

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：18001
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791914
 研究課題名（和文）沖縄県における前庭水管拡大症の遺伝学的特異性と臨床応用に関する研究
 研究課題名（英文）Research of genetic distribution and clinical application in patients with enlarged vestibular aqueduct and Pendred syndrome in Okinawa islands.
 研究代表者
 我那覇 章 (GANAHA AKIRA)
 琉球大学・医学研究科・助教
 研究者番号：00347155

研究成果の概要（和文）：

沖縄県出身の前庭水管拡大に伴う難聴例において SLC26A4 遺伝子の解析を施行した結果、IVS15+5G>A が最も頻度の高い変異である事を確認した。この結果、前庭水管拡大に伴う難聴例における遺伝子変異の頻度において、沖縄県は日本本土や東アジア諸国と異なることが示唆された。また、IVS15+5G>A が疾患と関連する遺伝子変異であるかを確認するため、コントロールとして沖縄県出身の健常者 100 人において IVS15+5G>A 遺伝子変異の有無について解析を行った結果、健常者には認めない変異であった。また、遺伝子発現解析の結果、IVS15+5G>A を認める症例では、遺伝子発現の低下を認めた。以上の結果より、IVS15+5G>A 変異は沖縄県の遺伝学的特異性を反映した、前庭水管拡大に伴う難聴の原因となる遺伝子変異であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the frequencies of SLC26A4 mutations of patients with EVA or PS living in the Okinawa Islands. The substitution of IVS15+5G>A in SLC26A4 was the most common mutation in uniquely found in patients with PS and EVA in Okinawa Islands. This suggested that the spectrum of SLC26A4 mutation differed from main islands of Japan and other East Asian countries. We surveyed the substitution IVS15+5G>A in 100 healthy objects as control. Based on qRT-PCR results, expression of SLC26A4 was not identified in patients with the homozygous substitution of IVS15+5G>A. Our result suggested that IVS15+5G>A is a pathogenic substitution and the cause of the frequent substitution might be the existence of a common ancestor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：耳科学

1. 研究開始当初の背景

前庭水管拡大症は先天性難聴を生じる内耳奇形の一つで、内耳奇形の中で最も頻度が高く (Smith et al, 1998)、遺伝形式は常染色体劣性遺伝形式である。原因遺伝子として SLC26A4 が同定されており (Everett et al, 1997, Usami et al, 1999)、人種間で SLC26A4 の変異部に差異を認める (Tsukamoto et al. 2003) ことが報告されている。

研究代表者は沖縄県における前庭水管拡大症に伴う難聴症例において症例の多くが宮古島から発症しており、遺伝子解析により14家系のうち、7家系(50%)において IVS15+5G>A を認める事を確認していた。

以上より、沖縄県の前庭水管拡大に伴う難聴症例では IVS15+5G>A の関与が多いことがわかる。沖縄県は島嶼環境にあり本土と異なる遺伝学的特異性からこのような差が生じると考えられる。IVS15+5G>A がイントロン領域に存在することから、スプライシング過程に関連した異常が前庭水管拡大を生じる原因になると推察されるが、これまで本遺伝子変異に関する遺伝子発現解析の報告はなく、前庭水管拡大症の原因の遺伝子変異であるとの証明はされていない。また平成24年4月より保険収載された「遺伝学的検査(先天性難聴)」では IVS15+5G>A を検出することができないため、沖縄県の前庭水管拡大にともなう難聴患者では効率的に遺伝子診断できないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 沖縄県の前庭水管拡大にともなう難聴症例において SLC26A4 領域の遺伝子解析と発現解析を行い難聴の原因遺伝子変異と発現異常を明らかにする。

(2) 沖縄県の前庭水管拡大にともなう難聴症例で SLC26A4 領域の遺伝子異常を持つ症例の

疾患発症率、保因者頻度を調査し、本疾患における沖縄県の遺伝子変異の特異性を明らかにする。

上記(1)、(2)の結果に基づき、沖縄県の遺伝学的特異性を考慮した前庭水管拡大症における難聴遺伝子診断法を確立する。

3. 研究の方法

対象

(1) 臨床的に前庭水管拡大を認め、その診断が確立している患者

(2) 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)

(3) 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し、保因者頻度を決定する)

方法

(1) 遺伝子解析 (SLC26A4 変異の確認)

対象者の全血より DNA を抽出。PCR/ダイレクトシーケンス解析を行い SLC26A4 遺伝子の全エクソン領域の塩基配列を決定し、Gene Bank と照合し変異部位を検出する。

(2) 遺伝子発現解析

SLC26A4 領域の塩基配列決定により変異が検出され、それが遺伝子多型ではなく、疾患との因果関係が証明されていない場合には検出された変異が前庭水管拡大に伴う難聴の原因になるかを確認するために以下の手順による遺伝子発現解析を行う。

① 全血から mRNA の精製。

② RT による cDNA の作成。

③ 定量的 RT-PCR (リアルタイム PCR) を用いて発現量比の算定。

(3) コントロール群の解析

コントロールとして沖縄県出身の健常者 100 人より検体採取を行い、制限酵素 SspI (New England Biolabs) を用いて、IVS15+5G>A の遺伝子変異の有無を確認し

IVS15+5G>A が病的な遺伝子変異かどうかの確認と、保因者頻度決定を行う。

4. 研究成果

(1) 沖縄県出身者の前庭水管拡大に伴う難聴例 21 家系 22 症例の遺伝子解析により 22 例中 21 症例において遺伝子変異を認めた。9 症例において IVS15+5G>A/ H723R の複合ヘテロ接合変異、6 症例において IVS15+5G>A のホモ接合変異、5 症例において H723R のホモ接合変異を認めた。1 症例において SLC26A4 領域に遺伝子変異を認めなかった。

(2) nested-real time PCR を用いた遺伝子発現解析により IVS15+5G>A ホモ接合変異例においては健聴者と比較し SLC26A4 遺伝子発現を認めなかった。これまで、IVS15+5G>A に関する遺伝子発現解析の報告は無く証明されていなかった。本結果により IVS15+5G>A は遺伝子発現に異常をきたすことが証明された。

(3) 沖縄県出身者の健常者 100 人において IVS15+5G>A 遺伝子変異を認めなかった。

以上より IVS15+5G>A は前庭水管拡大に伴う難聴の原因となる point mutation であると考えられた。沖縄県の前庭水管拡大に伴う難聴症例の 68%において IVS15+5G>A 遺伝子変異を認め、これまでに SLC26A4 遺伝子変異の頻度について報告した本邦の報告や他のアジア諸国とも頻度が異なり、沖縄県の遺伝学的特異性を反映した変異と考えられた。

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 1 件)

(1) 著者：Akira Ganaha, Tadashi Kaname, Kumiko Yanagi, Kenji Naritomi, Tetsuya Tono, Shin-ichi Usami, Mikio Suzuki
タイトル：Pathogenic substitution of IVS15

+ 5G > A in SLC26A4 in patients of Okinawa Islands with enlarged vestibular aqueduct syndrome or Pendred syndrome

雑誌：BMC Medical Genetics 2013, 14: 56

(<http://www.biomedcentral.com/1471-2350/>

14/56) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

(1) 発表者：我那覇 章

発表演題：沖縄県における前庭水管拡大症およびペンドレド症候群の遺伝子解析

学会：第 22 回日本耳科学会総会・学術講演
発表年月日：2012 年 10 月 5 日

会場：名古屋国際会議場

(2) 発表者：我那覇 章

発表演題：Distinct and pathogenic substitution of IVS15+5G>A in the SLC26A4 gene in patients with enlarged vestibular aqueduct syndrome and Pendred syndrome in Okinawa islands.

学会：European Human Genetics Conference

発表年月日：2012 年 6 月 25 日

会場：Nürnberg Convention Center Ost, Nürnberg, Germany

(3) 発表者：我那覇 章

発表演題：沖縄県における前庭水管拡大症およびペンドレド症候群の遺伝子解析

学会：第 56 回日本人類遺伝学会

発表年月日：2011 年 11 月 11 日

会場：千葉市美浜区 幕張メッセ国際会議

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我那覇 章 (GANAHA AKIRA)
琉球大学・医学研究科・助教
研究者番号：00347155

(2) 研究分担者 無
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 無
()

研究者番号：