

20020655

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

# 難聴遺伝子データベース構築と 遺伝カウンセリングに関する研究

平成14年度 総括研究報告書

平成15(2003)年4月

主任研究者 宇佐美 真 一

## 1. 統括研究報告

### 難聴遺伝子データベース構築と遺伝カウンセリングに関する研究

主任研究者 宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

分担研究者 福嶋義光（信州大学医学部附属病院遺伝子診療部）

研究協力者 工藤 穰、塚本 耕二、大塚 明弘、弓削 勇、浅村 賢二、小林 克彦、大島 章、鬼頭 良輔、鈴木 宏明、原田 大輔、福岡 久邦、我妻 道生、橋本 繁成（信州大学医学部耳鼻咽喉科）中村祐輔、阿部聡子（東京大学医科学研究所）、秋田二郎、南場淳司（弘前大学医学部耳鼻咽喉科）

#### [研究要旨]

ここ数年の分子遺伝学のめざましい発展により、すでいくつかの遺伝性難聴の原因遺伝子が特定され始めている。我々は従来から日本人難聴患者の遺伝子解析を行ってきたが、その結果日常診療で耳鼻咽喉科の外来を訪れる難聴患者にも遺伝子が深く関与していることが明らかになった。難聴の原因遺伝子は数十から 100 個以上あると推測されているが、現状では原因遺伝子の特定できる難聴患者はまだ 10-20%程度であると考えられ、今後新しいアプローチによるさらなる原因遺伝子の特定が必要である。現在欧米を中心に難聴の遺伝子解析が盛んに行われており毎年次々と新しい遺伝子が報告されているが、現在報告されている難聴の遺伝子のほとんどは諸外国の家系から発見されたものである。日本民族の遺伝的背景を考え合わせると日本人特有の難聴遺伝子が多数存在する可能性が考えられる。また同じ原因遺伝子であっても日本人難聴患者に見出される遺伝子変異は欧米での報

告とは異なることを報告してきた(Abe et al., 2000)。従って今後、難聴患者の診断、治療、カウンセリングを行なっていく上で日本人家系を用いた遺伝子解析のデータベースが必要となることから当該研究を企図した。日本人のデータベースの構築に関連して今後解決すべき課題として以下の課題が考えられる。

（1）日本人のデータベースの構築に関連して今後解決すべき課題：

- 1) 日本人難聴患者に見出される原因遺伝子の変異部位に関する検討
- 2) 新しい原因遺伝子の同定
- 3) 遺伝子型と臨床型（表現型）との比較検討
- 4) 簡便なスクリーニング検査の確立

平成 14 年度は難聴の原因遺伝子のうち現在頻度の高い GJB2 遺伝子および PDS 遺伝子変異に関して検討を行った。GJB2 遺伝子は難

聴の原因遺伝子として最も頻度が高いことが知られているが今回の検討で欧米人に高頻度で見出される 35delG は日本人には全く見出されず、日本人難聴患者には 235delC 変異が高頻度で見出されることが明らかとなった。日本人難聴患者 1227 名における GJB2 変異を検討するとともに日本人難聴患者に高頻度で見出される 235delC 変異に関して GJB2 の近傍の SNPs (single nucleotide polymorphisms) を用いた解析により founder effect の有無を検討した。その結果、日本人の変異部位は欧米人に見出された変異部位と大きく異っていることが明らかとなった。また、SNPs 解析により 235delC が高頻度で見出されるのは founder effect によるものであることが示唆された (Ohtsuka et al., 2003)。また Pendred 症候群、前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴の原因遺伝子として知られる PDS 遺伝子に関しても GJB2 変異と同様に変異部位は欧米人に見出された変異部位と大きく異っていることが明らかとなった (Tsukamoto et al., submitted)。

新しい原因遺伝子の同定に関しては東京大学医科学研究所との共同研究として mu-crystallin を新たな難聴原因遺伝子として報告することが出来た (Abe et al., 2003)。

また遺伝子型と臨床型 (表現型) との比較検討に関しては多施設との共同研究を通して常染色体優性遺伝形式をとる難聴遺伝子である KCNQ4 (De Leenheer et al., 2002)、TECTA (Iwasaki et al., 2002)、COCH

(Usami et al., in press) に関して明らかにすることが出来た。

一方、遺伝子診断が日常診療で一般化されるにつれ、それに伴う遺伝カウンセリングの充実が求められている。現状では遺伝子検査が先行してしまっているために臨床現場で種々の問題が生じ始めている。信州大学医学部附属病院では全国に先駆け「遺伝子診療部」が設けられ、各臨床科と連携して遺伝子診療に取り組んでいる。しかし現状では生命にかかわる重篤な疾患が中心で難聴に関する遺伝子診療は十分確立できているとは言えない。そこで本研究では難聴に関連した最新の遺伝子情報を適切に医療の場で生かすために以下の課題に取り組んでいる。

(2) 遺伝カウンセリングに関して今後解決すべき課題：

- 1) 難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成
- 2) 遺伝相談のシステム、ネットワーク整備
- 3) 啓蒙活動

平成 14 年度は遺伝子診断の確定した家系に対して遺伝カウンセリングを行うとともに、種々の希望で遺伝子診療部あるいは耳鼻科外来を訪れた外来患者に対して遺伝カウンセリングを行い難聴の遺伝カウンセリングの症例を重ね、各難聴原因遺伝子ごとのカウンセリングの重要点をリストアップすることが出来た (宇佐美、印刷中)。

## [研究目的]

### (1) 日本人のデータベースの構築

#### 1) 日本人難聴患者に見出される原因遺伝子の変異部位に関する検討

難聴患者は現在日本全国で約 50 万人以上いると言われその克服は感覚器分野の大きなテーマの一つになっている。難聴の多くは従来原因不明とされてきたが近年次々と難聴の原因遺伝子が報告されてきている。すでに遺伝子診断は技術的には可能になってきているが、現在急速な展開を見せている遺伝子解析の成果を十分に日常臨床に還元していくためにはいくつかの課題の解決が必要である。その一つに日本人の遺伝的背景がある。現在欧米を中心に難聴の遺伝子解析が盛んに行われており次々と新しい遺伝子が報告されているが、現在報告されている難聴の遺伝子のほとんどは諸外国の家系から発見されたものである。日本民族の遺伝的背景を考え合わせると日本人特有の難聴遺伝子が多数存在する可能性が考えられる。また我々は同じ原因遺伝子であっても日本人難聴患者に見出される遺伝子変異は欧米での報告とは異なることを報告してきた (Abe et al., 2000)。近い将来、遺伝子診断は難聴の「正確な診断」「治療」「カウンセリング」に必要不可欠なものとなっていくことが予測されるがそのためには日本人独自の難聴遺伝子のデータベースが必要である。平成 14 年度は現在までに集められた約 2000 名の難聴患者の DNA を中心に日本人難聴患者に見出される遺伝子変異をまとめ欧米人に見出される変異と比較検討した。

#### 2) 新しい原因遺伝子の同定

まだ原因遺伝子が特定できるのは 10-20%に過ぎず未発見の難聴遺伝子が多数存在する可能性が考えられる。内耳に特異的あるいは高発現している遺伝子は難聴の原因遺伝子である可能性が高いが、今回新しい原因遺伝子の同定を目的として東京大学医科学研究所との共同研究を行い内耳に特異的に発現する遺伝子に関して変異スクリーニングを行った。

#### 3) 遺伝子型と臨床型 (表現型) との比較検討

日常診療での診療プロセスを考えると臨床型 (表現型) からどのような原因遺伝子が考えられるか、あるいはその難聴がどのような経過を取るのかに関して明らかにするために多施設の共同研究を行い、種々の難聴の原因遺伝子について遺伝子型と臨床型 (表現型) を比較検討した。

### (2) 遺伝カウンセリング

遺伝子診断が日常診療で一般化されるにつれ、それに伴う遺伝カウンセリングの充実が求められている。そこで本研究では信州大学医学部附属病院遺伝子診療部と共同で難聴に関連した最新の遺伝子情報を適切に医療の場で生かす目的で今年度は 1) 難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成、2) 遺伝相談のシステム、ネットワーク整備、3) 啓蒙活動、などを行った。

## [研究方法]

## (1) 日本人のデータベースの構築

### 1) 日本人難聴患者に見出される原因遺伝子の変異部位に関する検討

今年度は頻度の高い遺伝子（GJB2 遺伝子、PDS 遺伝子）に関して外来を受診した感音難聴患者を対象に検討を行った。インフォームドコンセントの後に採血を行い DNA を抽出した。GJB2 遺伝子、PDS 遺伝子のエクソン部分を特異的なプライマーにより増幅し直接シーケンス法により遺伝子変異を検索した。また日本人に高頻度で見出される 235delC 変異に関しては GJB2 の近傍の SNPs (single nucleotide polymorphisms) を用いた解析により founder effect の有無を検討した。

### 2) 新しい原因遺伝子の同定

新しい原因遺伝子の同定を目的として東京大学医科学研究所との共同研究を行い内耳に特異的に発現する遺伝子に関して直接シーケンス法により遺伝子変異を検索した。

### 3) 遺伝子型と臨床型（表現型）との比較検討

KCNQ4、TECTA、COCH の各遺伝子に関し多施設の共同研究を行い、遺伝子型と臨床型（表現型）を比較検討した。

#### [倫理面への配慮]

(1) 遺伝子診断、検査に際しては同意書を作成し研究対象者のインフォームドコンセントを得ている。

(2) 当該研究課題に関しては学内（信州大

学医学部）の倫理委員会で承認されている。

#### [研究結果および考察]

### (1) 日本人のデータベースの構築

#### 1) 日本人難聴患者に見出される原因遺伝子の変異部位に関する検討

難聴の原因遺伝子のうち現在頻度の高い GJB2 遺伝子および PDS 遺伝子変異に関して検討を行った。難聴の原因遺伝子として最も頻度が高い GJB2 は現在 60 以上の変異が報告されている。頻度の高い GJB2 変異は民族により異なることが知られ、欧米人に高頻度で見出される 35delG は日本人には全く報告されていない。一方、日本人を始めとするアジア系民族には 235delC が高頻度で見出されることが報告されている。今回、日本人難聴患者 1227 名における GJB2 変異を検討した結果、日本人難聴患者の中に合計 13 種類の変異が見出された。内訳はストップ変異が 1 種類 (Y136X)、フレームシフト (deletion) 変異が 3 種類 (235delC、176-191del16、299-300delAT)、およびフレームシフト (insertion) 変異が 1 種類 (605 ins46)、およびミスセンス変異が 8 種類 (V37I、G45E、A49V、I71T、T86R、T123N、R143W、F191L) であった。このうち 235delC 変異がもっとも多く認められた。これら日本人に見出された変異部位を欧米人に見出された変異部位と比較したところ大きく異なっていることが明らかとなった。さらに日本人難聴患者に高頻度に見出される 235delC 変異に関して GJB2 の近傍の SNPs (single nucleotide polymorphisms) を用いた解析により founder

effect の有無を検討した。また、SNPs 解析により 235delC が高頻度で見出されるのは founder effect によるものであることが示唆された (Ohtsuka et al., 2003)。また Pendred 症候群、前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴の原因遺伝子として知られる PDS 遺伝子に関しても同様に検討したところ、日本人難聴患者の中に合計 18 種類の変異が見出された。内訳はストップ変異が 1 種類 (S610X)、フレームシフト変異が 4 種類 (322delC, 917delT, 1652insT, a small 2111 insertion of GCTGC)、およびスプライス変異が 3 種類 (IVS5-1G → A, IVS7-2A → G, IVS8+1G → A)、およびミスセンス変異が 10 種類 (P123S, M147V, K369E, A372V, N392Y, C565Y, S657N, S666F, T721M, H723R) であった。これら日本人に見出された PDS 遺伝子変異は GJB2 遺伝子変異と同様に欧米人に見出された変異部位と大きく異なっていることが明らかとなった (Tsukamoto et al., submitted)。またマイクロサテライトマーカーを用いた検討では日本人を始めとする東アジア系民族に多く見出される H723R 変異には共通先祖の存在が示唆された (Park et al., in press)。

現在欧米を中心に難聴の遺伝子解析が盛んに行われており次々と新しい遺伝子が報告されているが、現在報告されている難聴の遺伝子のほとんどは諸外国の家系から発見されたものであるが、日本民族の遺伝的背景を考え合わせると日本人特有の難聴遺伝子が多数存在する可能性が考えられる。また今回の検討で

同じ原因遺伝子であっても日本人難聴患者に見出される遺伝子変異は欧米での報告とは異なることが明らかになった。今回の検討でも日本人に見出された GJB2 変異 13 種類の変異のうち欧米人と共通しているものはわずかに 2 種類に過ぎなかった。また同様に PDS 遺伝子変異においても日本人難聴患者に報告のある 19 種類の変異のうち欧米人と共通しているものはわずかに 4 種類に過ぎなかった。最近の報告では各民族に異なる変異を持った共通先祖の存在が示唆されているが (Van Laer L et al., A common founder for the 35delG GJB2 gene mutation in connexin 26 hearing impairment., J Med Genet 38:515-8, 2001)、今回の我々の解析でも日本人に高頻度で見出される 235delC 変異や H723R 変異は founder effect である可能性が示唆された。このようなデータの蓄積は今後我が国で効率的に遺伝子検索や遺伝子診断を行っていく上で重要なデータベースになると思われた。

新しい原因遺伝子の同定に関しては東京大学医科学研究所との共同研究として mu-crystallin を新たな難聴原因遺伝子として報告することが出来た (Abe et al., 2003)。この遺伝子は内耳に特異的に発現する遺伝子として興味ある遺伝子である。

遺伝子型と臨床型 (表現型) との比較検討に関しては常染色体優性遺伝形式をとる難聴遺伝子である KCNQ4 (De Leenheer et al., 2002)、TECTA (Iwasaki et al., 2002)、

COCH (Usami et al., in press) に関して明らかにすることが出来た。KCNQ4 に関しては海外との共同研究の形をとりこれまでに世界で報告された 8 家系の表現型に関してまとめることが出来た (De Leenheer et al., 2002)。KCNQ4 による難聴は高音障害型を呈し進行するのが特徴である。また TECTA 遺伝子変異による難聴は皿形、あるいは高音障害型のオージオグラムを呈するのが特徴的で非進行性であった (Iwasaki et al, 2002)。

COCH 遺伝子による難聴は進行性でめまいを伴うのが特徴的である。現在、難聴原因遺伝子の中でめまいを伴う遺伝子としては PDS 遺伝子とこの COCH 遺伝子が知られており、特に COCH 遺伝子は臨床的にメニエール病様症状を呈するとの報告がありメニエール病との関連性に興味を持たれている。今回メニエール病と診断された患者 20 名のスクリーニングを同時に行ったが COCH 遺伝子変異は見出されなかった。したがって臨床的にはメニエール病典型例とは異なるカテゴリーに属する疾患であることが明らかになった。COCH 遺伝子変異は現在世界で数家系が報告されているがいずれも臨床的にはめまいを伴い両側進行性難聴を呈する優性遺伝形式の家系に見出されている (Usami et al., in press)。

## (2) 遺伝カウンセリング

遺伝子診断が日常診療で一般化されるにつれ、それに伴う遺伝カウンセリングの充実が求められている。現状では遺伝子検査が先行してしまっているために臨床現場で種々の問題が

生じ始めている。信州大学医学部附属病院では全国に先駆け「遺伝子診療部」が設けられ、各臨床科と連携して遺伝子診療に取り組んでいる。今年度は難聴に関連した最新の遺伝子情報を適切に医療の場で生かすために今年度は 1) 難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成、2) 遺伝相談のシステム、ネットワーク整備、3) 啓蒙活動、などを行った。平成 14 年度は遺伝子診断の確定した家系に対して遺伝カウンセリングを行うとともに、種々の希望で遺伝子診療部あるいは耳鼻科外来を訪れた外来患者に対して遺伝カウンセリングを行い難聴の遺伝カウンセリングの症例を重ねた。今年度は現在までの遺伝子解析および遺伝カウンセリングの実績をもとに各難聴遺伝子ごとにカウンセリングに必要な事項をまとめた (宇佐美：「遺伝カウンセリングマニュアル；各論 3.耳鼻咽喉科疾患」福嶋義光編)。

## [結論]

日本人難聴患者に見出される遺伝子変異は欧米での報告とは全く異なることが明らかになった。本研究に示されるように各々の民族は特有の遺伝的背景を持っている可能性が高く今後我が国で効率的に遺伝子検索や遺伝子診断を行っていく上で重要なデータになると思われる。また今後内耳に特異的あるいは高発現する遺伝子を中心にさらなる原因遺伝子の特定が必要である。また遺伝子の特定できた症例は各遺伝子ごとに世界で数症例であることが多く、今後積極的に多施設共同研究を行い臨床型との関連性を明らかにしていく必要

がある。また日本人の難聴遺伝子変異のデータベース構築と並行して効率的なスクリーニング法の開発が望まれる。一方、遺伝カウンセリングに関しては今後ますます重要性が増してくると考えられ最新の遺伝子情報を適切に医療の場で生かすことが重要であると考えられた。

[健康危険情報]

該当なし。

[研究発表]

1. 論文発表

- [1] Koji Tsukamoto, Hiroaki Suzuki, Daisuke Harada, Atsushi Namba, Satoko Abe, Usami S-i. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. 2003. submitted.
- [2] Shin-ichi Usami, Kentaro Takahashi, Isamu Yuge, Akihiro Ohtsuka, Atsushi Namba, Satoko Abe, Erik Fransen, Laszlo Pathy, Gottfried Otting, Camp GV. Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet, in press* 2003.
- [3] Hong-Joon Park, Shahzad Shaukat, Xue-Zhong Liu, Sihoun Hahn, Sadaf Naz, Manju

Ghosh, Hee-Nam Kim, Sung-Kyun Moon, Satoko Abe, Koji Tsukamoto, Saima Riazuddin, Madhulika Kabra, Raadnabazaryn Erdenetungalag, Janchiv Radnaabazar, Shaheen Khan, Arti Pandya, Shin-ichi Usami, Walter E. Nance, Edward R. Wilcox, Sheikh Riazuddin, Griffith AJ. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in East and South Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet, in press* 2003.

- [4] Abe S, Koyama K, Usami S, Nakamura Y. Construction and characterization of a vestibular-specific cDNA library using T7-based RNA amplification. *J Hum Genet* 2003;48(3):142-9.
- [5] Abe S, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Usami S, Inoue Y, Tsunoda T, Nakamura Y. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet* 2003;72(1):73-82.
- [6] Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, Van Camp G, Usami S. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 2003;112(4):329-33.
- [7] Usami SI, Koda E, Tsukamoto K, Otsuka A, Yuge I, Asamura K, Abe S, Akita J,

Namba A. Molecular diagnosis of deafness: impact of gene identification. *Audiol Neurootol* 2002;7(3):185-90.

[8] Ishinaga H, Shimizu T, Yuta A, Tsukamoto K, Usami S, Majima Y. Pendred's syndrome with goiter and enlarged vestibular aqueducts diagnosed by PDS gene mutation. *Head Neck* 2002;24(7):710-3.

[9] Van Camp G, Coucke PJ, Akita J, Franssen E, Abe S, De Leenheer EM, Huygen PL, Cremers CW, Usami S. A mutational hot spot in the KCNQ4 gene responsible for autosomal dominant hearing impairment. *Hum Mutat* 2002;20(1):15-9.

[10] Iwasaki S, Harada D, Usami S, Nagura M, Takeshita T, Hoshino T. Association of Clinical Features With Mutation of TECTA in a Family With Autosomal Dominant Hearing Loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128(8):913-7.

[11] Sugata A, Fukushima K, Sugata K, Fukuda S, Kimura N, Gunduz M, Kasai N, Usami S, Smith R, Nishizaki K. High-throughput screening for GJB2 mutations-its clinical application to genetic testing in prelingual deafness screening for GJB2 mutations. *Auris Nasus Larynx* 2002;29(3):231-239.

[12] De Leenheer EM, Ensink RJ, Kunst

HP, Marres HA, Talebizadeh Z, Declau F, Smith SD, Usami S, Van de Heyning PH, Van Camp G, Huygen PL, Cremers CW. DFNA2/KCNQ4 and its manifestations. *Adv Otorhinolaryngol* 2002;61:41-6.

[13] Yuge I, Ohtsuka A, Matsunaga T, Usami S. Identification of 605ins46, a novel GJB2 mutation in a Japanese family. *Auris Nasus Larynx* 2002;29(4):379-82.

[14] 宇佐美真一：「遺伝カウンセリングマニュアル；各論3.耳鼻咽喉科疾患」福嶋義光編、南江堂（印刷中）

## 2. 学会発表

[1] 日本人に見出されたTECTA遺伝子変異の2家系：原田大輔、鈴木宏明、弓削勇、岩崎聡、星野知之、宇佐美真一（平成14年10月 日本耳科学会）

[2] 優性遺伝形式を取る日本人非症候性難聴家系における原因遺伝子について：KCNQ4, TECTA, COCH 遺伝子変異：弓削勇、大塚明弘、原田大輔、阿部聡子、秋田二郎、宇佐美真一（平成14年10月 日本耳科学会）

[3] 変異型コネキシン 26 遺伝子トランスジェニックマウス作製の試み：大塚明弘、宇佐美真一（平成14年10月 日本耳科学会）

〔知的財産権の出願・登録状況〕

該当なし。

20020655

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.7-P.8の「研究発表」をご参照ください。