

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：82643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659753

研究課題名(和文) 蝸牛および蝸牛神経の低形成に関する分子遺伝学的研究

研究課題名(英文) Study of responsible genes for cochlea and cochlear nerve dysplasia

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)・聴覚障害研究室・室長

研究者番号：90245580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛低形成および付随する蝸牛神経低形成は治療困難な奇形であるが、大部分は原因不明である。我々は、本症の遺伝的原因を同定することを目的として次世代シーケンサーを用いたエクソーム遺伝子解析を行い、2種の新規難聴原因候補を同定することに成功した。候補遺伝子Xは蝸牛神経で高発現し、突起伸長との機能関連が考えられた。もう一つの候補遺伝子Yと内耳発生との関連は動物実験で報告されているが、疾患原因候補として同定されたのは初である。本成果は蝸牛神経低形成発症の分子機序に対する理解を深め、より正確な難聴遺伝子診断法や遺伝子標的療法の開発へとつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cochlea dysplasia and the associated feature, cochlear nerve dysplasia have been difficult to provide clinical treatment, while the cause of the diseases is largely unknown. We conducted whole exome analysis of the families associated with these symptoms by Next Generation Sequencer and identified 2 novel candidate responsible genes. A candidate gene X appeared to be expressed in cochlear nerve, and was suggested to associate with neurite extension in our immunohistochemical and in vitro studies. The other candidate gene Y has already been shown to have significant role in inner ear development in mouse model, and was finally suggested to cause cochlea dysplasia in human in this study. Our results expanded our understanding of molecular pathology of cochlea and cochlear nerve dysplasia and will lead to development of better diagnosis and treatment.

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：遺伝性難聴 蝸牛低形成 蝸牛神経低形成 次世代シーケンサー エクソーム解析 新規疾患遺伝子

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1,000 人に 1 人の割合で発症し、原因遺伝子が 70 種類以上同定されているが、内耳奇形を伴う難聴の場合、前庭水管拡大症の原因となる SLC26A4 遺伝子以外はほとんどは原因不明である。とくに、蝸牛低形成およびそれに付随する蝸牛神経低形成は聴覚に重大な影響を与え、治療困難な奇形であるが、これまでその原因はほとんど明らかになっていなかった。

当研究室では、これまで難聴家系 1,600 家系以上の遺伝子解析を実施してきた。ここで実施された研究手法は、主にサンガー法による解析で臨床像から原因遺伝子を推測して、その遺伝子を逐一シーケンスする方法であった。原因不明の内耳奇形に対しては、大家系に対するゲノムワイド関連研究程度しか原因遺伝子を同定する手法がなく、核家族化の進んだ日本における大部分の症例（少人数の家系や孤発例）では原因遺伝子を同定するための、優れた実験手法が存在しなかった。

近年、次世代シーケンサーを用いたヒト全遺伝子（エクソーム）解析が可能となり、臨床像からの予測ができない難聴に対しても新規の原因遺伝子候補を発見できるようになった。

2. 研究の目的

本研究では、蝸牛および蝸牛神経の低形成を認めた難聴の 3 家系で次世代シーケンサーを用いたエクソーム遺伝子解析により、その遺伝的原因を同定することを目的とした。さらに、原因候補遺伝子については、その分子機能解析を行い、発症の分子機序についての考察を加えることとした。

3. 研究の方法

検討対象とした 3 家系においてそれぞれ健聴者の両親、患者の計 9 検体の血液由来ゲノム DNA を用いた。

家系 1 の孤発例患者は 2 歳女児。両耳とも先天性重度難聴で、内耳道狭小、蝸牛神経低形成、左眼球運動障害、めまい、運動発達遅滞を呈した。

家系 2 の孤発例患者は 1 歳女児。両耳とも進行性の重度難聴で、両蝸牛前庭低形成、および他の身体奇形を呈した。

Covaris 社製超音波破砕機による約 150bp への断片化、ベックマン社製 AMPure 磁性ビーズによる精製、Agilent Technologies 社製 SureSelect Human All Exon V4 キットを用いたライブラリー作成、インデックス付加と増幅を行い、Illumina 社製 HiSeq2000 シーケンサーにより全エクソンの配列データを創出し、理化学研究所ゲノム医科学センターのワークステーションを利用して変異解析をお

こなった。全エクソンと前後 100bp 領域の 90% 以上が、平均リード数 98.8、かつ高い信頼性で配列決定され、検体あたり 6 万 7 千~6 万 8 千個の変異が検出された。公開されている遺伝子多型データベース (dbSNP, 1000GENOME, ESP6500)、疾患に関する遺伝子変異データベース (HGMD)、日本人約 1,200 名の遺伝子多型データベース (HGVD)、日本人健聴者の in house データベースの参照により、変異の病的変異の可能性を検討し、さらに PolyPhen2, Shift などの予測プログラムによる種間保存性、タンパク質立体構造変化の可能性に対する予測情報を加え、さらに家系図と比較し遺伝形式に矛盾がないか確認した。絞り込まれた候補遺伝子変異は、サンガー法により確認を行った。同定された候補遺伝子について、免疫組織化学、細胞分子生物学の実験による検討を加えた。

(倫理面への配慮)

本遺伝子解析研究計画は、研究開始に先立ち当院および共同研究施設での倫理審査で承認をうけた。また本研究は、検体を提供下さった患者のご両親の同意のもと実施された。

4. 研究成果

3 家系中 2 家系より、それぞれ X 遺伝子と Y 遺伝子の *de novo* 突然変異を新規の難聴原因候補として同定することに成功した。

転写因子 X の *de novo* 突然変異は、蝸牛神経低形成と眼球運動障害を伴う難聴患者の家系 1 で同定された。本遺伝子がげっ歯類および霊長類蝸牛神経で高発現していることを RT-PCR および免疫組織化学的に確認した。また神経芽腫 NB-1 細胞の db-cAMP による神経突起伸長刺激により、X 遺伝子発現量が上昇することが示された。今回同定された突然変異は遺伝子産物の C 末端欠損を引き起こし、同産物の分子機能を消失させると予想されるが、遺伝子 X 発現を RNA 干渉法により抑制すると、神経突起伸長中の NB-1 細胞生存率が変化することを観察した。以上のことから、本遺伝子が神経細胞の分化・生存に重要な役割をもつことが推測された。解析対象患者が、内耳奇形だけでなく眼球運動障害も呈することから、本遺伝子および分子ネットワークパスウェイ解析が難聴だけでなく、より広い神経系の機能障害の分子機構解明へと発展する可能性が示された。

転写因子 Y の *de novo* 突然変異は、両蝸牛前庭低形成に身体奇形を伴う難聴患者の家系 2 において同定された。転写因子 Y は、実験動物モデルの研究により、正常な内耳発生に必要な遺伝子であることが、既に報告されている。また、劣性遺伝形式の症候群性難聴の原因遺伝子としての報告があった。しかし、今回の研究対象患者とは症状が大きく異なる

る。内耳低形成を伴う難聴の de novo 突然変異による原因候補として同定されたのは、本研究が初めてである。今回同定された突然変異は Y 遺伝子産物のホメオドメイン上に存在し、DNA 結合部位の立体構造予測により DNA 結合親和性、特異性に影響を与えることが推測された。

本研究の成果は、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析技術と関連するデータベース情報処理技術を駆使し、ほとんど原因不明であった内耳奇形を伴う難聴の原因候補遺伝子を、短期間で新たに 2 種類同定することに成功したことである。本研究が、内耳発生の分子機構に新たな知見を与え、内耳奇形発症の分子機序に対する理解を深め、より正確な難聴遺伝子診断法や本難聴に対する治療効果の向上、将来の遺伝子標的療法の開発へとつながることが期待される。

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 6 件)

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、Otol Jpn、査読有、23(5)、2013、903-907

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, 8(1), 2013, 172

Nakano A, Arimoto Y, Matsunaga T, Cochlear nerve deficiency and associated clinical features in patients with bilateral and unilateral hearing loss. Otol Neurotol., 査読有, 34(3), 2013, 554-558

Masuda S, Usui S, Matsunaga T, High prevalence of inner-ear and/or internal auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss., Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 査読有, 77, 2013, 228-232

Taiji H, Morimoto N, Matsunaga T, Unilateral cochlear nerve hypoplasia in children with mild to moderate

hearing loss., Acta Otolaryngol, 査読有, 132(11), 2012, 1160-7

仲野敦子、有本有季子、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、日耳鼻会報、査読有、115(9)、2012、849-854

[学会発表](計 2 件)

Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai H, Kudoh J, Kosaki R, Matsunaga T, Kosaki K, Rapid and efficient mutation detection in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG), 2012 年 11 月 6-10 日, San Francisco, California, USA

泰地秀信、守本倫子、松永達雄、蝸牛神経低形成例における聴覚所見、日本聴覚医学会第 7 回 ERA・OAE 研究会、2012 年 7 月 8 日、東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

松永達雄

聴覚障害における原因遺伝子の新たな解明、第 9 回感覚器シンポジウム、2014 年 3 月 14 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永達雄 (MATUNAGA TATSUO)

国立病院機構東京医療センター・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

清水 厚志 (SHIMIZU ATSUSHI)

岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号: 30327655

宮 冬樹 (MIYA FUYUKI)

独立行政法人理化学研究所・ゲノム医科学研究センター 情報解析研究チーム・研究

員

研究者番号：50415311

務台 英樹(MUTAI HIDEKI)

国立病院機構東京医療センター・臨床研究

センター・聴覚障害研究室・研究員

研究者番号：60415891

工藤 純(KUDOU JUN)

慶応義塾大学・医学研究科・教授

研究者番号：80178003

鈴木 直大(SUZUKI NAOHIRO)

国立病院機構東京医療センター・臨床研究

センター・研究員

研究者番号：90611195

