

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462649

研究課題名(和文)次世代シーケンサを用いた沖縄県難聴患者の網羅的遺伝子解析と臨床応用に関する研究

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of deafness genes in families in Okinawa islands

研究代表者

我那覇 章 (GANAHA, AKIRA)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00347155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県の先天性、進行性難聴の51家系に対して次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子解析を行った。解析対象遺伝子は98遺伝子とした。51家系中25家系において原因と考えられる遺伝子変異を確認した。そのうち14家系が新規変異であった。難聴の原因遺伝子の頻度はSLC26A4やCDH23の頻度が高かった。日本本土の先天性難聴の原因遺伝子として最も頻度の高いGJB2遺伝子変異による難聴は1家系のみであった。今回の結果は沖縄県において、本遺伝子解析が診断に有用である事を示している。GJB2遺伝子変異の解析結果は、沖縄における難聴の原因遺伝子分布が本土と異なる可能性を示唆していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, a targeted next generation resequencing panel including 98 known hearing loss genes was used to identify the genetic etiology in patients with congenital or progressive hearing loss. 51 unrelated families with syndromic or non-syndromic hearing loss were recruited. In 25 of 51 hearing loss families we identified pathogenic mutations. Among these mutations, 14 were novel mutations. Mutations in SLC26A4 and SLC26A4 were frequent and important causes of hearing loss in Okinawa islands. Mutation detection rate of our study is 49%, indicating the usefulness of our targeted sequencing panel in Okinawa islands. The mutation in GJB2 was identified in one family. GJB2 was not most common causative gene for hearing loss in Okinawa. The present data suggest a difference in the spectrum of causative genes for hearing loss among patients in Okinawa Islands compared with patients in the main lands Japan.

研究分野：聴覚

キーワード：遺伝性難聴 遺伝子解析 次世代シーケンサー 沖縄

1. 研究開始当初の背景

難聴の原因遺伝子は現在までに 100 以上の報告がある。これらの遺伝子変異が難聴という同一の表現型をとる異質性に富む疾患であるため、難聴（特に非症候群性難聴）の原因遺伝子を特定するためには多数の候補遺伝子を解析する必要がある。従来の直接シーケンス法を用いた遺伝子解析では複数の遺伝子を解析するには多大な時間と労力を要し臨床応用は困難であった。

より効率的な難聴の遺伝子診断として、インベーター法による「先天性難聴の遺伝子診断」が 2012 年 4 月に保険収載された。この検査により日本人における難聴の原因として頻度の高い既知の 13 遺伝子 46 変異を一度に解析することが可能となった。この検査法により先天性難聴の約 40%において遺伝学的な診断が可能とされている。しかし、この検査では既知の 13 遺伝子 46 変異以外の変異は診断できない。

沖縄のような島嶼環境下においては劣性遺伝形式の稀少疾患や本土と異なる遺伝子変異が集積しやすい。研究代表者は沖縄県における前庭水管拡大症を伴う難聴の 22 症例に対して直接シーケンス法による SLC26A4 遺伝子の解析を行った。その結果、沖縄県においては IVS15+5G>A を高頻度(22 症例中 15 症例)に認めた。この IVS15+5G>A は保険医療となった「先天性難聴の遺伝子診断」では診断できない変異である。日本本土やアジア諸国（韓国、中国、台湾）においては前庭水管拡大症およびペンドレッド症候群における SLC26A4 遺伝子変異は H723R と IVS7-2A>G が多いとされており、IVS15+5G>A を高頻度に認める研究代表者の結果は沖縄県が日本本土や他のアジア圏と異なる遺伝学的背景を有することを示唆している。

このように沖縄のような遺伝学的背景の異なる地域においてはそれを考慮した遺伝子診断法が必要である。

2. 研究の目的

本研究は沖縄県の難聴患者における遺伝学的特異性を明らかにし、それに基づいた次世代シーケンサを用いた難聴の遺伝子診断の臨床応用を目的とする。

3. 研究の方法

対象は 臨床的に難聴を認め、その診断が確立している患者、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）、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する）とし、以下の解析を行う。

(1) 次世代シーケンサによる塩基配列決定

難聴者（発端者）とその家族より検体（全血 10ml）を採取し gDNA、tRNA を抽出。

日本人の難聴原因遺伝子として報告のある 98 遺伝子のエクソン領域をターゲットとした Sure Select target DNA enrichment (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いてキャプチャーし次世代シーケンサを用いてシーケンスまたはアンプリコンシーケンスを行う。

(2) 塩基配列の解析

ヒトゲノムリファレンス配列と異なる塩基配列の抽出、アミノ酸配列に影響を与える変異を抽出する。多型の判定には、データベース NCBI dbSNP、1000Genome database、DEAFNESS VARIATION DATABASE を用いる。得られた変異についてサンガー法による直接シーケンス法により変異の確認を行う。

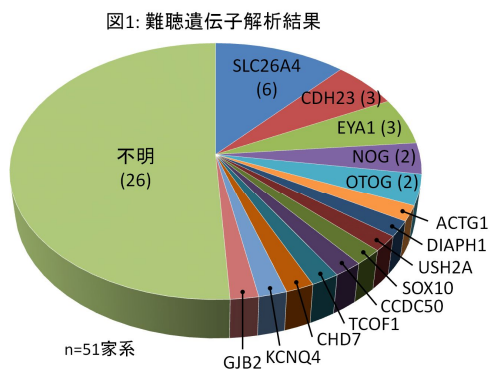
(3) 疾患の原因となる変異かどうかの解析

家系情報、健聴者コントロール、臨床情報より、変異が疾患の原因かを解析する。プライミング受容部位の変異などの場合は、必要に応じて発現解析を加える。

4. 研究成果

沖縄県出身の先天性、進行性難聴の 51 家系 154 例（症候群性難聴 20 家系 52 例、非症候群性難聴 31 家系 102 例）について遺伝子解析を行った。全 51 家系中 25 家系（症候群性

難聴 20 家系中 15 家系，非症候群性難聴 31 家系中，10 家系)において難聴の原因と考えられる variant を同定した(図1)。同定した variant のうち、症候群性難聴の 8 家系、非症候群性難聴の 6 家系は新規変異であった。



難聴の原因と考えられた遺伝子は頻度が高い順に *SLC26A4* (6 家系)、*CDH23* (3 家系)、*EYA1* (3 家系)、*OTOG* (2 家系)、*NOG* (2 家系)、他各 1 家系を認めた(図1)。日本本土の先天性難聴の原因遺伝子として最も頻度の高い *GJB2* 遺伝子変異は 1 家系のみであり、その他 149 例において *GJB2* 遺伝子変異の保因者を認めなかった。今回の結果は沖縄においても症候群性難聴に対して、本研究で使用した次世代シーケンサーパネルが遺伝子診断に有用である事を示している。難聴の原因遺伝子の頻度について *SLC26A4* や *CDH23* が難聴の原因として頻度が高い点は本土の同様の結果であった。その一方、非症候群性難聴における原因遺伝子変異の同定は 31 家系中 10 家系にとどまった事や、*GJB2* 遺伝子変異による難聴やその保因者の解析結果は、沖縄が本土と異なる遺伝学的背景を有し、非症候群性難聴における原因遺伝子の分布が本土と異なる可能性を示唆していると考えられた。

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. Ganaha A, Kaname T, Akazawa Y, Higa T,

Shinjou A, Naritomi K, Suzuki M.,

Identification of two novel mutations in the *NOG* gene associated with congenital stapes ankylosis and symphalangism. *J Hum Genet.* 2015 Jan;60(1):27-34. (査読有り)

[学会発表](計4件)

(1) Akira Ganaha, Identification of a novel mutation in the *CHD7* gene in a patient with CHARGE association, 30th Politzer Society Meeting, 平成 27 年 6 月 30 日~7 月 6 日、朱鷺メッセ(新潟市)

(2) 我那覇章, *CHD7* 遺伝子の新規変異を認めた AHARGE 症候群の一例、第 59 回日本人類遺伝学会、平成 26 年 11 月 19 日~11 月 21 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

(3) 我那覇章, 沖縄県における前庭水管拡大症に伴う難聴の遺伝子解析、第 28 回九州連合地方部会学術講演会、平成 25 年 6 月 22 日~6 月 23 日、[^] ストウエスタブ^レミアホテル長崎・長崎大学医学部良順会館(長崎市)

(4) Akira Ganaha, Identification of two novel mutations in the *NOG* gene in patients with Symphalangism syndrome, ESHG2013, 平成 25 年 6 月 6 日~6 月 13 日、Conference Venue(paris France)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

我那覇 章 (GANAHA AKIRA)
琉球大学・医学部・講師
研究者番号：00347155

(2) 研究分担者

要 匡 (KANAME TADASHI)
国立成育医療研究センター・ゲノム医療研
究部・部長
研究者番号：40264288

(3) 連携研究者

()

研究者番号：