

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390391

研究課題名(和文) Auditory Neuropathy の新規原因遺伝子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel genes causing auditory neuropathy

研究代表者

松永 達雄 (Matsunaga, Tatsuo)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・聴覚・平衡覚研究部・室長

研究者番号：90245580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：Auditory Neuropathy (AN)は著しく言語聴取力が低い新しい難聴の病態である。本研究ではANの新たな遺伝的原因の解明を目的とした。まず36例のAN症例でサンガー法による検討をして、25例でOTOF遺伝子に11種類の新規変異を同定し、1例でGJB2遺伝子に既知変異を同定した。OTOF遺伝子変異が1アレルの4例では全ゲノムSNP解析と定量的PCR解析で大欠失を同定しなかった。上記解析で変異を同定しなかった10例では、エクソーム解析で新規AN候補遺伝子を3種類(PNPLA3、RYR3、TACC2)同定し、1家系ではOPA1に新生突然変異の可能性が高い新規変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：Auditory Neuropathy (AN) is a new concept of hearing loss with the clinical feature of poor recognition of words. The purpose of this study is to reveal novel genetic causes of AN. By Sanger sequencing analysis in 36 patients with AN, we detected 11 novel OTOF mutations in 25 patients and 1 known GJB2 mutation in a patient. By whole genome SNP analysis followed by real time PCR analysis in 4 patients with monoallelic OTOF mutations, we did not detect large deletions in OTOF. With exome analysis in 10 patients who had not been found genetic causes by previous genetic analyses, we detected 3 candidates of novel AN genes (PNPLA3, RYR3, TACC2) and a novel OPA1 mutation which is likely to be a de novo mutation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子 医療・福祉 ゲノム 脳神経疾患 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

Auditory Neuropathy (AN)は、当センター名誉研究センター長の加我と米国の Starr が 1996 年に初めて報告した新しい難聴の病態であり、外有毛細胞機能が正常、聴性脳幹反応が異常、聴覚中枢には病変がないという検査所見で診断される。臨床的には他の感音難聴と比べて著しく言語聴取力が低いという特徴がある¹⁻²⁾。その後、本症は欧米において小児高度感音難聴の 10%前後と頻度が高いことが明らかとなった³⁾。我々は日本人の先天性 AN では OTOF 遺伝子変異の頻度が高いことを明らかにしてきたが約 30%は原因不明であった。生後あるいは成人後に発症する AN については大部分が未だ原因不明である。

これまで難聴の原因遺伝子解析は、(1) 臨床症状を基に頻度が高いと予測される既知の候補遺伝子の解析、(2) 家系内の多数の難聴者と健聴者から DNA の提供を受けられる場合は連鎖解析が可能であった。しかし、(1)の方法は頻度の高い遺伝子、あるいは臨床所見の特徴から原因の可能性が高いと予測される遺伝子(通常は数遺伝子)を調べて否定された場合には、100種類以上ある難聴遺伝子からそれ以上の候補を選ぶことができなかった。(2)の方法は家系内で少なくとも10人以上の DNA の提供を受ける必要があるため、解析に十分な DNA 検体数を得られず実施できない場合が多かった。近年、次世代シーケンサーの開発によりヒト全遺伝子を低価格、短時間で解析できるようになり、1家系の少数者だけの検討でも新規原因遺伝子が発見されている⁴⁻⁵⁾。

我々が行った日本人の先天性 AN 23 症例の検討では、(1) 非症候群性 AN では約 70%は OTOF 遺伝子変異が原因であり、(2) その遺伝子型は日本人特異的で創始者効果の影響が大きい、(3) OTOF 遺伝子の遺伝子型と表現型(難聴の特徴)には相関性がある、等が明らかになった。しかし、残る 30%の大多数の症例では他の AN 原因遺伝子として報告がある PJKV 遺伝子、GJB2 遺伝子の解析を追加しても遺伝的原因を特定できなかった。原因を同定できなかった症例には劣性遺伝、優性遺伝を示す家族性発症例もあり、未知の AN 原因遺伝子の存在が予測された。また、遅発性(5歳以後)発症の非症候群性 AN の 5 症例でも既知の候補遺伝子に異常を認めず、他に原因となる環境因子もないため、やはり未知の AN 原因遺伝子の存在が予測された。

2. 研究の目的

本研究では、OTOF 遺伝子、PJKV 遺伝子、GJB2 遺伝子以外に非症候群性 AN の原因となる遺伝子を解明する。標的は、(1) OTOF 遺伝子の欠失、(2) Otoferlin との複合体形成蛋白質の遺伝子、(3) 新しい AN 原因遺伝子(DIAPH3 遺伝子)、(4) 既知の非症候群性難聴遺伝子(多くの難聴遺伝子は AN の鑑別がされていない)、(5) 未知の AN 遺伝子、で

ある。段階的にそれぞれの標的に適した方法で次世代シーケンサー解析も含めて検討し、解明された遺伝子についてはその臨床的特徴と AN 全体における頻度も明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 既知の AN 原因遺伝子解析

36 例の AN 症例で既知の AN 遺伝子(OTOF 遺伝子、PJKV 遺伝子、GJB2 遺伝子)の解析をサンガー法で行い、これらの遺伝子が原因として確定した症例を除外した。変異の判定には、全エクソンとイントロンとの境界部の塩基配列を決定して、標準配列と比較した。変異の判定の条件としては、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライス供与配列あるいは受容配列の変化(IVS±2塩基)およびミスセンス変異の場合はアミノ酸配列の変化、生物種差を越えて保存されたアミノ酸の変化、公開データベースでのアレル頻度が極めて低いアミノ酸への変化、過去における論文報告、などを基準とし、より詳細は我々の論文に記した⁶⁾。

(2) 全ゲノム SNP 解析

AN と診断されて OTOF 遺伝子の全エクソンおよびエクソン・イントロン境界部のサンガー法による解析で変異が 1 アレルのみ認められた 4 症例を対象とした。末梢血 DNA を用いてマイクロアレイ(Illumina 社 HumanOmniExpressExome-8v1.2 DNA Analysis Kit)を用いて、全ゲノム SNP ジェノタイピングを実施した。ジェノタイピングの結果は、まずソフトウエア(Illumina 社、GenomeStudio / KaryoStudio)による自動処理で 150kb 以上かつ 7 マーカー以上の大欠失領域を検出し、さらに OTOF 遺伝子領域の全マーカーについて個別の検討を行なった。

(3) 定量的 PCR 解析

上記 4 症例において全ゲノム SNP 解析で大欠失の疑われた部位について、各 SNP を含む領域に特異的プライマーを作成し、定量的 PCR (Applied Biosystems 社 StepOnePlus リアルタイム PCR システム)で検討した。

(4) エクソーム解析

ヒト全遺伝子(約 25000 遺伝子)の解析をイルミナ社の HiSeq シーケンサーと SureSelect Target Enrichment システムを用いて実施した。対象は、AN と診断され、GJB2 遺伝子、OTOF 遺伝子、PJKV 遺伝子のサンガー法による解析で変異を認めなかった 10 家系の難聴者および両親の 16 例とした。対象の難聴者としては、難聴以外の症状がない非症候群性 AN は 8 例、症候群性 AN は 2 例であり、症候群性 AN は 2 例とも視神経障害を伴った。非症候群性 AN は 5 例が小児期発症、3 例が成人後発症であった。症候群性 AN は 2 例とも小児期発症であった。非

症候群性、小児期発症の AN では 4 例が孤発性、1 例が家族性であり、非症候群性、成人後発症の AN では 2 例が孤発性、1 例が家族性であった。症候群性 AN では 1 例が孤発性、1 例が家族性であった。難聴者本人と両親の解析（トリオ解析）は非症候群性、小児期発症、孤発性の 2 家系で実施され、難聴者本人と母の解析は症候群性 AN の 2 家系で実施され、難聴者本人のみの解析はそれ以外の 6 家系で実施された。

4. 研究成果

(1) 既知の AN 原因遺伝子解析

36 例の AN 症例で検討した。21 例で OTOF 遺伝子変異を 2 アレル同定、4 例で OTOF 遺伝子変異を 1 アレル同定、11 例で OTOF 遺伝子変異の同定なしであった。OTOF 遺伝子変異同定なし 11 例中 1 例では GJB2 遺伝子変異を 2 アレル同定した。OTOF 遺伝子と GJB2 遺伝子のどちらも変異を認めなかった症例の一部（10 例中 6 例）では PJKV 遺伝子を解析したが変異を認めなかった。同定された OTOF 遺伝子変異はスプライス変異 2 種類、ナンセンス変異 2 種類、ミスセンス変異 5 種類、フレームシフト変異 1 種類、読み過ぎし変異 1 種類であり、全て新規変異であった。これらの変異は過去に他の人種でも報告がないことから、日本人あるいはアジア人に特異的な変異であると考えられた。これらの成果の一部は論文で発表した⁶⁾。

(2) 全ゲノム SNP 解析

OTOF 遺伝子に大欠失が存在する可能性がある 4 症例（変異が 1 アレルのみ同定された症例）で大欠失の有無を検討した。解析にはログ R 比と B アレル頻度という 2 つの指標を用いて、各 SNP 別に検討した。OTOF 遺伝子の領域の解析結果を図 1 - 4 に示した。赤線はログ R 比を示し、2 コピーならば 0 近辺となる。青点は B アレル頻度値を示し、2 コピーならば 0 か 0.5 か 1 の近辺となる。1 アレルの欠失があればログ R 比が低下し、B アレル頻度値は 0 または 1 近辺となるはずである。2 コピーの検体のログ R 比の分布の検討から、ログ R 比が -0.225 以下の領域は欠失の可能性があると考えられた。そして、今回用いた HumanOmniExpressExome-8v1.2 では OTOF のゲノム領域の平均マーカー - 間隔が 823bp ほどなので 1kb 以上のほとんどすべての大欠失が検出可能である。全 47 エクソンの中の 35 エクソン上にマーカーがあり、残りの 12 エクソンも近傍のイントロンにマーカーがあるため、単一エクソンの欠失でも検出可能と考えられた。

まずソフトウェアによる自動処理で大欠失を探索したところ、大欠失の存在を認めなかった。次いで、ソフトウェアで検出できないやや小型の大欠失が存在する可能性がある領域を選択するために、OTOF 遺伝子領域の全マ - カ - についてログ R 比が -0.225 以下

の領域を目視で探索した。この結果、4 症例で計 16 領域（エクソン 3、5、15、16、17、18、20、21、23、25、26、29、32、39、40、44）にこのような大欠失が存在する可能性があることが判明した。

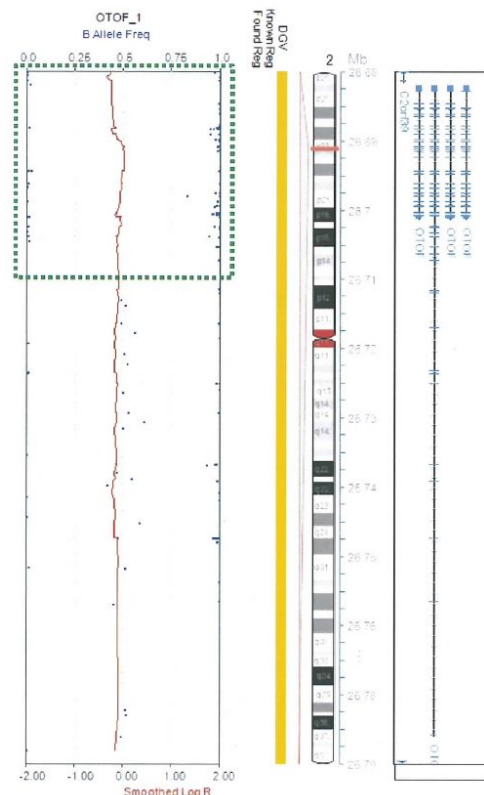


図 1

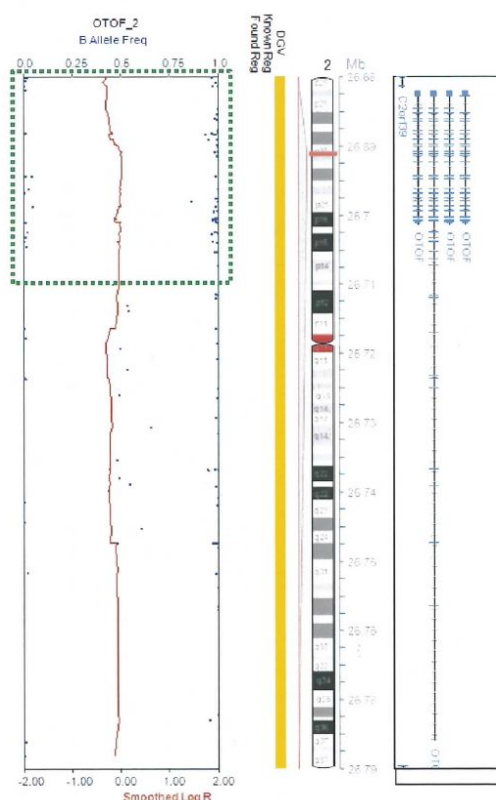


図 2

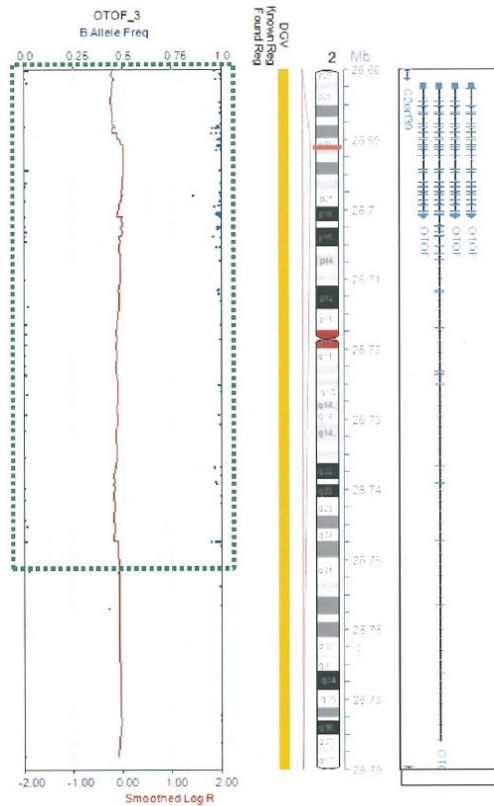


図 3

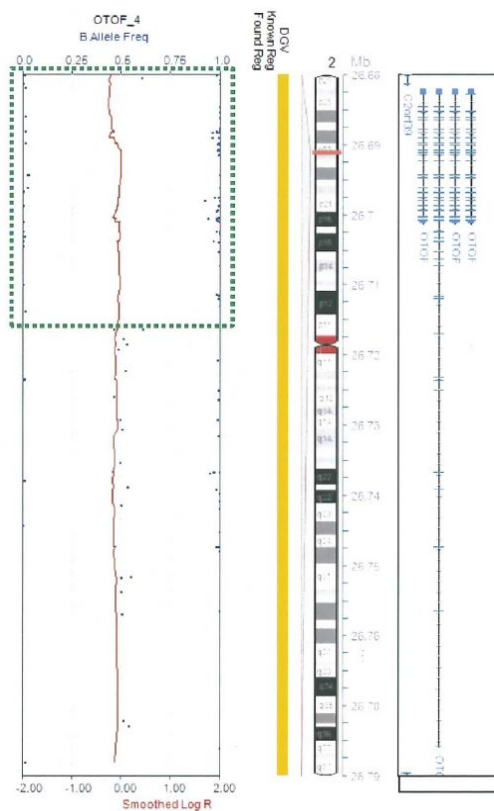


図 4

(3) 定量的 PCR 解析

全ゲノム SNP 解析で 4 症例に認められたやや小型の大欠失が存在する可能性がある 16 領域 (ログ R 比が -0.225 以下の領域) について、その領域の DNA 量を定量的 PCR で解析した。この結果、DNA 量が半減している領域 (ヘテロ欠失領域) すなわち大欠失を認めなかった。

(4) エクソーム解析

AN と診断され、GJB2 遺伝子、OTOF 遺伝子、PJKV 遺伝子のサンガー法による解析で変異を認めなかった 10 家系の難聴者およびその両親の 16 例で実施し、以下のような結果であった。

非症候群性、小児期発症、孤発性 AN でトリオ解析が実施された 2 家系および難聴者本人のみの解析が実施された 2 家系でのエクソーム解析では原因遺伝子の候補を絞ることができなかった。

非症候群性、小児期発症、家族性 (同胞にも難聴) AN の 1 家系でのエクソーム解析では、PNPLA3 遺伝子、RYS3 遺伝子が原因候補として絞られた。しかし、本遺伝子はこれまで難聴の原因としての報告がなく、遺伝性難聴の動物モデルの報告もないため、原因と確定するためには、同様の聴覚所見を呈する別の家系の難聴者で変異が見つかり、難聴遺伝子としての再現性が確認される必要があると考えられた。

非症候群性、成人後発症、孤発性 AN の 2 家系でのエクソーム解析では原因遺伝子の候補を絞ることができなかった。

非症候群性、成人後発症、家族性 AN の 1 家系でのエクソーム解析では、TACC2 遺伝子が原因候補として絞られた。しかし、本遺伝子もこれまで難聴の原因としての報告がなく、遺伝性難聴の動物モデルの報告もないため、原因と確定するためには、同様の聴覚所見を呈する別の家系の難聴者で変異が見つかり、難聴遺伝子としての再現性が確認される必要があると考えられた。

症候群性 (視神経障害の合併) 小児期発症、孤発性 AN の 1 家系でのエクソーム解析では、OPA1 遺伝子が原因遺伝子の候補として絞り込まれた。本遺伝子は視神経障害を合併する症候群性 AN の原因遺伝子として確立している。本家系の難聴者で認められた変異は新規ミスセンス変異であった。本変異は公開データベース (SNP、variant) に登録がなく、動物種を越えて高度に保存されたアミノ酸の変化を起こし、Polyphen2 など 4 種類の機能予測ソフトによる解析で Damaging (病的変異) の評価であった。本家系の両親には症状がないため、本患者における新生突然変異の可能性が高いと考えられ、実際に母の遺伝子解析では変異と認めずこの可能性を支持する結果であったが、父の遺伝子検査が行なえなかったため確定はできなかった。

症候群性 (視神経障害の合併) 小児期発

症、家族性 AN の 1 家系でのエクソーム解析では原因遺伝子の候補を絞ることができなかった。

(5) 本研究のインパクトと展望

本研究により日本人 AN の遺伝的原因が初めて解明された。欧米での報告同様に OTOF 遺伝子変異が主たる原因であることが判明し、視神経障害を伴う症候群性難聴の一部では OPA1 遺伝子が原因として判明した。さらに新規の原因遺伝子候補が 3 種類発見され、今後他の AN 症例での同定あるいは細胞、動物実験による再現性を得ることで原因として確立される。OTOF 遺伝子について通常のシーケンスで同定されないコピー数異常について検索し、原因として認めなかった。本研究で診療の困難な難聴である AN の原因解明が進んだことにより、本難聴の病態解明と新たな診断、治療の開発が今後促進されると考えられた。

<引用文献>

- 1) Kaga K, et al: Scand Audiol, 25: 233-238, 1996.
- 2) Starr A, et al: Brain, 119: 741-753, 1996.
- 3) Rance G, et al: Ear Hear, 20: 238-252, 1999
- 4) Glazov EA, et al: PLoS Genetics, 7:e1002027, 2011.
- 5) Shi Y, et al: PLoS Genetics, 7:e1002084, 2011.
- 6) Matsunaga T, et al: Clin Genet, 82: 425-432, 2012

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7件)

松永達雄、先天性難聴児の遺伝子変異の研究と診療における新しい動向、音声言語医学、査読有、印刷中

松永達雄、難聴の遺伝子診断・遺伝子治療、脳 21、査読無、Vol. 17、No. 3、2014、290 - 292

URL:<http://www.kinpodo-pub.co.jp/shosai/o0166-vol17-3.html>

松永達雄、鈴木直大、務台英樹、難波一徳、加我君孝、次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討、OtolJpn、査読有、Vol. 23、No. 5、2013、903 - 907

URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/otoljpn/23/5/23_903/_pdf

Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T, Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss

in Japanese patients: A cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study, Orphanet J. Rare Dis、査読有、2013、8 : 172

DOI: 10.1186/1750-1172-8-172.

Matsunaga T, Mutai H, Kunishima S, Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Kataoka Y, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K、A prevalent founder mutation and genotype-phenotype correlations of OTOF in Japanese patients with auditory neuropathy, Clin Genet、査読有、2012、82:425 - 32

DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01897.x.

仲野敦子、有本友季子、松永達雄、工藤典代、Otoferlin 遺伝子変異が確認された小児難聴症例の検討、Otolology Japan、査読有、2012、Vol. 22、No. 1、p. 47 - 52

URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/otoljpn/22/1/22_47/_article/-char/ja/

仲野敦子、有本友季子、松永達雄、工藤典代、側頭骨 CT で両側蝸牛神経管狭窄を認めた小児難聴症例の検討、日本耳鼻咽喉科学会会報、査読有、2012、Vol. 115、No. 9、p. 849-854

URL:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jibiinkoka/115/9/115_849/_pdf

[学会発表](計12件)

松永達雄、難聴遺伝子検査の正しい理解と活用、第129回難聴言語障害研究会、神奈川県総合医療会館(神奈川県横浜市)、2015年2月21日

北尾恭子、守本倫子、仲野敦子、有本友季子、杉内智子、増田佐和子、岡本康秀、森田訓子、加我君孝、松永達雄、遺伝子解析を行った Auditory Neuropathy における DPOAE の経過、第59回日本聴覚医学会総会・学術講演会、海峡メッセ下関(山口県下関市)、2014年11月27日 - 28日

高橋優宏、植草智子、中川辰夫、松永達雄、宇佐美真一、人工内耳埋め込み術中に EABR を施行した Auditory neuropathy spectrum disorder 症例、第23回日本耳科学会総会・学術講演会、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)、2013年11月24 - 26日
難波一徳、加我君孝、新谷朋子、藤井正人、松永達雄、Auditory Neuropathy 患者で新たに同定された2種類の変異型 OPA1 蛋白質の構造予測と分子病態、第23回日本耳科学会総会・学術講演会シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)、2013年11月24 - 26日
中村奈津子、藤波芳、野田徹、松永達雄、

加我君孝、林孝彰、角田和繁、Auditory neuropathy を伴う常染色体優性視神経萎縮症の1例、第61回日本臨床視覚電気生理学学会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)、2013年10月4-5日

Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Kudoh J, Kosaki K, Matsunaga T, Target-captured next generation sequencing of reported deafness genes reveals variability of genetic background of hereditary hearing loss in Japan, 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference, the Stanford School of Medicine in Stanford, California, USA, 2013年6月22-25日

松永達雄、渡部高久、南修司郎、守本倫子、阪本浩一、杉内智子、小川郁、加我君孝、次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子解析と原因診断への活用、第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、ロイトン札幌・ホテルさっぽろ芸文館(北海道札幌市)、2013年5月15-18日

鈴木直大、務台英樹、鳥居千春、清水厚志、宮冬樹、難波一徳、工藤純、小崎健次郎、松永達雄、カスタムターゲットリシーケンスによる難聴関連遺伝子の変異探索、第57回日本人類遺伝学会大会、京王プラザホテル(東京都新宿区)、2012年10月24-27日

松永達雄、鈴木直大、務台英樹、難波一徳、加我君孝、次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討、第22回日本耳科学会総会・学術講演会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2012年10月4-6日

新正由紀子、増田毅、松永達雄、加我君孝、山本聡、温度依存性 Auditory Nerve Disease の一症例、第22回日本耳科学会総会・学術講演会、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)、2012年10月4-6日

松永達雄、守本倫子、新正由紀子、有本由紀子、片岡裕子、岡本康秀、新田清一、新谷朋子、森田訓子、杉内智子、増田佐和子、仲野敦子、泰地秀信、加我君孝、小児 Auditory Neuropathy (AN) における OTOF 遺伝子の遺伝子型と表現型の相関、第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)、2012年5月10-12日

松永達雄、Auditory Neuropathy の遺伝子診断の治療法選択へのインパクト、第116回日本眼科学会総会、シンポジウム1(眼科・耳鼻咽喉科領域における研究プロジェクト)、東京国際フォーラム(東京都千代田区)、2012年4月5日

〔図書〕(計2件)

松永達雄(編集:加我君孝)、Auditory Neuropathy Spectrum Disorders、新生児・小児の難聴-遺伝子診断から人工内耳手術、療育・教育まで-、診断と治療社、2014年、26-29頁

松永達雄(編集:加我君孝)、難聴遺伝子変異、新生児・小児の難聴-遺伝子診断から人工内耳手術、療育・教育まで-、診断と治療社、2014年、19-25頁

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:内耳性難聴治療薬

発明者:細谷誠、藤岡正人、岡野栄之、小川郁、松永達雄

権利者:同上

種類:特許

番号:2015-007849

出願年月日:2015年1月19日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等

東京医療センター臨床研究センター 聴覚・平衡覚研究部 聴覚障害研究室 HP

http://www.kankakuki.go.jp/lab_c-1.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 達雄 (MATSUNAGA, Tatsuo)

東京医療センター臨床研究センター聴覚障害研究室 室長

研究者番号:90245580

(2)研究分担者

宮 冬樹 (MIYA, Fuyuki)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター リサーチアソシエイト

研究者番号:50415311

(3)研究分担者

務台 英樹 (MUTAI, Hideki)

東京医療センター臨床研究センター聴覚障害研究室 研究員

研究者番号:60415891

(4)研究分担者

工藤 純 (KUDOH, Jun)

慶應義塾大学医学部 遺伝子医学研究室 教授

研究者番号:80178003