

20030591

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15年度 総括研究報告書

平成16(2004)年4月

主任研究者 宇佐美 真 一

目 次

I. 総括研究報告書

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
宇佐美 真一

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I. 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 穰、塚本 耕二、大塚 明弘、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）、阿部聡子（東京大学医科学研究所・ピーエムエル総合研究所）、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、すでに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, Ohtsuka et al., 2003)。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 15 年度は 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 SLC26A4(PDS)遺伝子変異に関して検討を行った。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なっていることが明らかとなった (Tsukamoto et al., 2003)。日本人難聴患者に高頻度に見出される H723R 変異に関してはマイクロサテライトマーカーを用いた解析によりこの変異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 (Park et al., 2003)。GJB2 遺伝子変異での検討結果と考え合わせると日本人家系を用いた遺伝子解析のデータベースは、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重要な基礎データとなると思われた。

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内耳に特異的に高発現する遺伝子 (Abe et al., 2003a) を中心にスクリーニングした結果、日本人難聴家系から新たな難聴の原因遺伝子として mu-crystallin (Abe et al., 2003a), KIAA1199 (Abe et al., 2003b), COL9A3(Asamura et al., submitted), ATP1A2(Ohtsuka et al, submitted)の各遺伝子が発見された。

遺伝子型と臨床型 (表現型) に関しては SLC26A4(PDS)遺伝子、GJB2 遺伝子における遺伝子型と臨床型 (表現型) との比較検討を行った。その結果、Pendred 症候群と前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴はともに SLC26A4(PDS)遺伝子が原因の一連の疾患群

であることが確認された (Tsukamoto et al., 2003)。またコネキシン 26 遺伝子に関しては従来中等度から高度難聴のものが多いとされていたが、今回検討した結果、日本人難聴家系に見出される変異のうち 2 番目に頻度の多い V37I 変異による難聴は軽度から中等度の難聴を示すことが明らかになった。

簡便なスクリーニング検査の確立については多数の遺伝子変異を同時に検出可能なインベーター法を用いた簡便なスクリーニング法を開発中であり、平成 15 年度は条件設定と頻度調査を行った。

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 15 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、「遺伝カウンセリングマニュアル(福嶋義光編):耳鼻科疾患」p112-120.)。

[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 15 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、SLC26A4(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、SLC26A4(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。

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

GJB2, SLC26A4(PDS)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。GJB2 遺伝子に関しては日本人難聴家系に見出された変異を細胞に導入し細胞内局在を観察し臨床型 (難聴の程度) と比較検討した。

[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 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 SLC26A4(PDS)遺伝子に関して検討したところ、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 SLC26A4(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っている

ことが明らかとなった (Tsukamoto et al., 2003)。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., 2003)。

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。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。

2) 新しい原因遺伝子の同定

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を通じて今回、日本人難聴家系から新たな難聴の原因遺伝子と

して mu-crystallin (Abe et al., 2003a), KIAA1199 (Abe et al., 2003b), COL9A3(Asamura et al., submitted), ATP1A2(Ohtsuka et al, submitted)の各遺伝子が発見された。

3) 遺伝子型と臨床型 (表現型) との比較検討

遺伝子型と臨床型 (表現型) との比較検討に関しては SLC26A4(PDS)遺伝子、GJB2 遺伝子に関して遺伝子型と臨床型 (表現型) との比較検討を行った。SLC26A4(PDS)遺伝子変異が、ペンドレッド症候群と前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴で高率に認められたことから、両疾患は SLC26A4(PDS)遺伝子変異によって引き起こされる疾患であるということが確認できた。膜貫通蛋白であるペンドリンは内耳、甲状腺、腎に発現することが知られている。またペンドリンは塩素とヨードを輸送し、ヨードとギ酸の交換を調整することが証明されている。今回日本人難聴家系に種々の変異および表現型が見出されたが、ペンドレッド症候群を起こす SLC26A4(PDS) 遺伝子変異は、ペンドリンによる塩素とヨードの輸送機能を完全に欠落させるため甲状腺腫が発生するのに比し、前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴を起こす変異は、その輸送機能を低下させるが、甲状腺機能が維持される程度であるため、甲状腺腫は発生しないと考えられた。

またコネキシン 26 遺伝子に関しては従来中等度から高度難聴のものが多くとされていた

が、今回検討した結果、日本人難聴家系に見出される変異のうち2番目に頻度の多いV37I変異による難聴は軽度から中等度の難聴を示すことが明らかになった。コネキシン26遺伝子に関しては日本人難聴家系に見出された変異を細胞に導入し細胞内局在を観察し臨床型（難聴の程度）と比較検討した。その結果、細胞膜に蛋白が発現しない変異（235delC）は発現する変異（V37I）に比較し難聴が一般的に高度であることが明らかとなった（Oguchi et al., submitted）。したがってGJB2遺伝子に関しては遺伝子解析によってある程度難聴の程度が推測できる可能性が示唆された。

4) 簡便なスクリーニング検査の確立
多数の遺伝子変異を同時に検出可能なインベーター法を用いた簡便なスクリーニング法に関してはほぼ条件設定が終了し、各遺伝子変異の頻度に関して検討を行った。平成16年度中に臨床応用を実施する予定である。

(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15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」福島義光編）。

[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] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Park HJ, Shaikat S, Liu XZ, Hahn SH, Naz S, Ghosh M, Kim HN, Moon SK, Abe S, Tukamoto K, Riazuddin S, Kabra M, Erdenetungalag R, Radnaabazar J, Khan S, Pandya A, Usami SI, Nance WE, Wilcox ER,

Griffith AJ. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet* 2003;40(4):242-8.

[5] Usami S, Takahashi K, Yuge I, Ohtsuka A, Namba A, Abe S, Fransen E, Pathy L, Otting G, Van Camp G. 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* 2003;11(10):744-8.

[6] Abe S, Usami S, Nakamura Y. Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss. *J Hum Genet* 2003;48(11):564-70.

[7] Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami S. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur J Hum Genet* 2003;11(12):916-22.

[8] 宇佐美真一：「遺伝カウンセリング
グマニユアル；各論 3. 耳鼻咽喉科疾患」
福嶋義光編、南江堂

2. 学会発表

[1] *ATP1A2* 遺伝子変異を伴う難聴家系について： 大塚 明弘、工藤、阿部 聡子、清水謙祐、河野浩万、東野哲也、宇佐美 真一
(平成15年10月 日本耳科学会)

[2] 日本人難聴家系に見出された *COL9A3* 遺伝子変異： 浅村賢二、工藤、福岡久邦、橋本 繁成、阿部 聡子、宇佐美 真一
(平成15年10月 日本耳科学会)

[3] Van der Hoeve 症候群 2 症例の経験
—遺伝カウンセリングと治療について—：
大島章、工藤、 最上由美、 佐藤英子、 大塚明弘、 伊沢真奈美、 鈴木伸嘉、 小林克彦、 鬼頭良輔、 我妻道生、 宇佐美真一 (平成 15 年 10 月 日本耳科学会)

[4] 日本人難聴患者におけるミトコンドリア遺伝子 961 delT 変異の頻度と臨床像について： 小林克彦、浅村賢二、大塚明弘、宇佐美真一

[5] 非症候群性先天性難聴患者に認められた *KIAA1199* protein 遺伝子変異： 阿部聡子、宇佐美真一、中村祐輔

[知的財産権の出願・登録状況]

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宇佐美真一	耳鼻科疾患	福島義光	遺伝カウンセリン グマニュアル	南江堂	東京	2003	112-120

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	72(1)	73-82	2003
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	48(3)	142-149	2003
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	112(4)	329-333	2003
Park HJ, Shaukat S, Liu XZ, Hahn SH, Naz S, Ghosh M, Kim HN, Moon SK, Abe S, Tukamoto K, Riazuddin S, Kabra M, Erdenetungalag R, Radnaabazar J, Khan S, Pandya A, Usami SI, Nance WE, Wilcox ER, Griffith AJ	Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness.	J Med Genet	40(4)	242-248	2003
Usami S, Takahashi K, Yuge I, Ohtsuka A, Namba A, Abe S, Fransen E, Pathy L, Otting G, Van Camp G	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	11(10)	744-748	2003
Abe S, Usami S, Nakamura Y	Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss.	Hum Genet	48(11)	564-570	2003

Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami S	Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese	Eur J Hum Genet	11(12)	916-922	2003
--	---	--------------------	--------	---------	------

20030591

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。