p.R383C	0/538	D (0.97)	B(0.039)	D(1)	D(1)	L(0.612)	D(0.492)	D(0.481)	D (0.588)	moderate	flat	This study
Uncertain pathogenic variants																
406	COL11A2	NM_080681	c.106C>T	p.R36W	0/538	D(1)	D(1)	N (0.999)	N(1)	L(0.619)	T(0.235)	T(0.264)	T) 0.007)	moderate	mid-high	This study
981	DIABLO	NM_004403	c.92C>T	p.T311	0/538	T (0.78)	D(1)	D(1)	D(1)	L(0.632)	T(0.436)	D(0.475)	D (0.585)	mild	flat	This study
962	GRHL2	NM_024915	c.1547G>A	p.R516Q	1/538	T (0.34)	B(0.037)	D(1)	D(1)	L(0.596)	T(0.293)	T(0.241)	T0.027)	severe	high	This study
970	GRHL2	NM_024915	c.1334A>G	p.Q445R	1/538	T (0.88)	B(0)	N(0.85)	N(0.711)	N(0.541)	T(0.294)	T(0.233)	T (0.022)	moderate	high	This study
97	MYH14	NM_001077	c.1990G>A	p.G664S	0/538	T (0.55)	P(0.796)	NA	D(0.976)	N(0.366)	T(0.421)	T(0.373)	T (0.228)	moderate	low-mid	This study
500	MYH14	NM_001077	c.1049G>A	p.R350Q	1/538	T (0.42)	B(0.136)	NA	D(0.793)	N(0.539)	D(0.479)	T(0.385)	T (0.388)	NA	NA	This study
962	MYH14	NM_001077	c.5324G>A	p.R1783H	0/538	D(1)	B(0.43)	NA	D(0.755)	M(0.708)	D(0.466)	D(0.534)	D (0.572)	severe	high	This study

表1 次世代シーケンス解析により見出された変異 (抜粋)

(2) 遺伝子型と表現型の相関の検討

上記の次世代シーケンス解析により変異を同定することのできた家系を対象に、罹患者の聴力像などの詳細な臨床情報を収集し、遺伝子毎に取りまとめて臨床的特徴を明らかにすることができた。

また、民族を問わず比較的頻度が多い原因遺伝子として *KCNQ4* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*WFS1* 遺伝子に関しては、米国アイオワ大学との共同研究により、米国の難聴患者と日本人難聴患者の聴力像の比較検討を行なった。その結果、多少差異は認めるものの概ね類似した聴力像を呈することを明らかにすることができた (図1)。

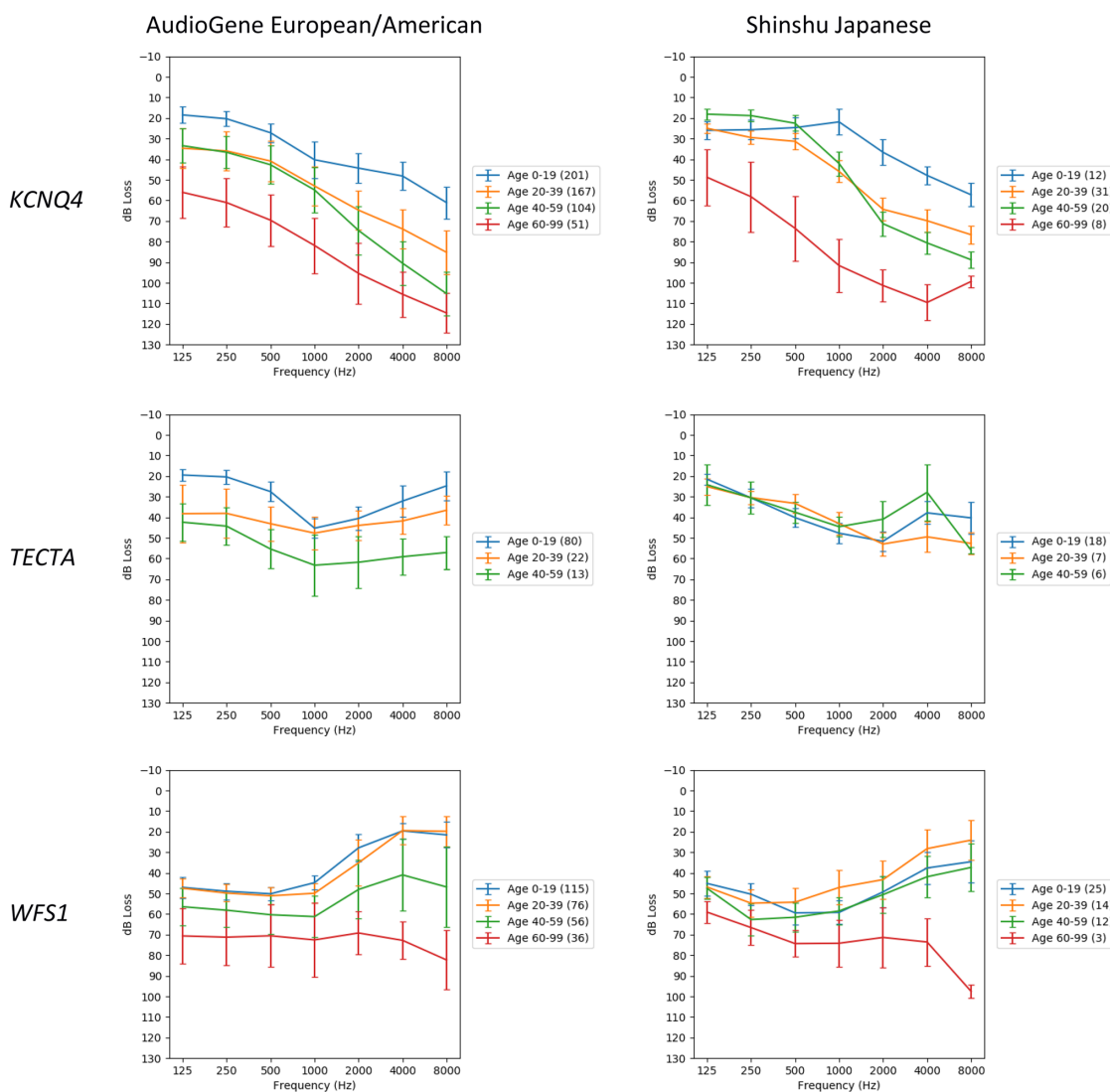


図1 優性遺伝形式をとる難聴の主要な原因遺伝子の聴力像の比較

優性遺伝形式をとる難聴の原因遺伝子としては様々な原因遺伝子が少しずつの割合で関与しており、劣性のように多くを占める原因遺伝子はあまり認められない。その中でも、民族を問わず比較的頻度が多い原因遺伝子として *KCNQ4* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*WFS1* 遺伝子がある。本研究では米国アイオワ大学との共同研究で米国人および日本人難聴患者の聴力像の比較を行なった。その結果、多少の差異は認めるものの概ね類似した聴力像を呈することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Walls WD, Moteki H, Thomas TR, Nishio SY, Yoshimura H, Iwasa Y, et al	4. 巻 NA
2. 論文標題 A comparative analysis of genetic hearing loss phenotypes in European/American and Japanese populations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hum Genet	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00439-020-02174-y.	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 -

1. 著者名 Iwasa YI, Nishio SY, Sugaya A, Kataoka Y, Kanda Y, Taniguchi M, Nagai K, Naito Y, Ikezono T, Horie R, Sakurai Y, Matsuoka R, Takeda H, Abe S, Kihara C, Ishino T, Morita SY, Iwasaki S, Takahashi M, Ito T, Arai Y, Usami SI.	4. 巻 14
2. 論文標題 OTOF mutation analysis with massively parallel DNA sequencing in 2,265 Japanese sensorineural hearing loss patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0215932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1371/journal.pone.0215932.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩佐陽一郎、北尻真一郎、西尾信哉、吉村豪兼、宇佐美真一
2. 発表標題 OTOF遺伝子p.R1172Q変異による難聴発症機序の解析
3. 学会等名 第63回日本聴覚医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡晋一郎、岩佐陽一郎、西尾信哉、茂木英明、宇佐美真一
2. 発表標題 COL11A2遺伝子変異によるStickler症候群3型の2症例
3. 学会等名 第63回 日本聴覚医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩佐陽一郎、西尾信哉、宇佐美真一
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたAuditory neuropathy spectrum disorderに対する遺伝子解析
3. 学会等名 第27回 日本耳科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwasa Y, Usami S
2. 発表標題 OTOF mutation analysis with massively parallel DNA sequencing in 2135 Japanese sensorineural hearing loss patients
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 2018
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