

#### D. 考察

遺伝子変異は先天性難聴の 60～70%を占める最も多い原因である。それぞれの原因遺伝子の変異の状態に応じて臨床像が異なり、その検査結果は難聴の進行性、変動、聴覚以外の随伴症状についての予測に役立つ。また、遺伝子検査を行うことにより、従来の聴覚検査、画像検査では得られない情報が得られ、聴覚障害に対する介入法の選択（補聴器か人工内耳か）に有用な情報が提供される場合も少なくない。

実際に難聴遺伝子検査を行う際には、得られるメリットとデメリットを患者または患者家族に十分説明する必要がある。正確な情報提供と正確な診断ができてはじめて遺伝子検査が患者にとって有用なものになる。当院では、難聴患者に対して難聴遺伝子検査を行う際に、①患者の臨床経過から難聴の発生において、遺伝子異常の関与の可能性が考えられること②患者または患者家族に対する検査説明を行い、メリットとデメリットの双方に対する理解を十分に得た上で、患者側が検査の施行を希望すること、の 2 つの条件を満たすことを確認している。

本研究で得られた当施設の遺伝子変異同定率は約 45%であり、前年度からの症例数増加とともにほぼ同様、あるいはやや増加している。遺伝子検査件数の増加とともに、遺伝子変異が同定できる病歴、症状などについての経験が蓄積し、先天性難聴者の中でも遺伝子変異に由来する可能性が高い症

例に対して、より積極的に検査を勧める傾向があるのかも知れない。また、当院で同定された遺伝子異常のうち GJB2 が最多であり、SLC26A4 が 2 番目に多く認められた。これも本邦で既に報告されている結果と一致している。

#### E. 結論

難聴の遺伝子検査は、難聴の原因探求と、患者および患者家族における疾患受容、治療や経過観察方針の選択に大きな役割を果たす。また、検査の結果、難聴の原因遺伝子変異が同定できる確率も約45%と高く、本検査の臨床的有用性が再確認された。ただし、引き続き、遺伝子検査の実施や結果の取り扱いには慎重さと正確さ、倫理的配慮に留意が必要である。

#### F. 健康危険情報 総括研究報告書にまとめて記載

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 内藤 泰：治療の観点から見た耳疾患の画像診断. 日本耳鼻咽喉科感染症研究会会誌 31: 179-185, 2013.
2. 内藤 泰、諸頭三郎、山本輪子：当科で手術を行った残存聴力活用型人工内耳症例に関する研究. 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） 新しい人工内耳（EAS）に関する基礎的、臨床的研究 平成24年度総括・分担研究報告書, 研究代表者 山唄達也, 24-29頁, 2013

3. Yamazaki H, Koyasu S, Morot S, Yamamoto R, Yamazaki T, Fujiwara K, Itoh K, Naito Y: HRCT-based prediction for cochlear implant outcomes of cases with inner ear and internal auditory canal malformations. *Cholesteatoma and Ear Surgery (An Update)*, edited by Takahashi H, Kugler Publications, Amsterdam The Netherlands, 371-373, 2013
4. 内藤 泰、諸頭三郎：聴覚領域の検査方向感・両耳聴検査. *JOHNS* 29: 1493-1496, 2013.
5. Iwase 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 Medical Genetics* 2013, accepted for publication.
6. 内藤 泰：小さなcommon cavity例の人工内耳手術。耳鼻咽喉科 てこずった症例のブレイクスルー，本庄 巖編，第1版，株式会社中山書店，東京，74-75頁，2013。（全256頁）
7. Moteki H, Suzuki M, Naito Y, Fujiwara K, Oguchi K, Nishio S, Iwasaki S, Usami S: Evaluation of cortical processing of language by use of positron emission tomography in hearing loss children with congenital cytomegalovirus infection. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 98 : 285-289,2014.
8. 内藤 泰：高度難聴（補聴器、人工内耳）severe to profound hearing loss (cochlear implant, hearing aid). 今日の治療指針2014年版,山口 徹・北原光夫監修,福井次矢・高木 誠・小室一成 編,第1刷,医学書院,東京,1371-1372,2014（全2014頁）
9. Kishimoto I, Yamazaki H, Naito Y, Shinohara S, Fujiwara K, Kikuchi M, Kanazawa Y, Tona R, Harada H: Clinical features of rapidly progressive bilateral sensorineural hearing loss. *Acta Otol* 134: 58-65, 2014.
2. 学会発表
  1. Naito Y: Conflict and cooperation of auditory and visual information processing in profoundly deafened subjects. 20th IFOS World Congress, Seoul, Korea, 2013.6.1-5
  2. Naito Y: Reorganization of cortical language networks in CI users. 20th IFOS World Congress, Seoul, Korea, 2013.6.1-5
  3. Naito Y: Cortical activation by speech in cochlear implant users. 20th IFOS World Congress, Seoul, Korea, 2013.6.1-5
  4. Kishimoto I, Yamazaki H, Shinohara S, Fujiwara K, Kikuchi M, Naito Y: Etiology of 16 cases with rapidly progressive bilateral sensorinerural hearing loss. 20th IFOS World Congress, Seoul, Korea, 2013.6.1-5
  5. Hiraumi H, Nagamine T, Morita T, Naito Y, Fukuyama H, Ito J: Age related cortical change in the effect of amplitude modulation of background noise on

- auditory-evoked fields. 20th IFOS World Congress, Seoul, Korea, 2013.6.1-5
6. 十名理紗,内藤 泰,藤原敬三,篠原尚吾,菊地正弘,金沢佑治,岸本逸平,原田博之: 人工内耳術後の中耳炎例の検討. 第75回耳鼻咽喉科臨床学会,神戸市,2013.7.11-12
  7. 山本輪子,諸頭三郎,藤原敬三,篠原尚吾,菊地正弘,金沢佑治,十名理紗,岸本逸平,原田博之,内藤 泰: 残存聴力型人工内耳 (EAS: electoric acoustic stimulation) の5症例の術後成績. 第174回日耳鼻兵庫県地方部会,神戸市,2013.7.13
  8. 内藤 泰: 「日常外来で遭遇するめまいと難聴疾患」～症例検討と最近の知見～. 奈良県耳鼻咽喉科医会学術講演会,奈良市,2013.10.12
  9. 内藤 泰: 脳機能からみた難聴 (ランチオンセミナー講演). 第58回日本聴覚医学会,松本市,2013.10.24-25
  10. 岸本逸平,篠原尚吾,藤原敬三,十名理紗,諸頭三郎,山本輪子,宇佐美真一,吉村豪兼,内藤 泰: 当科におけるUsher症候群例、難聴遺伝子検査の検討. 第58回日本聴覚医学会,松本市,2013.10.24-25
  11. 諸頭三郎,山本輪子,山崎朋子,十名理紗,藤原敬三,篠原尚吾,内藤 泰: 当科における小児人工内耳術後成績. 第58回日本聴覚医学会,松本市,2013.10.24-25
  12. 山本輪子,諸頭三郎,藤原敬三,篠原尚吾,十名理紗,内藤 泰: 残存聴力活用型人工内耳(EAS: electric acoustic stimulation) の5症例の術後成績. 第58回日本聴覚医学会,松本市,2013.10.24-25
  13. 塚田景大,岩崎 聡,茂木英明,工 穰,西尾信哉,熊川孝三,内藤 泰,高橋晴雄,東野哲也,宇佐美真一: 残存聴力活用型人工内耳 (EAS: electric acoustic stimulation) の聴取能について: 低音部残存聴力との相関. 第58回日本聴覚医学会,松本市,2013.10.24-25
  14. Naito Y: The current status of pediatric cochlear implantation in Japan (InternationalPanel). 第23回日本耳科学会,宮崎市,2013.11.24-26
  15. 岸本逸平,篠原尚吾,藤原敬三,菊地正弘,十名理紗,金沢佑治,原田博之,内藤 泰: common cavity症例における拡大内耳開窓による人工内耳術後の前庭機能評価. 第23回日本耳科学会,宮崎市,2013.11.24-26
  16. 藤原敬三,内藤 泰,篠原尚吾,菊地正弘,金沢佑治,十名理紗,岸本逸平,原田博之: 耳科手術器具の工夫. 第23回日本耳科学会,宮崎市,2013.11.24-26
  17. Naito Y: Update in Pediatric Otolaryngology New born hearing screening and early intervention in Japan(Symposium). The 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery, Taipei, 2013.12.5-12.7
  18. 内藤 泰: Cortical processing of acoustic signals and speech observed by brain imaging(講演). 熊本大学大学院セミナー

一 平成25年度医学・生命科学セミナー  
／D1 “Medicine & Life Science Seminar,  
2013” ,熊本市,2013.12.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

## 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

分担研究者 佐藤 宏昭 岩手医科大学耳鼻咽喉科

共同研究者 小林有美子 岩手医科大学耳鼻咽喉科

### 研究要旨

岩手医科大学では2014年3月までに21例に遺伝学的検査を施行、遺伝カウンセリング（以下、GC）を行ったので、その臨床的な有用性などについて報告する。21例中10例で、難聴の原因と考えられる変異を同定した。*GJB2*複合ヘテロが3例、以下ミトコンドリア3243A>G変異が2例、*SLC26A4*ホモ・*SLC26A4*複合ヘテロ・*SLC26A4*ヘテロが各1例、*GJB2*ホモが1例、*CDH23*複合ヘテロが1例であった。小児高度難聴変異陽性例では全例GC後人工内耳手術を選択し、治療法決定の一助となった。

### A. 研究目的

先天性高度難聴は新生児聴覚スクリーニング（以下、NHS）の導入によって、早期発見が可能となった。これに伴い、補聴器装用にも言語習得が望めない重度難聴に対して人工内耳手術を行うことで、重度難聴児の言語発達が期待できるようになった。また先天性難聴の半数が遺伝性であることが判明し、2012年に保険診療収載となった遺伝子検査が、先天性難聴児の診断治療にいかにも有用に用いていくかが課題となっている。

岩手医科大学では難聴の遺伝学的検査を1997年に研究ベースで（信州大共同研究）行い、両側感音難聴64例のうち14例（21.9%、*GJB2*変異12例（18.8%）、*SLC26A4*2例（3.1%））に変異を同定したが、当時は研究目的ということで、GCを行い治療に結びつけるに至ることはなかった。2011年に岩手

医大臨床遺伝科が開設され、遺伝カウンセリング体制が整い、2012年5月に、保険診療での難聴の遺伝子検査1例目を施行した。2014年3月までに21例に遺伝学的検査を施行、遺伝カウンセリング（以下、GC）を行ったので報告する。

### B. 研究方法

2012年5月から2014年3月までの1年10か月間に、岩手医科大学臨床遺伝科を難聴の遺伝学的検査目的に紹介受診した21例を対象とし、その耳鼻咽喉科的所見、遺伝学的検査結果及びGC後の経過について、カルテ記載からデータ収集し後ろ向きに検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子検査にあたっては当院倫理委員会の承認のもとに行った。採血の際は匿名化を行い、個人情報保護に配慮した。研究対象者に対しては人権擁護上の配慮、研究方法

による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意についてインフォームド・コンセントを行った。

### C. 研究結果

21例の検査時年齢は0-68歳（平均17.3歳）で、成人5例、20歳未満15歳以上3例、10歳以下の小児13例であった。男女比は男性11例、女性10例であった。21例中10例で、難聴の原因と考えられる変異を同定し、2例は結果未到着である。変異陽性例では*GJB2*複合ヘテロが3例と最多で、以下ミトコンドリア3243A>G変異が2例、*SLC26A4*ホモ・*SLC26A44*複合ヘテロ・*SLC26A4*ヘテロが各1例、*GJB2*ホモが1例、*CDH23*複合ヘテロが1例であった(表1)。*CDH23*変異の症例1は保険収載検査では陰性、信州大学の二次解析で変異が同定され、初回検査から1年半後に二度目のGCを行った。

21例のうち、成人5例はいずれも進行性難聴で、うち2例にミトコンドリア3243A>G変異を同定した。

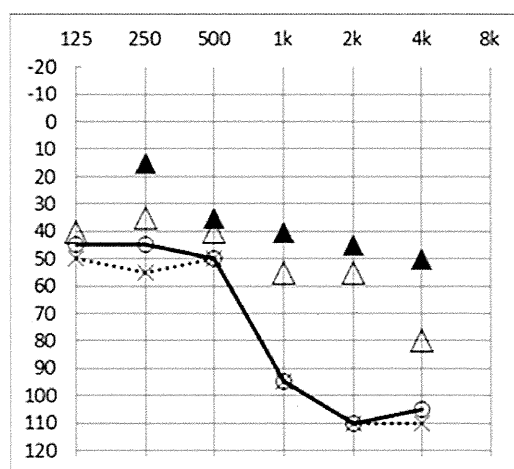
### D. 考察

今回、10歳以下の小児で13例中7例に変異が同定され、内訳は*GJB2*が3例、*SLC24A4*が3例、*CDH23*が1例であった。うち軽度難聴は2例でいずれも*GJB2*であった。重度難聴4例はGC後にすべて、0~4歳で人工内耳埋め込み術を施行しており、自覚的聴力検査閾値が不確かである乳幼児期難聴の治療法選択に有用であったと思われる。

症例1の*CDH23*変異症例(図1)はNHS

表1. 保険収載後の遺伝子検査症例

NO	年齢性別	難聴	変異	GC後の転帰
1	3男	新スク、重度難聴	<i>CDH23</i> 複合ヘテロ*	GC後、人工内耳
2	19女	先天性難聴、DM	<i>GJB2</i> 複合ヘテロ	経過観察
3	39男	進行性難聴	陰性	経過観察
4	47男	進行性難聴、DM	<i>Mt3243</i> 、 <i>SLC26A4</i> ヘテロ	経過観察
5	1女	新スク、重度難聴	<i>SLC26A4</i> 複合ヘテロ	GC後、人工内耳
6	4男	新スクバス、重度難聴	<i>SLC26A4</i> ヘテロ	GC後、人工内耳
7	2女	新スク未、中等度難聴	陰性	HA効果あり、療育継続
8	68女	進行性難聴	陰性	経過観察
9	6男	言語発達遅滞、中等度難聴	<i>SLC26A4</i> ホモ	HA効果あり、療育継続
10	3男	言語発達遅滞、中等度難聴	陰性	HA効果あり、療育継続
11	5女	新スク、軽度難聴	<i>GJB2</i> 複合ヘテロ	HAなしで経過観察
12	43男	進行性難聴、腎不全	<i>Mt3243</i>	人工内耳を待機中
13	18男	母体性遺伝難聴、未発症	陰性	経過観察
14	0女	新スク、重度難聴	<i>GJB2</i> 複合ヘテロ	GC後、人工内耳
15	17女	重度難聴	陰性	経過観察
16	8男	言語発達遅滞、中等度難聴	陰性	HA効果あり、療育継続
17	6女	新スク、軽度難聴	<i>GJB2</i> ヘテロ	HA効果あり、継続
18	5女	言語発達遅滞、中等度難聴	陰性	HA効果あり、継続
19	8女	学校健診、軽度難聴	<i>GJB2</i> ホモ	HA必要性なし、経過観察
20	57男	息子人工内耳、進行性難聴	結果未到着	結果未到着
21	5男	言語発達遅滞、重度難聴	結果未到着	2年前人工内耳手術



△ : 術前補聴器閾値  
 術後オージオグラム : 3歳7か月時  
 ▲ : 術後11か月 CI (EAS) +HA 閾値

図1. 症例1

を契機に難聴が見つかった例であるが、当初からABRとCORの値に乖離を認めており、ABRでは重度難聴を呈するにも関わらず家庭での音への反応が見られるなど、療育施設で診断に苦慮していた。その後CORの値も進行し、補聴器装用効果もはっきりしないため、3歳時、家族がGCを希望した。初回検査では変異が陰性であったが、GC後

聴力残存型人工内耳手術を希望され施行した。術後は補聴器と併用で閾値は概ね良好で、発語のみでのやりとりが増えてきている。CDH23変異の臨床症状は本症例の一般的な経過にほぼ一致するものであり、GCでは難聴発症のメカニズムからも人工内耳が理にかなっていること、対側への今後の治療方針決定にも有用であることを情報提供できた。

#### E. 結論

先天性難聴の遺伝学的検査およびGCでは、変異の種類によってはその治療法の選択または整合性に言及できたり、進行性や合併症の予測が可能できたりする場合がある。今回の小児重度難聴変異症例では全例でGC後に人工内耳手術に踏み切っており、遺伝学的検査が家族に対しても治療法選択の重要な根拠の一つとなりえたことが確認できた。今後もNHSの更なる普及に伴い、低年齢難聴児のGCが増加することが予測されるが、臨床に有用な情報提供とカウンセリングを行って行きたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 佐藤宏昭：急性感音難聴。特集 局所副腎皮質ステロイドの正しい使い方 耳喉頭頸 85 (9) : 664-669, 2013

- 2) 吉村豪兼、岩崎 聡、熊川孝三、小林有美子、佐藤宏昭、福島邦博、福岡久邦、塚田景太、工 穰、宇佐美真一：Usher症候群タイプ1の原因遺伝子と前庭機能評価についての検討。 Equilibrium Res 72(6):467-471, 2013

- 3) 小林有美子、村井盛子、佐藤宏昭、宇佐美真一、岩崎聡、吉村豪兼：アッシャー症候群の5症例。 Otol Jpn 24(1) : 39-43, 2014

##### 2. 学会発表

- 1) 小林有美子、村井盛子、佐藤宏昭、福島明宗、引地勲、宇佐美真一：感音難聴と糖尿病合併症例2例の遺伝カウンセリング経験。 第37回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 平成25年6月20日～23日 (川崎市)

- 2) 小林有美子、佐藤宏昭、村井和夫、村井盛子、岩井詔子、福島明宗、宇佐美真一：岩手医科大学における難聴の遺伝学的検査。 第5回難聴遺伝子の研究会 平成25年7月6日 (東京都)

- 3) 小林有美子、佐藤宏昭、村井和夫、村井盛子、岩井詔子、福島明宗、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 平成25年10月24日 (松本市)

- 4) 吉村豪兼、岩崎 聡、西尾信哉、宇佐美真一、熊川孝三、東野哲也、佐藤宏昭、長井今日子、石川孝太郎、池園哲郎、内藤 泰、福島邦博、中西 啓：

Usher症候群タイプ1における遺伝子検査と耳鼻咽喉科医の役割. 日本聴覚医学会 第58回日本聴覚医学会 平成25年10月24日 (松本市)

5) 小林有美子、村井盛子、佐藤宏昭、中里龍彦：症候性難聴児の検討－聴覚所見と画像診断. 第23回日本耳科学会 平成25年11月24-26日 (宮崎市)

6) 吉村豪兼、岩崎 聡、西尾信哉、宇佐美真一、熊川孝三、東野哲也、佐藤宏昭、長井今日子、武市紀人、石川孝太郎、池園哲郎、内藤 泰、福島邦博、松本 希、中西 啓：Usher症候群タイプ1における次世代シーケンサーの有用性. 第23回日本耳科学会 平成25年11月24-26日 (宮崎市)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## 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

分担研究者 熊川孝三、大多和優理、阿部聡子  
虎の門病院 耳鼻咽喉科・聴覚センター

### 研究要旨

Invader 法では従来の PCR-RFLP 法に比べて、ゲノム DNA から直接に一塩基多型 (SNPs) の解析が可能である。ホモジニアスな反応系で、操作が極めて簡便、臨床検査に堪え得る高い精度と高処理能力の両立が可能であるという利点がある。日本人に特徴的なあるいは頻度の多い遺伝子変異 47 遺伝子を、Invader 解析パネルを用いて網羅的、効果的にスクリーニングする方法は、すでに適切に標準化されており、かつ院内での臨床検査に堪えうる高い精度管理と処理能力の両者を有する検査法であると考えられる。

これにより、難聴の原因診断とそれに対応した予後の推測、合併症の予測、適切な治療戦略の選択とカウンセリングを行うことが可能となった。

特に先天性小児難聴患児に高度難聴を生じる遺伝子変異が見つかった場合、両親がわが子への人工内耳埋め込み手術を、より早期に積極的に受け入れる決断をするのに役立った。公的な保険制度で難聴の遺伝学的検査を行えるわが国の利点を踏まえて、今後、小児人工内耳適応基準などへの組み入れも視野に入れて良いと考える。

### A. 目的

遺伝子変異が関与する難聴の特徴として、症候 (難聴) は一つであるが、関与する遺伝子として、これまでに 100 種類もの変異が報告されている。したがって、ダイレクトシーケンス法でこれらをすべて検索するには時間と経費が必要で、効率も悪いという問題点があった。これに対して、Abe、Usami らが開発した、日本人に高頻度に同定される 13 遺伝子 47 変異の難聴遺伝子を対象にしたインベーターパネルによる解析法を用いて、網羅的、効果的にスクリーニングする方法がある。

当院では当初、信州大学耳鼻咽喉科との共同研究から開始し、先進医療を経て、2012 年の保険診療導入後から現在まで、この方法を用いて、これまでに小児難聴例を中心に解析を行ってきたのでその結果について報告する。

### B. 対象

対象は検査同意を得た先天性難聴と考えられる患者、患児 (代諾者による署名) 発端者ならびに血縁ある難聴者である。2009 年 3 月～ 2012 年 4 月までの先進医療期間、およびこれが保険収載された後の 2012 年 5

月より 2013 年 2 月までの合計 106 例について解析した。

### C. 方法

患者の血液から DNA を抽出し、既知の難聴遺伝子変異として高頻度であることが分かっている 13 遺伝子 47 変異（保険収載後は 46 変異）を対象にインベーターパネルを用いて解析した。採血は耳鼻科外来で採血し、連結可能匿名化を行った。先進医療期間中は当院の臨床検体検査部・遺伝子染色体検査室の同じ技師が検査を行い、同時に BML で当院解析結果との二重チェックを行った。

### D. 結果

対象：2009年3月～2013年10月に検査を受けた発端者ならびに血縁ある難聴者 n=106

変異	例数	小児期発症	成人後発症
<i>GJB2</i> homo	8	7	1
<i>GJB2</i> 複合hetero	19	17	2
<i>SLC26A4</i> homo	2	2	0
<i>SLC26A4</i> 複合hetero	6	6	0
ミトコンドリア 1555A>G	2	0	2
ミトコンドリア 3243A>G	6	1	5
ミトコンドリア 8296A>G	1	1	0
<i>KCNQ4</i>	2	0	2
変異あり	46 (43.4%)	34	12

図 1. 当院での難聴遺伝学的検査の解析結果

表 1 に示したように、常染色体劣性遺伝形式をとる *GJB2* 変異と *ALC26A4* 変異（Pendred 症候群を起こす）では、*GJB2* 変異ホモ 8 例、*GJB2* 複合ヘテロ 19 例、*SLC26A4* ホモ 2 例、*SLC26A4* 複合ヘテロ 6 例、ミトコンドリア変異では *mit1555A>G* 2 例、同 *3243A>G* 6 例、同 *8269A>G* 1 例、優性遺伝形式では *KCNQ4* 2 例の計 60 例について難聴を引き起こす変異が検出された。

変異検出症例数は 106 例中 46 例であり、検出率は 43.4% であった。これは、従来想定されていた遺伝子変異による難聴よりも高頻度であった。

先進医療期間中は BML での二重チェックを行ったが、結果の不一致は認められなかった。

### E. 結論

Invader 法では従来の PCR-RFLP 法に比べて、ゲノム DNA から直接に一塩基多型（SNPs）の解析が可能である。ホモジニアスな反応系で、操作が極めて簡便、臨床検査に堪え得る高い精度と高処理能力の両立が可能であるという利点がある。日本人に特徴的なあるいは頻度の多い遺伝子変異 47 遺伝子を、Invader 解析パネルを用いて網羅的、効果的にスクリーニングする方法は、すでに適切に標準化されており、かつ院内での臨床検査に堪えうる高い精度管理と処理能力の両者を有する検査法であると考えられる。

これにより、難聴の原因診断とそれに対応した予後の推測、合併症の予測、適切な治療戦略の選択とカウンセリングを行うことが可能となった。

特に先天性小児難聴患児に高度難聴を生じる遺伝子変異が見つかった場合、両親がわが子への人工内耳埋め込み手術を、より早期に積極的に受け入れる決断をするのに役立った。公的な保険制度で難聴の遺伝学的検査を行えるわが国の利点を踏まえて、今後、小児人工内耳適応基準などへの組み入れも視野に入れて良いと考える。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究成果の刊行に関する一覧表

### 1. 著書

熊川孝三(分担執筆)今日の小児治療指針(大関武彦ら総編集)第15版 感音難聴(人工内耳、補聴器) pp823~824、2012年2月

熊川孝三(分担執筆) : 言語聴覚士テキスト第2版 X 聴覚障害学 3人工内耳 廣瀬肇 監修 小松崎篤ら編 医師薬出版株式会社 pp. 324~331, 2011.

### 2. 原著論文・総説

*Takehiko Naito1, Shin-ya Nishio1, Yoh-ichiro Iwasa1, Takuya Yano1, Kozo Kumakawa2, Satoko Abe2, Kotaro Ishikawa3, Hiromi Kojima4, Atsushi Namba5, Chie Oshikawa6, Shin-ichi Usami1 :*

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.

doi:10.1371/journal.pone.0063231

Published: May 23, 2013)

*Yoh-ichiro Iwasa1, Shin-ya Nishio1, Hidekane Yoshimura1, Yukihiko Kanda2, Kozo Kumakawa3, Satoko Abe3, Yasushi*

*Naito4, Kyoko Nagai5 and Shin-ichi Usami :*

OTOF mutation screening in Japanese severe topofound recessive hearing loss patients.

BMC Medical Genetics 2013, 14:95 Published: 22 September 2013(online journal)

*Cordula Matthies a, Stefan Brill b, Kimitaka Kagac, Akio Morita d, Kozo Kumakawae, Henryk Skarzynskif, Andre Claasseng, Yau Huih, Charlotte Chiongi, Joachim Müller j, Robert Behr k :*

Auditory Brainstem Implantation improves Speech Recognition in Neurofibromatosis Type II Patients ORL75:282–295, 2013.

*Hidekane Yoshimura1, Satoshi Iwasaki2,3, Shin-ya Nishio1, Kozo Kumakawa4, Tetsuya Tono5, Yumiko Kobayashi6, Hiroaki Sato6, Kyoko Nagai7, Kotaro Ishikawa8, Tetsuo Ikezono9, Yasushi Naito10, Kunihiro Fukushima11 :*

Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1

PLoS ONE 9(3) e90688 Published: March 11, 2014 DOI:

10.1371/journal.pone.0090688

熊川孝三、三澤建、松田絵美、真岩智道、鈴木久美子、加藤央、武田英彦：新生児聴覚スクリーニングの偽陽性率を減らすための試行制度の検討.Audiology Japan 56:163-170, 2013.

田中美郷、芦野聡子、小山由美、針谷しげ子、熊川孝三、武田英彦：人工内耳を装用させた自閉症スペクトラム障碍及び重度知的障碍を伴う難聴児の発達経過.Audiology Japan 56:153-162, 2013.

三澤建、熊川孝三、加藤央、武田英彦：人工内耳埋め込み術を施行した蝸牛型耳硬化症およびvan der Hoeve症候群の長期成績と当院における治療戦略.Otol Japan 23:841-87, 2013.

今井直子、熊川孝三、安達のどか、浅沼総、大橋博文、坂田英明、山嵜達也、宇佐美真一：GJB2変異例における進行性難聴の特徴と遺伝子型の検討.小児耳鼻咽喉科 34:352-359, 2013.

岩崎 聡、吉村豪兼、武市紀人、佐藤宏昭、石川浩太郎、加我君孝、熊川孝三、古屋信彦、池園哲郎、中西 啓、内藤 泰、福島邦博、東野哲也、君付 隆、西尾信哉、工藤、宇佐美真一：Usher症候群の臨床的タイプ分類の問題点と課題 日本耳鼻咽喉科学会会報 115: 894-901, 2012.

熊川孝三、武田英彦：

高音急墜型難聴フィルタを介した日本語と英語文の聴取成績の比較。

—EAS型人工内耳の適応基準への提言—  
耳鼻臨床 補132:13-19, 2012.

熊川孝三：アブミ骨手術—難易度が高い症例に対する手術— 頭頸部外科 22:127-132, 2012.

### 3. 学会報告

坂田阿希\*、熊川孝三、阿部聡子、宇佐美真一、山嵜達也：GJB2 と SLC26A4 の複合ヘテロ遺伝子変異が見出された先天性難聴の一家系.第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会,2013.10.24.

熊川孝三、熊谷文愛、射場恵、三澤建、阿部聡子、真岩智道、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 回日本聴覚医学会総会・学術講演会,2013.10.24.

三澤建、熊川孝三、阿部聡子、松田絵美、真岩智道、加藤央、武田英彦、宇佐美真一：当院におけるインバータパ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 回日本聴覚医学会総会・学術講演会,2013.10.24.

吉村豪兼、岩崎聡、西尾信哉、宇佐美真一、熊川孝三、東野哲也、佐藤宏昭、長井今日子、石川浩太郎、池園哲郎、内藤泰、福島邦博、中西啓:Usher 症候群タイプ 1 における遺伝子検査と耳鼻咽喉科医の役割.第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会,2013.10.24.

塚田景大、岩崎聡、茂木英明、工藤、西尾信哉、熊川孝三、内藤泰、高橋晴雄、東野哲也、宇佐美真一:残存聴力活用型人工内耳(EAS: electric acoustic stimulation)の聴取能について:低音部残存聴力との相関.第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会,2013.10.25.

射場恵、熊谷文愛、加藤央、鈴木久美子、武田英彦、熊川孝三:片側外耳道閉鎖例と片側高度感音難聴例における埋め込み型骨導補聴器(BAHA)の装用効果.第 57 回日本聴覚医学会 2012 年 10 月 11,12 日 京都

加藤央、武田英彦、熊川孝三:神経線維腫症第 2 型における人工内耳と聴性脳幹インプラント治療の比較.第 22 回日本耳科学会奨励賞受賞者講演 2012 年 10 月 4, 5, 6 日 名古屋

岩佐陽一郎<sup>1)</sup>、吉村豪兼<sup>1)</sup>、宇佐美真一<sup>1)</sup>、熊川孝三<sup>2)</sup>:日本人高度感音難聴者における OTOF 遺伝子変異の検討。1) 信州大学耳鼻咽喉科、2) 虎の門病院耳鼻咽喉科

第 113 回日本耳鼻咽喉科学会 2012 年 5 月 9~12 日 新潟市

熊川孝三、武田英彦、鈴木久美子、加藤央、今井直子、真岩智道、三澤建:鼓室型先天性真珠腫の耳内法アプローチ.第 113 回日本耳鼻咽喉科学会 2012 年 5 月 9~12 日 新潟

今井直子<sup>1)</sup>、熊川孝三<sup>1)</sup>、安達 のどか<sup>2)</sup>、浅沼 聡<sup>2)</sup>、坂田 英明<sup>3)</sup>、山嵜 達也<sup>4)</sup>、宇佐美 真一<sup>5)</sup>

1) 虎の門病院 耳鼻咽喉科 2) 埼玉県立小児医療センター 耳鼻咽喉科、3) 目白大学 保健医療学部 言語聴覚学科、4) 東京大学 医学部 耳鼻咽喉科、5) 信州大学 医学部 耳鼻咽喉科  
難聴の進行を認めた *GJB2* 遺伝子変異の 4 例。第 7 回小児耳鼻咽喉科学会 2012 年 6 月 21, 22 日 岡山

ry implant at Gaungzhou (広州) 2009 年 9 月 21 日 中国 広州

## H. 知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

## 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

研究分担者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター感覚器センター  
聴覚障害研究室 室長

研究協力者 務台英樹 同 研究員

研究協力者 難波一徳 同 研究員

### 研究要旨

遺伝性難聴の原因遺伝子は非症候群性難聴だけでも70種類以上あり、さらに鑑別を要する症候群性難聴遺伝子も多数ある。そして非症候群性難聴の約80%が劣性遺伝であるため、少子化が進む日本では遺伝性難聴は孤発例として認められる場合が多い。本研究では、孤発例の先天性難聴家系を対象とし、次世代シーケンサー（NGS）を用いた難聴遺伝子84種類の網羅的解析を実施し、稀少難聴遺伝子*MYO15A*変異を同定した。また従来のサンガー法と比較し変異検出が直観的で明確であることも明らかにした。NGSにより、孤発例であっても頻度が低く、臨床的特徴の乏しい難聴遺伝子に変異を見つけることが可能であることを明らかにした。

### A. 研究目的

難聴の原因遺伝子は、非症候群性難聴だけでもこれまでに70種類以上報告されており、いまなお増え続けている。

(Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://hereditaryhearingloss.org>)。症候群性難聴の中には、乳幼児期は難聴以外の症状がないため非症候群性難聴との鑑別が困難なPendred症候群やUsher症候群などもあり、乳幼児の非症候群性難聴の原因には、このような症候群性難聴の原因遺伝子も考慮する必要がある。このように遺伝性難聴では極めて多数かつ多様な原因遺伝子があることが他の遺伝性疾患と異なる際立った特徴である。一方、GJB2, SLC26A4など一

部の難聴遺伝子の原因頻度は非常に高いことが知られ、保険診療として実施している10遺伝子47変異のみの検査でも診断率が30%に上る。

診断を目的とした難聴遺伝子検査を行う上では、上述の保険検査における比較的頻度の高い遺伝子の特定の変異検査に加え、臨床的特徴から可能性があると推測される遺伝子を一部あるいは組み合わせて解析することで、さらに原因同定率を上げることが可能となる。我々の施設における2012年までの10年間の原因不明の難聴者での成績を図1に示す。原因診断の確率をさらに高めるためには、既知の多くの（できれば全ての）難聴遺伝子を短時間で経済的に調べる

ことができる検査方法が望まれる。

本研究は、ゲノム上の特定の領域にターゲットを絞り次世代シーケンサー（NGS）で解析するターゲットリシーケンシング技術を用いて、遺伝性疾患の効率的・網羅的ゲノム解析法を確立し、その有効性を従来のサンガー法と比較検討することを目的とした。

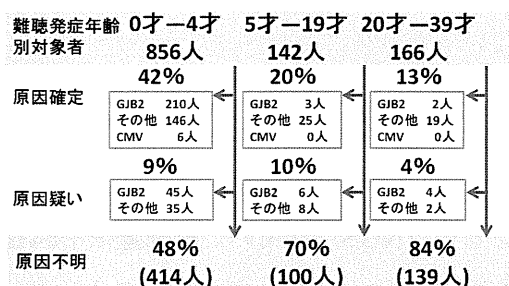


図 1. 難聴発症年齢別の原因同定率

## B. 研究方法

解析検体には、遺伝性難聴を疑われ、難聴遺伝子の病的変異が同定されておらず、保険診療で検査対象となる GJB2、ミトコンドリア遺伝子に変異が見られない、先天性・非症候群性難聴孤発例および両親を用いた。妊娠中に問題なし。出産時に胎便あり緊急帝王切開にて出生（40 週、3070 g）。出産後の経過にも問題なし。新生児聴覚スクリーニングは受けていなかった。4 ヶ月検診で音への反応が乏しいことを指摘されて最寄りの総合病院を紹介され、そこで実施された ABR で両耳とも 80dBnHL で V 波閾値を検出できなかった。鼓膜、外耳道、耳介、頭頸部、それ以外の身体に視診上で異常を認めなかった。難聴以外には健康上の問題はなく、運動発達にも遅れを認めて

いなかった。

解析対象となる遺伝子は、常染色体性優性または劣性の非症候群性難聴遺伝子として同定されている遺伝子 61 種、症候群性難聴の原因遺伝子 23 種、の合計 84 遺伝子の蛋白質コーディング全領域のゲノム遺伝子配列をデータベースより抽出し、アジレント社製 SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムのカスタムライブラリーを設計した。

解析検体は、各過程で厳密に品質を管理しながら、Covaris 社製超音波破碎機による約 150bp への断片化、ベックマン社 AMPure 磁性ビーズによる精製、SureSelect ターゲットエンリッチメントライブラリーによる各検体の解析対象となる難聴遺伝子領域の濃縮、インデックスタグの付加と増幅を行い、イルミナ社製 NGS（Miseq）を用いて塩基配列データを創出した。品質チェックを経て参照ゲノム DNA 配列上へのマッピングを行い、解析プログラム AvadisNGS を用いて、検体毎に信頼性の高い遺伝子変異を検出した。

このうち、公的データベース、研究室で独自に収集したデータベースとも比較し、健常者にも頻度が高く存在する非病的遺伝子多型であるかどうか、アミノ酸配列変異を与えるか、たんぱく質立体構造に変化をもたらす可能性があるか、家系図と比較し遺伝形式に矛盾がないかなどの項目により、候補遺伝子病的変異を絞り込んだ。各変異は従来用いられてきたサンガー法により、遺伝子変異を確認した。

(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。

### C. 研究結果

上記の各解析手法による絞り込みの結果、患者検体において、*MYO15A*の複合ヘテロ変異（2つの欠損変異）が病的変異候補として見出された（図2）。サンガー法による解析を実施すると、患者では一見[ヘテロのミスセンス変異+ホモの欠損変異]という、誤った結果となり、両親の解析を実施することで、初めて明確な変異同定が可能となった（図3）。

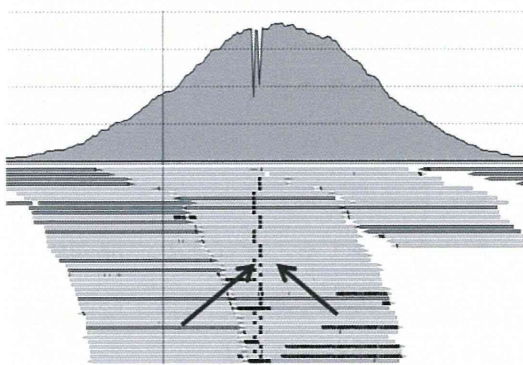


図2. NGSで検出された複合ヘテロ変異（矢印）

*MYO15A* タンパク質は有毛細胞 stereocilia 先端に局在し、他のタンパク質と相互作用し stereocilia 伸長に寄与していることが知られる。今回見出された二つの新規変異は、いずれも *MYO15A* 中のタンパク質相互作用部位 FERM ドメインに位置していた。本変異により FERM ドメイン

が構造変化をおこし、これが他分子との結合を阻害し、stereocilia 伸長が阻害されたことが難聴の分子病態として推測された（図4）。

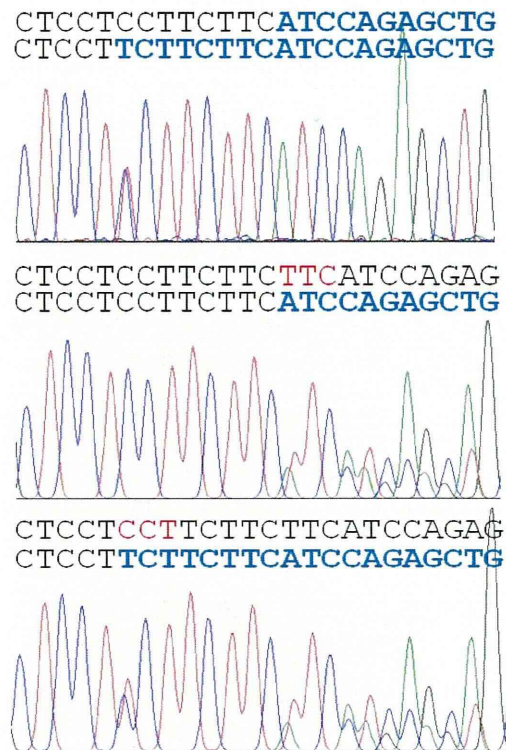


図3. サンガー法による患者(上)、父親(中)、母親(下)の変異解析結果

### D. 考察

*MYO15A* は常染色体劣性遺伝の非症候群性難聴 DFNB3 の原因遺伝子である。本遺伝子により作られる myosinXVA タンパク質は、他のタンパク質と結合して蝸牛有毛細胞の stereocilia の発生と維持に重要な役割を果たしている。動物モデルでの研究から、本遺伝子の変異がホモあるいは複合ヘテロで存在すると、stereocilia の形態が異常となり、難聴を呈することが知られている。これまでに報告された本遺伝子変異



による難聴例は、多くが先天性、非進行性の高度あるいは重度の感音難聴である。これらの特徴は、今回検討された難聴児の特徴とも合致していた。

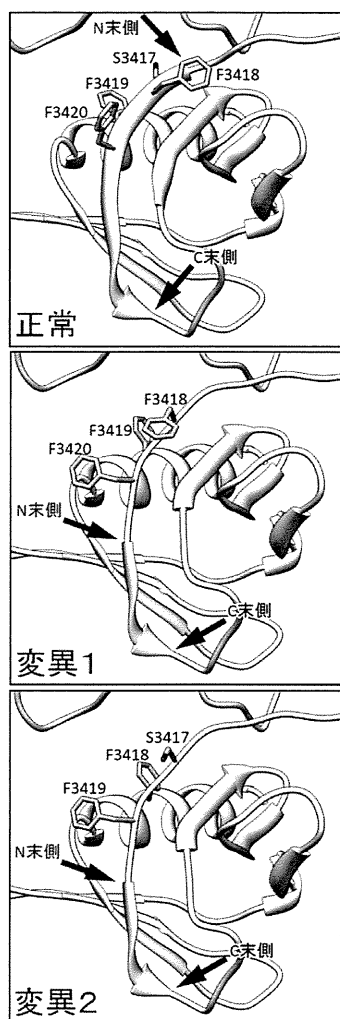


図 4. *MYO15A* FERM ドメイン立体構造の変異予測 (上より正常、変異1、変異2)

*MYO15A* は 66 エクソンからなる非常に大きな遺伝子であり、また本遺伝子変異による難聴には特異的な特徴が乏しいため、これまでは難聴者のサンガー法を用いた遺伝子検査で同定することは困難であり、日本人臨床像の詳細は不明であった。労力・費用から考えて、NGS による網羅的難聴遺

伝子解析が診断法として有効と考えられた。

また、本検体における複合ヘテロ変異が、NGS 解析においては患者 1 検体の解析結果から明確に示されているのに対し、従来のサンガー法を用いる場合、変異の正確な把握には両親を含めた 3 検体すべての解析が必要であった。NGS 解析は変異の同定・遺伝形式の解釈においてもサンガー法よりも直観的であり、明確である場合があると考えられた。

今後のNGSによる遺伝子検査の積み重ねにより、様々な低頻度の難聴遺伝子の病態や臨床像の解明が進んでいくと考えられた。

## E. 結論

NGS を用いた既知の難聴遺伝子の網羅的解析により、稀少難聴遺伝子 *MYO15A* 変異が原因と推測される日本人難聴児の臨床像を明らかにできた。明確な遺伝形式をもたない孤発例難聴者においても、NGS 遺伝子解析を実施することにより、原因候補の絞り込みが可能であり、遺伝子診断率が向上する可能性が示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

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

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

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

松永達雄、藤岡正人、細谷誠. Pendred症候群研究の現況と展望 *日本臨牀* 2013;

71(12): 2215-2222

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

## 2. 学会発表

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

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

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

松永達雄、藤岡正人、加我君孝. 次世代シー  
クエンシングで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

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

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表