

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19560

研究課題名（和文）ヒト側頭骨病理標本アーカイブを用いた遺伝性難聴の病態解明に関する研究

研究課題名（英文）Genetic analysis of archived human temporal bone specimens

研究代表者

宇佐美 真一（Usami, Shin-ichi）

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：10184996

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、カリフォルニア大学ロサンゼルス校耳鼻咽喉科の石山明教授との共同研究により、同大学の管理する世界最大の側頭骨病理標本アーカイブを活用し、ヒト側頭骨病理標本よりDNAを抽出し、次世代シーケンサー（NGS）を用いた解析を行い、原因遺伝子変異を明らかにすることで、遺伝性難聴の病理・病態を明らかにすることを目的として研究を行った。DNA抽出手法の検討により、安定的にDNA抽出を行うことが可能なプロトコルを開発するとともに、品質評価を行った。得られたDNAサンプルは160塩基程度に断片化していたが、PCRを行うことが可能であり、次世代シーケンス解析を実施することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト内耳は骨に囲まれた組織であり、また、生検することで不可逆の難聴を引き起こすため、事実上生検が不可能である。そのため、実際のヒト内耳における病理・病態に関する研究は遅れており、難聴患者の病理・病態に関してはほとんど明らかとなっていないのが現状であった。本研究により側頭骨病理標本アーカイブに集積されているヒト側頭骨病理標本よりDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた解析を可能にするプロトコルを開発することができたため、今後、各原因遺伝子の病態の解明や新規の治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we plan to extract DNA from archived human temporal bone specimens and perform next generation sequencing analysis. As a results, we developed relatively stable DNA extraction method by using organic solvent and DNA extraction it. The extracted DNA were highly fragmented and average length were 160 bp. However, it is possible to perform PCR and next-generation sequencing analysis. As a result of next-generation sequencing analysis, we identified several candidate variants including the CDH23 gene, MYH9 gene, EYA4 gene etc.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 遺伝子 次世代シーケンサー 標本

1. 研究開始当初の背景

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疾患である。当研究室では、従来より、難聴の遺伝子解析に取り組んでおり、数多くの原因遺伝子バリエーションを発見・報告してきた。また、研究の成果の臨床応用として 2012 年からは「遺伝学的検査 (先天性難聴)」として保険収載され、さらに 2015 年からは次世代シーケンシング法が保険診療に導入されるなど、遺伝医療の社会実装における国内のモデルケースとなっている。難聴患者の遺伝子解析を行い、原因遺伝子バリエーションを明らかにすることは、聴力の予測、予後 (難聴の進行) の予測、適切な治療法の選択など原因診断として臨床上有用であるだけでなく、聴覚維持および難聴発症のメカニズムを理解する上でも非常に重要な基盤情報となっている。

しかしながら、ヒト内耳は骨に囲まれた組織であり、また、生検することで不可逆の難聴を引き起こすため、事実上生検が不可能である。そのため、実際のヒト内耳における病理・病態に関する研究は遅れており、難聴患者の病理・病態に関してはほとんど明らかとなっていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究は、カリフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) 耳鼻咽喉科の石山明教授との共同研究により、同大学の管理する世界最大の側頭骨病理標本アーカイブを活用し、ヒト側頭骨病理標本より DNA を抽出し、次世代シーケンサー (NGS) を用いた解析を行い、原因遺伝子変異を明らかにすることで、遺伝性難聴の病理・病態を明らかにすることを目的としている。

UCLA 側頭骨病理標本アーカイブは、側頭骨病理標本に加えて各症例の詳細な臨床データも蓄積されており、臨床データとリンクした形で病態解明を進めることが可能である。また、信州大学には 12,000 例を超える症例の遺伝子解析データと臨床データが集積されているため、アーカイブされている標本を DNA からの視点で見直し、臨床像と比較することで、遺伝性難聴の病理・病態解明に大きなインパクトを与える世界初の研究になると考えている。

また、側頭骨病理標本では伝統的に、ホルマリン固定後にセロイジン包埋を行い、標本を作成するが、本研究によりセロイジン包埋標本から DNA を抽出し NGS 解析を行う技術が確立すれば、国内外に保存されている内耳や脳などのアーカイブ標本を活用した研究へと展開可能であり、学術領域全体に大きなインパクトを及ぼすことができると考えている。

3. 研究の方法

本研究では、UCLA の管理する世界最大の側頭骨病理標本アーカイブサンプルを用いて DNA 抽出法の開発を行うとともに、次世代シーケンシング解析を実施した。具体的には以下の手順にて研究を実施した

- (1) フォルマリン固定セロイジン包埋ヒト側頭骨病理標本 (スライドガラス) を信州大学に送付し、信州大学で受領した後に組織部分をスライドガラスから剥離した。
- (2) 剥離した包埋組織をプラスチックチューブに移し、エタノール/ジエチルエーテル混和物で 1 週間程度セロイジンの融解を行う。その後エタノールで数回洗浄した後に、QIAGEN 社の DNeasy Tissue and Blood Kit を用いて DNA の抽出を行った
- (3) フォルマリン固定によりシトシン塩基の脱アミノ化により生じるウラシル塩基への変換が生じるため、DNA 抽出時にウラシル DNA グリコシラーゼ処理を行い、ウラシル塩基を除去し、加熱処理により無塩基となった DNA 鎖の切断を行った。
- (4) 得られた DNA の量を ThermoFisher Scientific 社の Qubit Fluorometer で定量するとともに、断片化の状況の評価するため、Agilent 社の Bioanalyser2100 の High Sensitivity Kit を用いて得られた DNA の長さを評価した。また、リアルタイム PCR 装置を用いて 250 塩基の PCR による断片化の評価を行った。
- (5) 得られた DNA を用いて ThermoFisher Scientific 社の Ion AmpliSeq Library Kit および AmpliSeq Custom Library を用いて、既知難聴原因遺伝子 63 遺伝子の全エクソン領域を超マルチプレックス PCR 法にて増幅した。
- (6) Ion AmpliSeq にて増幅した次世代シーケンサーのライブラリの定量を行い、Ion S5 システムを用いて次世代シーケンシング解析を行った。
- (7) 見出されたバリエーションに関して ANNOVAR を用いてアノテーション付けを行った。アノテーションを付与したバリエーションに関しては、アミノ酸配列に影響を及ぼし得るバリエーション (ミス

センス、ナンセンス、欠失、挿入、スプライシング)を残し、さらに正常人コントロール gnomAD におけるマイナーアレル頻度が 0.01 以下のバリエーションのみを選択した。

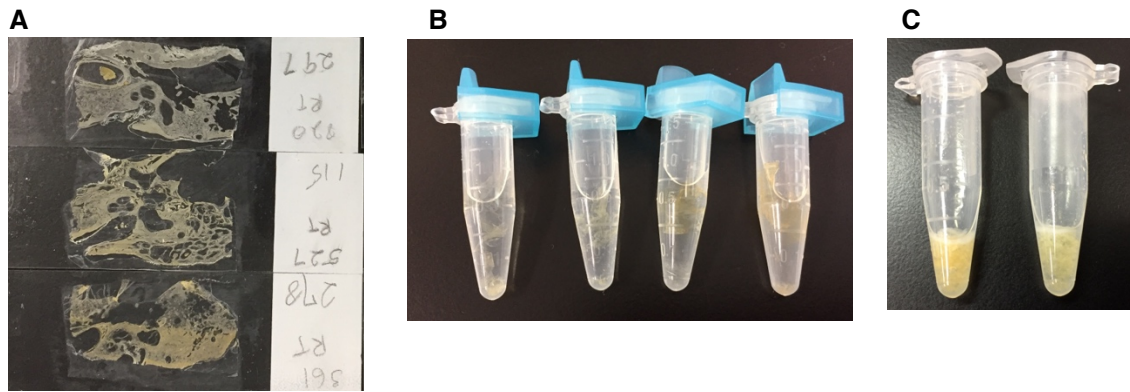


図1 セロイジン包埋されたヒト側頭骨病理標本からの DNA 抽出の様子

A: フォルマリン固定セロイジン包埋されたヒト側頭骨病理標本

B: エタノール/ジエチルエーテルでの溶解

C: 溶解後の組織

4. 研究成果

方法に記載した方法で、得られた DNA の量を ThermoFisher Scientific 社の Qubit Fluorometer で定量を行ったところ、約半数のサンプルで得られた DNA の収量が NGS 解析のために不足していた。図 1 に示すように、QIAGEN のキットで溶解後のサンプルを見ると、溶解できない組織が多く認められることから、エタノール/ジエチルエーテル混和物での処理時間を 1 週間から 1 ヶ月に延長して再度 DNA 抽出を試みたところ、90%以上のサンプルで次世代シーケンス解析を行うために必要な 20ng を超える DNA を抽出することが可能であった。

次に、断片化の状況进行评估するため、Agilent 社の Bioanalyser2100 の High Sensitivity Kit を用いて得られた DNA の長さを評価した。また、リアルタイム PCR 装置を用いて 250 塩基の PCR による断片化の評価を行った。Agilent 社 BioAnalyzer での分析結果、平均で 164bp と断片化が進んでいるものの、400bp を超える DNA も一定程度含まれており、PCR による増幅が可能と判断した。

一方、リアルタイム PCR 装置を用いて 250bp の PCR 産物の増幅効率について分析を行った結果、新鮮凍結組織から抽出した DNA と比較し、セロイジン包埋されたヒト側頭骨病理標本から抽出した DNA では、等量の鋳型 DNA を用いているにもかかわらず、8~10 サイクル程度増幅が遅いことが明らかとなった。また新鮮凍結組織由来 DNA と比較し、サンプルごとのばらつきが大きかった。したがって、得られた DNA の中にはクロスリンク等が生じているために PCR の鋳型として利用できない DNA が多く、256 分の 1 程度が鋳型として利用可能であることが示唆された。

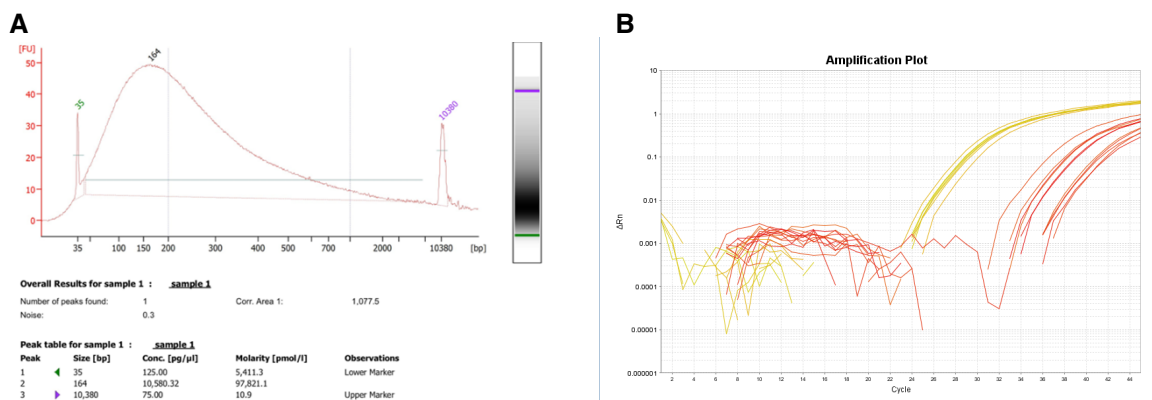


図2 セロイジン包埋されたヒト側頭骨病理標本から抽出した DNA の品質

A: Agilent 社 BioAnalyzer での分析結果、平均で 164bp と断片化が進んでいるものの、400bp を超える DNA も一定程度含まれており、PCR による増幅が可能と判断した。

B: リアルタイム PCR 装置を用いた分析結果、新鮮凍結組織から抽出した DNA (黄色) と比較し、セロイジン包埋されたヒト側頭骨病理標本から抽出した DNA (赤色) では、等量の鋳型 DNA を用

いているにもかかわらず、8 サイクル程度増幅が遅いことが明らかとなった。また新鮮凍結組織由来 DNA と比較し、サンプルごとのばらつきが大きかった。

得られた DNA を用いて ThermoFisher Scientific 社の Ion AmpliSeq Library Kit および AmpliSeq Custom Library を用いて、既知難聴原因遺伝子 63 遺伝子の全エクソン領域を超マルチプレックス PCR 法にて増幅し、Ion S5 システムを用いて次世代シーケンス解析を行った。その結果、複数のサンプルから、*CDH23* 遺伝子、*MYH9* 遺伝子などを含む複数の候補となるバリエントを同定することに成功した。現在、見出されたバリエントの確認および論文投稿の準備をおこなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宇佐美真一
2. 発表標題 日本人難聴患者10047名の遺伝的背景
3. 学会等名 第67回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Usami SI, Nishio SY
2. 発表標題 Could the Genetic Origin of Sensorineural Hearing Loss Affect the Outcome of Cochlear Implantation?
3. 学会等名 3rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INNER EAR THERAPEUTICS (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇佐美真一
2. 発表標題 難聴診断の遺伝子パネル検査
3. 学会等名 第44回 日本臨床薬理学会
4. 発表年 2023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	西尾 信哉 (Nishio Shin-ya) (70467166)	信州大学・医学部・特任講師 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------