

201317036A

厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合研究事業  
(感覚器障害分野)

新しい難聴遺伝子診断システムの開発および  
臨床応用に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇佐美 真一

平成 26 (2014) 年 3 月

## 目 次

I. 新しい難聴遺伝子診断システムの開発および臨床応用に関する研究 研究者名簿	1
II. 総括研究報告	
新しい難聴遺伝子診断システムの開発および臨床応用に関する研究	7
宇佐美真一	
III. 分担研究報告	
1. 当科で 遺伝子診断を行った高度難聴症例に関する研究	23
内藤 泰	
2. 岩手医科大学における保険収載後の難聴の遺伝学的検査と遺伝カウンセリングの有用性に関する研究	28
佐藤 宏昭	
3. 当院におけるインベーターパネル法による難聴遺伝子解析結果と難聴治療への応用	32
熊川 孝三	
4. 次世代シーケンサーを用いた孤発例難聴患者に対する難聴遺伝子解析に関する研究	37
松永 達雄	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
V. 研究成果の刊行物・別刷	49

I. 新しい難聴遺伝子診断システムの開発および  
臨床応用に関する研究

研究者名簿

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業  
（感覚器障害分野））

新しい難聴遺伝子診断システムの開発および臨床応用に関する研究

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	宇佐美真一	信州大学医学部耳鼻咽喉科	教授
研究分担者	工 穰	信州大学医学部耳鼻咽喉科	准教授
	岩崎 聡	信州大学医学部人工聴覚器学講座	客員教授
	熊川 孝三	虎の門病院耳鼻咽喉科・聴覚センター	部長・聴覚 センター長
	東野 哲也	宮崎大学医学部耳鼻咽喉科学講座	教授
	佐藤 宏昭	岩手医科大学耳鼻咽喉科学講座	教授
	内藤 泰	神戸市立医療センター中央市民病院耳鼻咽喉科	部長
	松永 達雄	東京医療センター臨床研究センター	室長

## Ⅱ. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）  
総括研究報告書

新しい難聴遺伝子診断システムの開発および臨床応用に関する研究

研究代表者 宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科学講座・教授）

研究要旨

先天性難聴は newborn 1,000 人に 1 人に認められる頻度の高い疾患であり、音声言語コミュニケーションの大きな障害となるため、日常生活や社会生活の質（QOL）の低下を引き起こし、長期に渡って生活面に支障を来たすため、診断法・治療法の開発が期待されている重要な疾患のひとつである。

当研究室では先天性難聴の遺伝子解析に精力的取り組んでおり、多くの遺伝子変異を発見、報告してきた。また、臨床上的有用性が明らかとなった 13 遺伝子 46 変異に関しては、2012 年からは保険診療「遺伝学的検査（先天性難聴）」として研究成果を臨床の診断ツールとして還元してきた。難聴の遺伝子診断は、予後、随伴症状の予測など多くのメリットのある検査ではあるが、保険診療で行われている遺伝子診断の診断率は 30～40% 程度であり、今後の診断率の向上のためには新規変異の追加が必要不可欠である。しかし、難聴の原因としては、おおよそ 100 種類ぐらいの遺伝子が関与することが示唆されており、このように多数の遺伝子を効率的に解析する事は困難であった。本研究では、3 年間の研究期間を通じて、1) 次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断システムの開発および、2) 難聴の程度や難聴の進行、随伴症状などの臨床情報をデータベース化することにより、難聴のサブタイプ分類を行い、科学的根拠に基づいた新しい難聴遺伝子診断システムの開発および臨床応用を目的としている。平成 25 年度は、既知の難聴原因遺伝子 63 遺伝子を網羅する AmpliSeq custom キットを用いて難聴患者 300 名を対象に「インバーダー法」の結果と「次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析」の結果の比較を行った。その結果、次世代シーケンサーを用いた検査では、インバーダー法に含まれる遺伝子変異に関して同等に検出可能であることが明らかとなった。また、インバーダー法により原因が特定されなかった人工内耳装用症例を対象に、既知の難聴原因遺伝子 63 遺伝子の網羅的解析を行った所、非常に稀な *ACTG1*、*TMPRSS3*、*MYO15A*、*TECTA* 遺

伝子変異による難聴を見出す事ができた。

#### 研究分担者氏名・所属機関名・職名

工 穰（信州大学医学部耳鼻咽喉科・准教授）、岩崎 聡（信州大学医学部人工聴覚器学講座・客員教授）、熊川孝三（虎の門病院耳鼻咽喉科・聴覚センター・部長・聴覚センター長）、東野哲也（宮崎大学医学部耳鼻咽喉科学講座・教授）、佐藤宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科学講座・教授）、内藤 泰（神戸市立医療センター中央市民病院耳鼻咽喉科・部長）、松永達雄（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）

#### 研究協力者

宮川麻衣子（信州大学医学部耳鼻咽喉科・委嘱講師）、内藤武彦（信州大学医学部耳鼻咽喉科・特任研究員）、矢野卓也（信州大学医学部耳鼻咽喉科・助教）、市瀬彩（信州大学医学部耳鼻咽喉科・医員）、岩佐陽一郎（信州大学医学部耳鼻咽喉科・医員）、西尾信哉（信州大学医学部耳鼻咽喉科・助教）

#### A. 研究目的

先天性難聴は newborn 1,000 人に 1 人に認められる頻度の高い疾患である。特に高度～重度難聴の場合には音声言語コミュニケーションの大きな障害となるため、日常生活や社会生活の質（QOL）の低下を引き起こし、長期に渡って生活面に支障を来すため、診断法・治療法

の開発が期待されている重要な疾患のひとつである。

難聴の早期発見に関しては、新生児聴覚スクリーニングの普及により、生後 1 週間以内に難聴が発見されるようになってきたが、多くの場合原因不明であり、予後の予測や随伴症状の予測などは困難であった。研究代表者は従来より先天性難聴の遺伝子解析に精力的に取り組んでおり、多くの原因遺伝子変異を発見、報告してきた。また、临床上の有用性が明らかとなった 13 遺伝子 46 変異に関しては、2008 年には先進医療「先天性難聴の遺伝子診断」として、2012 年からは保険診療「遺伝学的検査（先天性難聴）」として研究成果を臨床の診断ツールとして社会還元してきた。難聴の遺伝子診断は、重症度の予測、予後の予測、随伴症状の予測など多くの医学的情報が得られるため、その情報に応じた医学的介入を行う事が可能になるなど多くのメリットのある検査であり、全国の大学病院を中心に一般診療として普及しつつある。現在、保険診療で行われている遺伝子診断の診断率は 30～40% 程度であるため、今後の診断率の向上のためには新規変異の追加が必要不可欠である。しかし、難聴の原因としては、おおよそ 100 種類ぐらいの遺伝子が関与する遺伝的異質性の高い疾患であることが報告されており、従来は効率的に解析す

る事が困難であった。

近年、次世代シーケンサー（超並列シーケンサー）が実用化され、多数の原因遺伝子を網羅的に解析することが可能となってきた。

本研究では、3年間の研究期間を通じて、1) 次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断システムを開発する、2) 難聴の程度や難聴の進行、随伴症状などの臨床情報をデータベース化することにより、難聴のサブタイプ分類を行い、科学的根拠に基づいたオーダーメイド医療を実現する基盤を整備する、ことの2つを目的とした研究を行い、最終的には新しい難聴遺伝子診断システムの臨床応用を目的としている。

## B. 研究方法

### 1) 次世代シーケンサーの感度・特異度に関する検討

平成25年度は、次世代シーケンサーを用いた新しい遺伝子診断システムが、実際の臨床診断に利用可能なレベルの正確性を有しているかを明らかにする事を目的に、難聴患者300名を対象に十分な説明の上、書面で同意を取得し、平成24年度保険点数改定により保険収載された「遺伝学的検査（先天性難聴）」で用いられている「インベーター法」と同等の手法で遺伝子解析を行った結果と「次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析法」の結果との比較を行った。

「インベーター法」に関しては、患者

由来のDNAサンプルに、シグナルプローブ、インベーターオリゴ、フレットプローブおよびクリベースを混合し、60℃で4時間反応させた後に蛍光プレートリーダーで遺伝子型の決定を行った。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析としては、既知の難聴原因遺伝子63遺伝子を網羅する Ion AmpliSeq custom キット (Applied Biosystems) を用いて、難聴患者の既知難聴原因遺伝子の全エクソン領域をマルチプレックス PCR 法により増幅した。増幅産物の末端部を切断した後に塩基配列決定に必要なアダプター配列を DNA リガーゼにより付加し次世代シーケンス解析のためのライブラリーとした。得られたライブラリーの濃度を定量 PCR 法により定量し、6名分を等量ずつ混合した後に、Ion OneTouch2 システムを用いてエマルジョン PCR をを行い、ビーズ上にライブラリーDNAを増幅させる。増幅を行ったビーズを回収し、IonTorrent PGM システムを用いて次世代シーケンス解析を行った。IonTorrent PGM 解析では、患者6名に対して1枚の318-chipを用いて解析を行った。得られたデータは解析ソフトウェア Torrent Suitに含まれる TMAP を用いてヒトゲノム (hg19) にマッピングを行った。また、Coverage Analysis を用いて被覆率等の計算を行った。また、変異の検出は Ion Variant Caller を用いて検出を行った。



## (2) 次世代シーケンサーを用いた新規難聴遺伝子変異の解析

また、インベーター法により原因が特定されなかった症例に対しては新規遺伝子変異の探索を行った。

前述の Ion Torrent システムを用いて既知の難聴原因遺伝子 63 遺伝子の網羅的解析を行った結果、得られた候補遺伝子変異を対象に下記のフィルターを適応して変異の絞り込みを行った。①エクソン領域あるいはスプライスジャンクション領域の変異である、②アミノ酸配列に影響を及ぼす変異（同義置換以外の変異）である、③1,000 人ゲノムでのアレル頻度が 1%以下、④6,500 エクソームでのアレル頻度が 1%以下、⑤家族歴と照らし合わせて矛盾が無い、⑥過去に報告のある聴力像と類似の難聴を呈する。

フィルターを適応して候補遺伝子変異の絞り込みを行った後、さらに直接シーケンシングにより変異を確認するとともに家系解析を行った。

直接シーケンシング解析に関しては、候補遺伝子変異を挟むプライマーを用いて PCR 法により遺伝子変異領域を増幅し、ABI 社 BigDye Terminator v1.1 を用いてシーケンシングサンプルを調整した。配列決定には ABI 3130xl を用いた。

(倫理面への配慮)

被験者に対して十分な説明を行ったうえ、書面で同意を取得して、サンプルを採取した。また、サンプル採取に際しては匿

名化を行い個人情報の保護に配慮した。

## C. 研究結果

### 1) 次世代シーケンサーの感度・特異度に関する検討

本研究で実施した次世代シーケンシング 63 回の検討に関しては、318-chip、1 枚あたり、得られたデータは平均 3.56M リード (1.90M~5.21M) であり (図 1)、得られた塩基配列のうち Q17 を超えるものは 461Mbase (4 億 6 千万塩基) であった (179Mbase~719Mbase)。

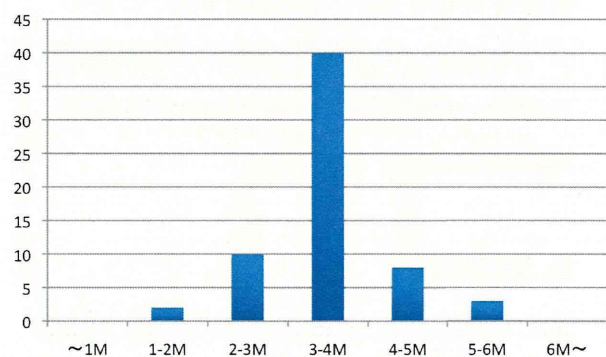


図 1 Run ごとのリード数の分布

次世代シーケンサー63 ランより得られた、リード数の分布を示す。平均である 3.56M 付近を中心に非常に均質なリード数が得られており、安定した測定系であることが分かる。

また、やり直しを含む 381 症例に関して詳細に見て行くと、一人当たりのデータ量は平均 58 万リード (15 万~114 万リード) であった。また、平均の depth of coverage は 241 depth (50.6 ~ 500 depth) であり (図 2)、また、20 depth 以上の被覆深度で読まれている領域は、ターゲット領域の平均 97.72% (89.43% ~98.88%) であった (図 3)。

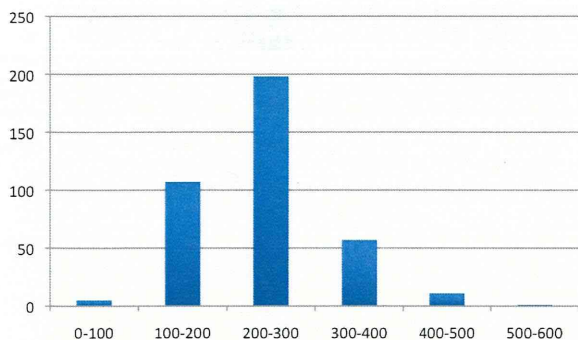


図2 症例ごとの平均被覆度

次世代シーケンサーにより得られた、症例ごとの平均被覆度 (depth of coverage) の分布を示す。図1に示すリード数の分と比較して、症例毎に見た場合には平均被覆深度にややばらつきを認めるものの、概ね 100depth 以上のデータが得られていることが分かる。

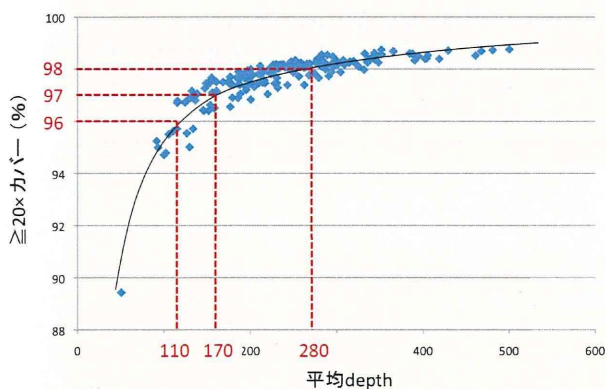


図3 症例ごとの平均被覆度とカバー率

次世代シーケンサーにより得られた、症例ごとの平均 depth と 20x 以上の被覆度で読まれた領域の割合 (%) の分布を示す。

症例毎に配列決定深度はばらつきを認めるものの、20x 以上の被覆度で読まれた領域の割合比較的均質なデータが得られており、平均 170depth でターゲット領域の 97% の配列を決定できており、変異の見逃しは少ないことが示唆される。

図2、図3より、本研究では①平均 100depth 以上のデータが得られている、②20x depth カバー領域が 96% 以上の 2 つの条件を共に満たしていることを足切り条件として定めた。その結果、381 例

中 14 例が基準を下回った。14 例に関しては再検を実施した所、全例で基準を上回るデータが得られており、検査不能例は 1 例も無かった。

また、63 遺伝子のエクソン領域の遺伝子変異の検出では、1 例あたり平均 275.2 変異 (204~377 変異) が検出された。

検出された変異と難聴患者 200 名を対象に平成 24 年度保険点数改定により保険収載された「遺伝学的検査 (先天性難聴)」で用いられている「インベーター法」と同等の手法で遺伝子解析を行った結果と「次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析」の結果の比較を行った。

その結果、次世代シーケンサーを用いた検査では、インベーター法に含まれる遺伝子変異に関して、Ion AmpliSeq のプライマーの設計できた領域に関しては変異の見逃しは 1 例も認め無かった (表 1)。

一方、Ion AmpliSeq のプライマーの設計出来なかったミトコンドリア遺伝子変異および *SLC26A4* 遺伝子変異の一部に関しては、アンプリコンでカバーされていないため検出できなかった。またインベーターに含まれる変異部位に関して、偽陽性となるケースは 1 例も認めなかった。今後更に症例数を増やし、偽陽性、偽陰性に関する情報を蓄積することで、臨床応用のための基盤を整えることが可能である。

変異の種類		インベーター法	IonAmpliSeq
GJB2	c.235 delC	30	30
	c.134G>A ; 408C>A	7	7
	c.176_191del	4	4
	c.299_300del	4	4
	c.427C>T	4	4
	c.257C>G	2	2
SLC26A4	c.2168A>G	7	7
	c.1229C>T	6	6
	c.919-2A>G	2	2
	c.1705+5G>A	2	0
	c.439A>G	1	1
total	69	67	

表1 インベーター法の結果と次世代シーケンスの結果の比較 (n=100)

インベーター法により検出された遺伝子変異と次世代シーケンス法により検出された遺伝子変異の比較。インベーター法で検出された変異がいずれも次世代シーケンス法でも検出されており、擬陽性となったケースは認めなかった。SLC26A4 遺伝子の c.1705+5G>A 変異に関しては AmpliSeq プライマーの設計領域外であるため、次世代シーケンス法では検出されなかった。

## (2) 次世代シーケンサーを用いた新規難聴遺伝子変異の解析

インベーター法により原因が特定されなかった症例を対象に、次世代シーケンサーを用いて既知の難聴原因遺伝子 63 遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、各症例にそれぞれ 275 程度の変異が検出された。この候補遺伝子変異を対象に下記のフィルターを適応して変異の絞り込みを行った。①エクソン領域あるいはスプライスジャンクション領域の変異である、②アミノ酸配列に影響を及ぼす変異（同義置換以外の変異）である、③1,000 人ゲノムでのアレル頻度が 1%以下、④6,500 エクソームでのアレル頻度が 1%以

下を適応して候補遺伝子変異の絞り込みを行った結果、各症例とも変異は 10 前後まで絞り込むことが出来た。絞り込みを行った後、⑤家族歴と照らし合わせて矛盾が無い、⑥過去に報告のある聴力像と類似の難聴を呈する事を確認するとともに直接シーケンスにより変異を確認するとともに家系解析を行った。

その結果、人工内耳装用患者より非常に稀な ACTG1、TMPRSS3、MYO15A、TECTA 遺伝子変異を見出す事ができた (Miyagawa et al., PLoS ONE 2013)。ACTG1、TMPRSS3 症例に関しては低音部に残存聴力を有しており、残存聴力活用型人工内耳の適応であり、先進医療 (B)

「残存聴力活用型人工内耳挿入術」を受けた症例であった。これらの症例は残存聴力活用型人工内耳の装用効果が高く、これら遺伝子変異を持つ症例に対する「残存聴力活用型人工内耳」の有効性を世界に先駆けて報告した。また、*MYO15A*、*TECTA* 遺伝子変異は小児人工内耳症例から見出されており、人工内耳の装用により聴取能が改善するとともに音声言語発達が顕著であることが示された。このように新規難聴遺伝子変異の解析にも有用であることが確認された。現在、継続的に解析を行っている所であり、今後の研究の継続により更なる成果が期待できる状況である。

#### D. 考察

本研究では、3年間の研究期間を通じて、近年、実用化された次世代シーケンサー（超並列シーケンサー）を用い、既知の難聴原因遺伝子を網羅的に解析する新しい遺伝子診断システムの開発および臨床応用を目的にしている。

本年度は次世代シーケンサーの感度・特異度を明らかにすることを目的に難聴患者 300 名を対象に十分な説明の上、書面で同意を取得し、「インベーター法」と同等の手法で遺伝子解析を行った結果と「次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析法」の結果との比較を行った。

その結果、次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断システムは、検査間および

症例間で比較的ばらつきの少ない均質なデータが得られることが明らかとなった。また、インベーター法の検査結果との比較では、非常に高い一致率を有しており、優れた検査手法であることが確認された。一方、AmpliSeq によるライブラリ調整の段階で、カバーされていないミトコンドリア遺伝子や各遺伝子の一部領域に関しては変異の検出が出来ない。現在、この点を改善するための新しいライブラリ調整用のオリゴヌクレオチドライブラリの開発を進めており、今後改善を行う計画である。また、新規遺伝子変異の探索に関しては、稀な原因遺伝子変異である *ACTG1*、*TMPRSS3*、*MYO15A*、*TECTA* 遺伝子変異を効率よく見出す事が出来ており今後の研究の継続により更なる成果が期待できる状況である。特に、*ACTG1*、*TMPRSS3* 症例に関しては低音部に残存聴力を有しており、先進医療（B）「残存聴力活用型人工内耳挿入術」を受けた症例であった。これらの症例は残存聴力活用型人工内耳の装用効果が高く、これら遺伝子変異を持つ症例に対する「残存聴力活用型人工内耳」の有効性を明らかにすることができた。このように、原因別に治療の効果に関するエビデンスを確立することによりオーダーメイド医療の基盤を確立することが可能であると考えられる。

#### E. 結論

本研究により、定量性およびスループットに優れた定量 PCR 法による検出システムを構築するとともに、その感度および特異度に関して明らかにした。また、FTA カードを用いたマススクリーニングとして 154 名の新生児のスクリーニング検査を実施する事が出来た。さらにまた、本邦における CMV 株の検討を行い、2 株存在することが確認された。今後更に多数の症例を解析することで、本邦における罹患者頻度が明らかとなることが期待される。

## F. 研究発表

### 論文発表

- [1] Yoshida H, Takahashi H, Kanda Y, Usami S. Long term speech perception after cochlear implant in pediatric patients with *GJB2* mutations. *Auris Nasus Larynx* 40(5): 435-439. 2013
- [2] Ganaha A, Kaname T, Yanagi K, Naritomi K, Tono T, Usami S, Suzuki M. Pathogenic substitution of IVS15+5G>A in *SLC26A4* in patients of Okinawa Islands with enlarged vestibular aqueduct syndrome or Pendred syndrome. *BioMed Central* 14(56): 2-10. 2013
- [3] Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, Ishikawa K, Kojima H, Namba A, Oshikawa C, Usami S. Comprehensive Genetic Screening of *KCNQ4* in a Large Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss Cohort: Genotype-Phenotype Correlations and a Founder Mutation. *PLoS ONE* 8(5): e63231. 2013
- [4] Miyagawa M, Naito T, Nishio S, Kamatani N, Usami S. Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients. *PLoS ONE* 8(8): e71381. 2013
- [5] Miyagawa M, Nishio S, Ikeda T, Fukushima K, Usami S. Massively parallel DNA sequencing successfully identifies new causative mutations in deafness genes in patients with cochlear implantation and EAS. *PLoS ONE* 8(10): e75793. 2013
- [6] Iwasa Y, Nishio S, Yoshimura H, Kanda Y, Kumakawa K, Abe S, Naito Y, Nagai K, Usami S. *OTOF* mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients. *BMC Med Genet* 14(1): 95. 2013
- [7] Yano T, Ichinose A, Nishio S, Kobayashi Y, Sato H, Usami S. A Novel Mutation of *MYO15A* Associated with Hearing Loss in a Japanese Family. *J Clin Case REP* 3(12):2-4. 2013
- [8] 西尾信哉、宇佐美真一 難聴の遺伝子診断と次世代シーケンス解析. 医学のあ

- ゆみ 245(5): 393-400. 2013
- [9] Yano T, Nishio S, Usami S, deafness gene study consortium. Frequency of mitochondrial mutation in non-syndromic hearing loss as well as possibly responsible variants found by whole mitochondrial genome screening. *J Hum Genet* 59: 100-106. 2014
- [10] Ishikawa K, Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Nakamura K, Usami S, Ichimura K. A Japanese family showing high-frequency hearing loss with *KCNQ4* and *TECTA* mutations. *Acta Otolaryngol* 2014 in press.
- [11] Miyagawa M, Nishio S, Usami S. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients caused by *SLC26A4* mutations in the Japanese: a large cohort study. *J Hum Genet* 2014 in press.
- [12] 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.* 2013;8(1):172
- [13] Matsunaga T, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I. *Acta Otolaryngol* 2013 Apr; 133(4): 345-51
- [14] Watabe T, Matsunaga T, Namba K, Mutai H, Inoue Y, Ogawa K. Moderate hearing loss associated with a novel *KCNQ4* non-truncating mutation located near the N-terminus of the pore helix. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432(3): 475-479
- [15] 松永達雄. Auditory Neuropathy Spectrum Disorders In : 加我君孝・編集. 新生児・幼小児の難聴－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 : 東京 2014;26-29
- [16] 松永達雄. 難聴遺伝子変異 In : 加我君孝・編集. 新生児・幼小児の難聴－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 : 東京 2014;19-25
- [17] 松永達雄、藤岡正人、細谷誠. Pendred 症候群研究の現況と展望 日本臨床 2013; 71(12): 2215-2222
- [18] 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* 2013;23(5):903-907

#### 学会発表

- [1] 内藤武彦、宮川麻衣子、西尾信哉、宇佐美真一: 次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析～同定された原因遺伝子と遺伝疫学～. 第 114 回日本耳鼻

- 咽喉科学会総会・学術講演会 2013.5.15  
～18. 札幌
- [2] 宮川麻衣子、内藤武彦、西尾信哉、宇佐美真一: 次世代シーケンサーによって見出された難聴患者の臨床像について. 第 114 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2013.5.15～18. 札幌
- [3] 岩佐陽一郎、吉村豪兼、工 穰、宇佐美真一: *OTOF* 遺伝子変異による Auditory neuropathy 症例の臨床像と人工内耳の効果に関する検討. 第 8 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会 2013.6.20～21. 前橋
- [4] 宮川麻衣子、西尾信哉、池田卓生、福島邦博、宇佐美真一: 次世代シーケンサーによって原因が見出された *TECTA* および *MYO15A* 遺伝子変異による先天性難聴. 第 8 回 日本小児耳鼻咽喉科学会総会 2013.6.20～21. 前橋
- [5] Usami S, Miyagawa M, Naito T, Moteki H, Nishio S. Screening strategy for molecular diagnosis of deafness: From social health insurance based screening massively parallel DNA sequencing. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference. 2013.6.22-25. Stanford University.
- [6] Moteki H, H.Azaiez, K.Booth, A.E. Shearer, R.J.H. Smith, Usami S. Comprehensive genetic testing in a Japanese hearing impaired population using otoscope. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference. 2013.6.22-25. Stanford University.
- [7] Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, Ishikawa K, Kojima H, Namba A, Oshikawa C, Usami S. Comprehensive genetic screening of *KCNQ4* in a large autosomal dominant nonsyndromic hearing loss cohort: genotype- phenotype correlations and a founder mutation. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference. 2013.6.22-25. Stanford University.
- [8] Miyagawa M, Nishi S, Ikeda T, Fukushima K, Usami S. Massively parallel DNA sequencing successfully discovers new causative mutations in deafness genes in patients with cochlear implantation. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference. 2013.6.22-25. Stanford University.
- [9] Nishio S, Miyagawa M, Naito T, Nakazono K, Kamatani N, usami S. Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference. 2013.6.22-25. Stanford University

- [10] 市瀬彩、宇佐美真一：次世代シーケンスにより *COCH* 遺伝子変異が特定された進行性難聴の一家系. 第 75 回耳鼻咽喉科臨床学会 2013.7.11-12. 神戸
- [11] S Nishio, S Usami. Comprehensive genetic screening of hearing loss for efficient clinical molecular diagnosis. Life Technologies Asia Pacific Japan 2013 Genetic Analysis Summit. 2013.9.28-30. Bali
- [12] 工 穰：難聴の遺伝子診断とカウンセリング 第 58 回日本音声言語医学会学術講演会 2013.10.17-18. 高知
- [13] 熊川孝三、熊谷文愛、射場恵、三澤建、阿部聡子、眞岩智道、加藤央、武田英彦、原田綾、山田奈保子、鈴木雪恵、大森孝一、宇佐美真一：既存補聴器併用による小児の残存聴力活用型人工内耳症例—遺伝学的検査による治療戦略の有用性—. 第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013.10.24-25. 松本
- [14] 三澤建、熊川孝三、阿部聡子、松田絵美、眞岩智道、加藤央、武田英彦、宇佐美真一：当院におけるインペーダーパネル法による難聴遺伝子解析結果と難聴治療への応用. 第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013.10.24-25. 松本
- [15] 小林有美子、佐藤宏昭、村井和夫、村井盛子、岩井詔子、宇佐美真一：難聴の遺伝子診断が有用であった感音難聴と糖尿病合併症例. 第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013.10.24-25. 松本
- [16] 永野由起、近藤香菜子、池ノ上あゆみ、松田圭二、牛迫泰明、東野哲也、宇佐美真一：聴覚管理に遺伝学的検査が有用であった優勢遺伝形式の branchio-oto-renal syndrom の一家系. 第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013.10.24-25. 松本
- [17] 岩佐陽一郎、吉村豪兼、宮川麻衣子、西尾信哉、工 穰、宇佐美真一：Auditory neuropathy spectrum disorder に対する遺伝子診断の有用性及び遺伝カウンセリング. 第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013.10.24-25. 松本
- [18] 宮川麻衣子、西尾信哉、宇佐美真一、長野誠、山口敏和：保険収載後の難聴遺伝子診断の現況. 第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013.10.24-25. 松本
- [19] 工 穰、塚田景大、宮川麻衣子、宇佐美真一：乳幼児期の ASSR 推定聴力閾値と成長後の純音聴力検査閾値の比較～*GJB2* 遺伝子変異症例の検討～. 第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013.10.24-25. 松本
- [20] 塚田景大、福岡久邦、宮川麻衣子、工 穰、宇佐美真一：*GJB2* 遺伝子変異症例における前庭機能評価について. 第 72 回 日本めまい平衡医学会 2013.11.13-15. 大阪
- [21] 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、鎌谷直之、宇佐美真一：次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析～同定され



- た原因遺伝子と遺伝疫学～. 第 58 回  
 日本人類遺伝学会 2013.11.20-23. 仙  
 台
- [22] 宮川麻衣子、西尾信哉、池田卓生、  
 福島邦博、宇佐美真一: 次世代シーケン  
 サーを用いた人工内耳装用患者の遺伝  
 子解析. 第 58 回 日本人類遺伝学会  
 2013.11.20-23. 仙台
- [23] 宇佐美真一: Ion PGM シーケンサーを  
 用いた難聴遺伝子解析の臨床応用. 第  
 58 回 日本人類遺伝学会  
 2013.11.20-23. 仙台
- [24] 宮川麻衣子、内藤武彦、西尾信哉、宇  
 佐美真一: 次世代シーケンサーにより  
 同定された *MYO15A*, *TECTA*,  
*TMPRSS3*, *ACTG1* 変異を伴う人工内  
 耳症例. 第 23 回 日本耳科学会  
 2013.11.24-26. 宮崎
- [25] 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、宇  
 佐美真一: 次世代シーケンサーによる  
 難聴の遺伝子解析および遺伝的背景の  
 解. 第 23 回 日本耳科学会  
 2013.11.24-26. 宮崎
- [26] 岩佐陽一郎、市瀬彩、宮川麻衣子、西  
 尾信哉、宇佐美真一: 次世代シーケンサ  
 ーで見出された *TMC1* 遺伝子変異例.  
 第 23 回 日本耳科学会  
 2013.11.24-26 宮崎
- [27] 市瀬彩、西尾信哉、宇佐美真一: 次世  
 代シーケンサーにより *LRTOMT* 遺伝  
 子変異が見出された一家系. 第 23 回  
 日本耳科学会 2013.11.24-26. 宮崎
- [28] Usami S. Application of genetic  
 testing for cochlear implantation  
 candidates. APSCI2013  
 2013.11.26-29. インド
- [29] Miyagawa M. Massively parallel  
 DNA sequencing successfully  
 discovers new causative mutations in  
 deafness genes in patients with  
 cochlear implantation. APSCI2013  
 2013.11.26-29. インド
- [30] Iwasa Y. *OTOF* mutation screening  
 in Japanese severe to profound  
 recessive hearing loss patients 12th  
 Taiwan-Japan Conference on  
 Otolaryngology Head and Neck  
 surgery 2013.12.5-7 Taiwan
- [31] 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
- [32] Namba K, Kaneko H, Masuda S,  
 Mutai H, Usui S, Matsunaga T.  
 Novel pathological model of Proximal  
 symphalangism and conductive  
 hearing loss revealed by docking  
 simulation of Noggin and heparin.  
 9th Molecular Biology of Hearing &

Deafness Conference the Stanford  
School of Medicine in Stanford,  
California, USA 2013 年 6 月 22-25  
日

なし

3.その他

なし

- [33] 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 札幌市 2013 年 5 月 15-18 日
- [34] 松永達雄、藤岡正人、加我君孝. 次世代シーケンシングで MYO15A 遺伝子変異が認められた先天性難聴の孤発例の 1 例 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会 松本市 2013 年 10 月 24-25 日
- [35] 務台英樹、難波一徳、加我君孝、松永達雄. 孤発例の先天性難聴患者における稀少難聴原因候補の同定 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日
- [36] 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 宮崎市 2013 年 11 月 24-26 日

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

### III. 分担研究報告

—新しい難聴遺伝子診断システムの開発および臨床応用に関する研究—

当科で遺伝子診断を行った高度難聴症例に関する研究

研究分担者 内藤 泰 神戸市立医療センター中央市民病院 副院長

研究協力者 諸頭三郎、山本輪子、岸本逸平、十名理紗、藤原敬三

研究要旨

当科を受診した難聴患者のうち、難聴遺伝子検査を施行したのは 72 家系 115 名であり、遺伝子変異が特定された症例が 25 家系 28 名、遺伝子変異が同定されなかった症例が 30 家系 33 名、検査結果待ちの段階にある症例が 17 家系 54 名であった。頻度の高い 46 変異に対する一括検査を施行した例数は 46 家系 49 名で、このうち 19 家系 20 名について遺伝子変異部位が同定され、同定率は約 45%であり、本検査の臨床的有用性が再確認された。

A. 研究目的

難聴患者に対する遺伝子変異検査の実施状況、変異遺伝子の同定率等を調べ、本検査の臨床的有用性について検討した。

B. 研究方法

当科を受診し、臨床経過から遺伝性難聴が疑われ、難聴遺伝子検査を施行した72家系115名を対象に、その検査結果をまとめるとともに、昨年度までの結果と比較した。

C. 研究結果

検査を行ったのは 72 家系 115 人（昨年度までは 43 家系 73 名、以下カッコ内は昨年度の報告で示した値）で、の結果の内訳は、遺伝子変異が特定された症例が 25 家系 28 人（昨年度まで：12 家系 14 人）、遺伝子変異が同定されなかった症例が 30 家系

33 人（昨年度まで：16 家系 18 人）、検査結果待ちの段階にある症例が 17 家系 54 人

（昨年度まで：21 家系 39 人）であった。検査を受けた人数から検査結果未定のものを除いた症例数は 61 人（昨年まで：34 人）

で、この中で遺伝子変異が検出された症例の割合は 46%（昨年度まで：41%）であった。同定された遺伝子変異は GJB2 が最も多く 18 人で全体人名で全体の 21%（昨年度まで：14%）、USH2A が 2 人、WFS1 とミトコンドリア遺伝子変異（1555A>G）が各 1 人である。また、頻度の高い 46 変異に対する一括検査を施行した人数は 46 家系 49 人（昨年度まで：29 家系 30 人）で、このうち 19 家系 20 人（昨年度まで：10 家系 11 人）について遺伝子変異部位が同定され、検査結果が判明したものの中での同定率は 45%（昨年度まで：約 38%）であった。