

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：13802  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22791589  
 研究課題名（和文） 毛根 cDNA を用いたアッシャー症候群・難聴の簡易精密遺伝子診断法の確立  
 研究課題名（英文） Establishment of a simple but accurate method for genetic diagnosis of Usher syndrome and other hearing disorders by using cDNA synthesized from hair roots  
 研究代表者  
 中西 啓（NAKANISHI HIROSHI）  
 浜松医科大学・医学部附属病院・その他  
 研究者番号：20444359

研究成果の概要（和文）：RT-PCR 法を用いて毛根中にアッシャー症候群（USH）原因遺伝子の mRNA が発現していることを発見し、本疾患の遺伝子診断に毛根 cDNA が利用可能であることを明らかにした。本方法を利用して、本邦 USH タイプ 1、2 患者の遺伝子解析を行い、5 人中 4 人（タイプ 1）、9 人中 7 人（タイプ 2）において疾患原因変異を同定した。本邦患者では新規遺伝子変異が多く同定され、欧米人とは全く異なる変異により発症していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We used hair roots as a source of mRNA of Usher syndrome (USH)-causing genes, and successfully detected expression of mRNA of 7 genes by using RT-PCR analysis. This result indicates that cDNA synthesized from hair roots is a possible tool for the mutation analysis of USH-causing genes. We performed mutation analysis by using the method, and revealed probable pathogenic mutations in 4 of 5 USH type 1 and in 7 of 9 USH type 2 patients. The result that most of the mutations identified are novel suggests that the mutation spectrum of Japanese patients is different from that of Caucasian patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：遺伝子、網膜色素変性症、感音難聴、アッシャー症候群、毛根

1. 研究開始当初の背景

五感の中で視覚と聴覚は最重要であり、そのうち一方に障害があっても極めて重大であるが、両方の障害を合わせ持つ人は、他人とのコミュニケーションや外界からの情報手段が二重に制限され、計り知れないほど多大なハンディキャップを負うことになる。

現在までに、約 40 種類の視覚障害に聴覚障害を合併する疾患が知られている。その中で、最も高頻度で全患者数の約半数を占める疾患がアッシャー症候群 (Usher syndrome: USH) である。USH は、人口 10 万人に対して約 3～6 人の頻度で認められ、感音難聴に網膜色素変性症を合併する常染色体劣性遺伝性疾

患である。

USH は難聴の程度と前庭機能障害の有無により、タイプ 1~3 の 3 つのタイプに分類され(表 1)、さらに原因遺伝子がマッピングまたはクローニングされたものはサブタイプとして分類されている。現在までに 1B~1H、2A、2C、2D、3A、3B の 12 のサブタイプが知られており、そのうち 9 種については原因遺伝子が同定されている(表 2)。

USH に関しては、以下のような臨床医学上の問題点・留意点がある。

(1) 難聴が発症してから数~十数年後に網膜色素変性症が発症するため、発症初期の難聴のみの段階では非症候群性難聴と臨床的に区別することは困難である。

(2) タイプにより重篤度が異なり、難聴に対する治療や対処法を適切に選択する必要がある(表 1)。

(3) USH 原因遺伝子に変異を認める症例の中には、難聴のみで網膜色素変性症を合併しないもの、逆に網膜色素変性症のみで難聴を合併しないものなども存在するが、これは原因遺伝子の種類によって、さらには同一原因遺伝子の中でも変異の種類によって異なる。

これらを解決するには、早期に遺伝子診断を実施することが極めて有効である。欧米では、それぞれの原因遺伝子に対する大規模な遺伝子解析が行われ、この結果をもとにマイクロアレイを用いた USH の遺伝子診断が検討されている。

タイプ	難聴	前庭機能障害	言語獲得
1	重症難聴	合併する	人工内耳挿入術が必要
2	中等症~高度難聴	合併しない	補聴器装着にて可聴
3	進行性難聴	様々	治療なしで可能

サブタイプ	遺伝子座	遺伝子	産物蛋白質
1B	11q13.5	MYO7A	myosin VIIa
1C	11q15.1	USH1C	Usher syndrome 1C
1E	10q26.0	USH1B	USH1B-related 1B
1F	8p11.1	?	?
1G	16q11.1	PRKCDL	protein kinase-related 1B
1H	17q25.1	USH1G	Usher syndrome 1G
2A	10q25-q26	?	?
2A	1q41	USH2A	Usher syndrome 2A
2C	5q11.6	GPR98	G-protein-coupled receptor 98
2D	9q32	DFNB31	deafness, autosomal recessive 31
3A	3q28.1	SLRN1	clarin 1
3B	20q	?	?

本邦では USH の認知度が専門医の間でさえもかなり低く、体系的な研究が行われていない。我々は、本邦で初めてタイプ 2 患者 10 人を対象に USH2A 遺伝子解析を行い、以下の点を明らかにした(Nakanishi et al. Clin Genet 76: 381-392, 2009)。

(1) 8 人の患者において 14 種の疾患原因変異を同定し、そのうち 11 種は新規であったことより、本邦では欧米人とは全く異なる変異により USH を発症している可能性が高い。

(2) 1 種の変異(c. 8559-2A>G)は 4 人の患者において同定され、本邦患者における高頻度変異と思われた。

(3) 14 種の変異はエキソン 3~64 にかけて広範囲に分布しており、明らかな変異ホットスポットは認められなかった。

これらのことより、日本人における USH 遺伝子診断システムを構築するためには、本邦患者において USH 遺伝子解析を行い高頻度変異を探索するとともに、広範囲に分布する変異を効率的に同定する方法の開発が必要であると思われた。

## 2. 研究の目的

USH の原因遺伝子は、エキソン数が多く翻訳領域が長いこと cDNA を用いて遺伝子解析を行う方が効率的であるが(表 3)、末梢リンパ球には DFNB31 以外の mRNA は発現していないため、一般的にゲノム DNA を用いた PCR ダイレクトシーケンス法にて遺伝子解析が行われている。我々は、多くの USH 原因遺伝子の mRNA が毛根中に発現しているという知見を得た。このことは、国内外で未だに報告がなく世界初の知見であると思われる。

以上の点を踏まえ、本研究では、以下の 1、2 を目的として行う。

(1) USH 遺伝子診断システムを構築するため、毛根 cDNA を用いた USH 遺伝子解析法を確立する。

(2) できるだけ多数症例の USH 患者の遺伝子解析を行い、日本人での原因遺伝子の種類と高頻度変異の探索を行う。

サブタイプ	遺伝子	エキソン数	cDNA長(bp)
1B	MYO7A	68	5,846
1D	USH1D	87	3,795
1E	USH1B	69	4,897
1F	?	?	?
1G	USH1G	65	2,824
1H	USH1H	6	1,205
1I	?	?	?
2A	USH2A	72	13,609
2C	GPR98	93	13,621
2D	DFNB31	16	1,575
2E	USH2E	2	529
3B	?	?	?

## 3. 研究の方法

### (1) 検体採取

本邦で USH の研究があまり行われていない理由として、患者が 1 つの施設には単発的に

しか受診しないため十分な検体が得られないことが考えられる。そこで、下記の方法を用いて USH 患者に本研究への協力を依頼し精力的に検体採取を行う。

#### ①患者の会を通じて協力を依頼

網膜色素変性症に難聴を合併する患者会“アイヤ会”の会報や講演会を通じて、本研究を紹介するとともに協力を依頼する。

#### ②県内基幹病院の耳鼻科や眼科と連携して協力を依頼

網膜色素変性症患者の約 6 人に 1 人は難聴を合併し、USH であると報告されている。しかし、耳鼻科医が網膜色素変性症患者の聴力検査等を通じて、USH 患者を診察する機会は極めて少ない。その理由として、USH を十分認識して診療に当たっている医師が少ないこと、忙しい日常診療の中では眼科と耳鼻科の連携が容易でないことが考えられる。そこで、難聴の合併が疑われる網膜色素変性症患者を積極的に耳鼻科へ紹介するよう眼科医に依頼し、網膜色素変性症患者の中に潜む USH 患者の評価および診断を行う。

協力が得られた患者には、当院耳鼻咽喉科外来にて、遺伝子検査について十分な説明を行う。インフォームド・コンセントが得られた患者に対して、詳細な問診、耳鼻科・眼科的検査を行い、その結果より USH の確定診断およびタイプ分類をする。確定診断された患者より、検体として血液 20ml および毛根 30 本を採取する。

#### (2) 毛根 cDNA を用いた遺伝子解析法の確立

採取した毛根 30 本より全 RNA を抽出し、RT-PCR法を用いて USH 原因遺伝子が毛根中に発現しているか確認する。

毛根 cDNA を用いることにより効率的な遺伝子解析が可能になるが、Truncated type 変異(ナンセンス変異、欠失変異、挿入変異など)をもつ mRNA は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(nonsense-mediated mRNA decay: NMD)により分解されるため、本方法ではこれらの変異を同定できない可能性がある。そこで、すでに *USH2A* に遺伝子変異を同定した患者から毛根を採取し、本方法にて Truncated type 変異が同定できるか評価する。

#### (3) 遺伝子解析

毛根 cDNA または末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて、PCR ダイレクトシーケンス法にて遺伝子解析を行う。欧米で行われた遺伝子解析では、タイプ 1 患者においては *MYO7A*、*CDH23*、タイプ 2 患者においては *USH2A* に変異をもつ症例が多かったことが報告されている。そこで、タイプ 1 患者においては *MYO7A*、*CDH23*、タイプ 2 患者においては *USH2A* の遺

伝子解析を行い、遺伝子変異を同定できなかった患者では、その他の USH 原因遺伝子の解析を行う。

#### 4. 研究成果

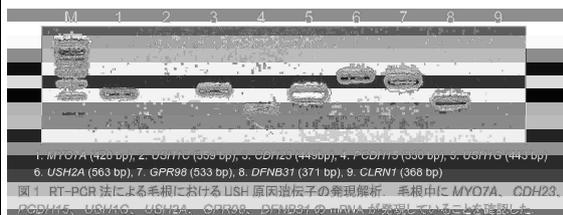
##### (1) 検体採取

タイプ 1 患者 5 人、タイプ 2 患者 12 人より検体を採取した。

##### (2) 毛根 cDNA を用いた遺伝子解析法の確立

RT-PCR 法を用いて、毛根中に *MYO7A*、*CDH23*、*PCDH15*、*USH1G*、*USH2A*、*GPR98*、*DFNB31* の mRNA が発現していることを確認した(図 1)。

さらに、*USH2A* にナンセンス変異を同定した患者より毛根を採取し、毛根 cDNA を用いた遺伝子解析にてナンセンス変異が同定可能であることを確認した。NMD はリボソーム内で生じる反応であるため、核内には Truncated type 変異をもつ mRNA も分解されずに残っていたため同定することができたと考えられる。



##### (3) 遺伝子解析

##### ①タイプ 1 患者の遺伝子解析

臨床症状よりタイプ 1 と診断した 5 人の患者を対象として、*MYO7A*、*CDH23* の遺伝子解析を行い、4 人の患者において 5 種の疾患原因と考えられる変異を同定した(表 4)。5 種の変異の内訳は、欠失変異 1 種、ナンセンス変異 2 種、ミスセンス変異 2 種であり、全ての変異は日本人の正常コントロールにおいて 1 例にも認められなかった(表 5)。*MYO7A* の 1 種(p. Ala771Ser)、*CDH23* の 1 種(p. Tyr1942SerfsX23)は現在までに報告されていない新規の変異であった。p. Tyr1942SerfsX23 は、エキソン 44~46 を含む 5078 塩基が欠失する巨大欠失変異であった。

欧米におけるタイプ 1 患者の遺伝子解析では、約 70~80%の患者が *MYO7A* または *CDH23* に遺伝子変異を持つことが報告されている。本邦患者でも、5 人中 4 人(80%)において *MYO7A* または *CDH23* に遺伝子変異が同定されており、欧米人と同様にこの 2 種の遺伝子変異によって USH を発症する患者が多いと思われた。

*CDH23* においては、エキソンが欠失するよ

うな巨大欠失変異の報告はなく、我々が同定した p. Tyr1942SerfsX23 が初めてである。タイプ1患者を対象とした CDH23 遺伝子解析では、片側アレルのみに変異が同定されている症例が散見される。そのような症例では、我々が同定したような巨大欠失変異が見逃されている可能性がある。巨大欠失変異がヘテロ接合体で存在するときには、PCR ダイレクトシーケンス法では同定が困難であるので、定量PCR法等をおこない評価する必要があると思われた。

患者	遺伝子	変異	アレル1	アレル2
C617	CDH23	p.Tyr1942SerfsX23		p.Tyr1942SerfsX23
C720	CDH23	p.Arg2107X		p.Arg2107X
C611	USH2A	p.Arg790X		p.Arg1036Gln
C105	USH2A	p.Ala776Ser		非同義

患者	遺伝子	変異	アレル1	アレル2	報告の名称
C617	USH2A	p.Arg790X			エキソン48
C611	USH2A	p.Arg790X			エキソン48
C105	USH2A	p.Ala776Ser			エキソン48
C617	USH2A	p.Arg790X			エキソン48
C611	USH2A	p.Arg790X			エキソン48
C105	USH2A	p.Ala776Ser			エキソン48
C617	USH2A	p.Arg790X			エキソン48
C611	USH2A	p.Arg790X			エキソン48
C105	USH2A	p.Ala776Ser			エキソン48

## ②タイプ2患者の遺伝子解析

臨床症状よりタイプ2と診断した9人の患者を対象として、USH2Aの遺伝子解析を行い、7人の患者において9種の疾患原因と考えられる変異を同定した(表6)。9種の変異の内訳は、ナンセンス変異5種、フレームシフト変異2種、スプライス変異1種、ミスセンス変異1種であり、全ての変異は日本人の正常コントロールにおいて1例にも認められなかった(表7)。8種が新規であったことより、本邦患者における変異スペクトラムは欧米人とは全く異なっていると思われた。

一方、本研究では本邦患者における高頻度変異の可能性が示唆されている c. 8559-2A>G を同定することができなかった。そこで、本変異が創始者効果によるものか検討するため、USH2Aに変異を同定した15人の患者(以前の研究にて変異を同定した8人の患者を含む)においてハプロタイプ解析を行った。c. 8559-2G アレルでは、同塩基の前後635kbにわたってハプロタイプが同じであったが、c. 8559-2A アレルではそれぞれのアレルにおいてハプロタイプは全く異なっていた。

ハプロタイプ解析の結果より c. 8559-2A>G は創始者効果によるものと思われた。本変異を同定した4人の患者の出生地を検討したところ、全て西日本出身であり、本変異が西日本を中心に分布している可能性が示唆され

た。本研究に参加した患者は東日本出身者が多く、c. 8559-2A>G が同定されなかった原因と考えられた。

患者	アレル1	アレル2
C694	p.Cys4236X	p.Cys4236X
C694	p.Arg459X	p.Arg459X
C694	c.1040+1G>A	p.Tyr3576X
C694	p.Arg1777Ttp	p.Ile3555MetfsX2
C694	p.Arg1777Ttp	p.Ile3555MetfsX2
C694	c.2101G>A	非同義
C694	c.1927G>A	非同義

C694では家族の根拠を用いることができず変異と病態の対応解析を行うことができなかった。

患者	変異	アレル1	アレル2	報告の名称
C694	p.Cys4236X			エキソン48
C694	p.Arg459X			エキソン48
C694	c.1040+1G>A			エキソン48
C694	p.Tyr3576X			エキソン48
C694	p.Arg1777Ttp			エキソン48
C694	p.Ile3555MetfsX2			エキソン48
C694	c.2101G>A			エキソン48
C694	c.1927G>A			エキソン48

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計18件)

①Hosono K, Ishigami C, Takahashi M, Park DH, Hirami Y, Nakanishi H, Ueno S, Yokoi T, Hikoya A, Fujita T, Zhao Y, Nishina S, Shin JP, Kim IT, Yamamoto S, Azuma N, Terasaki H, Sato M, Kondo M, Minoshima S, Hotta Y. Two novel mutations in the EYS gene are possible major causes of autosomal recessive retinitis pigmentosa in the Japanese population. PLoS One, 査読有, 7: e31036, 2012.

②中西啓, 水田邦博, 大和谷崇, 峯田周幸: 内耳開窓術にて良好な術後聴力を得た先天性卵円窓欠損例. Otol Jpn, 査読有, 採択済.

③Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Usami S, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Novel USH2A mutations in Japanese Usher syndrome type 2 patients: marked differences in the mutation spectrum between the Japanese and other populations. J Hum Genet, 査読有, 56: 484-490, 2011.

④Nakanishi H, Mizuta K, Hamada N, Iwasaki S, Mineta H. Hereditary isolated ossicular anomalies in two generations of patients. Auris Nasus Larynx, 査読有, 38: 114-118, 2011.

- ⑤中西啓, 水田邦博, 大和谷崇, 高橋吾郎, 峯田周幸: MRSA 悪性外耳道炎症例. 耳喉頭頸, 査読有, 83, 669-674, 2011.
- ⑥中西啓, 水田邦博, 大和谷崇, 橋本泰幸, 姜洪仁, 浜田登, 渡邊高広, 峯田周幸: 手術的加療を施行した悪性外耳道炎の2例. 耳鼻臨床, 査読有, 104: 491-498, 2011.
- ⑦中西啓, 水田邦博, 大和谷崇, 峯田周幸: 当院における耳管開放症例の検討. Otol Jpn, 査読有, 21: 136-142, 2011.
- ⑧中西啓, 水田邦博, 峯田周幸: 中耳手術と耳管開放症. JHONS, 査読無, 27: 807-811, 2011.
- ⑨堀田喜裕, 中西啓: 網膜色素変性症と Usher 症候群の遺伝子診断. J Eye, 査読無, 28: 907-912, 2011.
- ⑩大和谷崇, 水田邦博, 中西啓, 姜洪仁, 橋本泰幸, 星野知之, 峯田周幸: 当科における小児先天性中耳真珠腫手術例の臨床的検討. Otol Jpn, 査読有, 21: 212-216, 2011.
- ⑪Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Takizawa Y, Hosono K, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Mutation analysis of the *MYO7A* and *CDH23* genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. J Hum Genet, 査読有, 55: 796-800, 2010.
- ⑫Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Hair roots as an mRNA source for mutation analysis of Usher syndrome-causing genes. J Hum Genet, 査読有, 55: 701-703, 2010.
- ⑬ Takizawa Y, Mizuta K, Hayakawa T, Nakanishi H, Okamura J, Mineta H, Setou M. Specific localization of five phosphatidylcholine species in the cochlea by mass microscopy. Audiol Neurootol, 査読有, 16: 315-322, 2010.
- ⑭ Hosokawa S, Mizuta K, Nakanishi H, Hashimoto Y, Arai M, Mineta H, Shindo S, Ikezono T. Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct. Audiol Neurootol, 査読有, 15: 247-253, 2010.
- ⑮水田邦博, 中西啓: 耳管開放症の治療経験. 耳鼻臨床, 査読無, 103, 702-703, 2010.
- ⑯岩崎聡, 工藤, 茂木英明, 中西啓, 峯田周幸, 宇佐美真一: 埋め込み型骨導補聴器 BAHA の長期経過によるトラブルの検討. Otol Jpn, 査読有, 20: 721-726, 2010.
- ⑰岩崎聡, 中西啓, 姜洪仁, 水田邦博: BAHA 両耳装用の1症例 有効性の評価. 耳喉頭頸, 査読有, 82: 475-478, 2010.
- ⑱岩崎聡, 中西啓: 手術を要する補聴器 (人工中耳・BAHA) と人工内耳と補聴器の併用.

ENTONI, 査読無, 115: 44-50, 2010.

[学会発表] (計5件)

- ①中西啓, 大和谷崇, 瀧澤義徳, 泉智沙子, 岩崎聡, 宇佐美真一, 水田邦博, 峯田周幸: 本邦アッシャー症候群タイプ2患者における変異スペクトラムの検討. 第21回日本耳科学会総会・学術講演会: 2011.11.24 沖縄コンベンションセンター
- ②中西啓, 大坪正史, 岩崎聡, 堀田喜裕, 宇佐美真一, 水田邦博, 峯田周幸, 蓑島伸生: 本邦アッシャー症候群タイプ2患者における変異スペクトラムの検討. 第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会: 2011.11.12 幕張メッセ
- ③Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, Hotta Y, Takizawa Y, Hosono K, Mizuta K, Mineta H, Minoshima S. Mutation analysis of the *MYO7A* and *CDH23* genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. Thirty-fourth annual mid-winter research meeting of the association for research of otolaryngology: Feb 19 - 23, 2011, Baltimore, ME, USA.
- ④中西啓, 大坪正史, 岩崎聡, 堀田喜裕, 水田邦博, 峯田周幸, 蓑島伸生: 本邦におけるアッシャー症候群患者の遺伝子変異解析: 本邦におけるアッシャー症候群の遺伝子解析. 第2回浜松医科学シンポジウム: 2010.12.17 浜松医科大学
- ⑤中西啓, 水田邦博, 大和谷崇, 姜洪仁, 橋本泰幸. 当院における耳管開放症例の検討. 第20回日本耳科学会総会・学術講演会: 2010.10.08 ひめぎんホール

[図書] (計1件)

- ①岩崎聡, 中西啓: 遅発性内リンパ水腫. 小川郁 (編) よくわかる聴覚障害 難聴と耳鳴のすべて, 永井書店, pp174-181, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中西 啓 (NAKANISHI HIROSHI)  
 浜松医科大学・医学部附属病院・その他  
 研究者番号: 20444359