

図2 ヒト内耳の形態と画像所見

- a. 内耳と前庭水管の模式図。(Diagram of the inner ear, NIDCD, NIH. [http://www.nidcd.nih.gov/health/hearing/pages/pendred.aspx#what]より改変)
 b. 前庭水管拡大のCT画像。中間径を白線(1)、中頭蓋窩開口部径を白線(2)で示した。

本症候群に対する根本的治療法はまだなく、対症療法あるいはリハビリテーションが行われている。慢性化した難聴に対しては、補聴器や人工内耳を用いた言語聴覚リハビリテーションが行われる。難聴の急性増悪に対しては、入院、安静、ステロイドの点滴あるいは経口投与が行われる。めまいに対しては難聴に対する治療と並行して抗めまい薬投与が行われ、甲状腺腫に対しては適量のヨード摂取と、著しく腫大した場合は甲状腺全摘出術が行われる。甲状腺ホルモンが低下する患者はごく一部のみであるが、その場合は甲状腺ホルモンの内服を継続する。甲状腺の腫大の抑制のための予防的甲状腺ホルモン投与を行う場合もある。Pendred 症候群に対しては劣性遺伝に基づく遺伝カウンセリングが可能である。

2. 分子遺伝学的原因と症状

SLC26A4 遺伝子の変異は現時点で170種類以上報告されており、その変異の種類の特徴と頻度は人種によって大きく異なる。例えば白人

では、p.L236P, p.T416P, IVS8+1G→Aの頻度が高いが、我が国ではp.H723Rの頻度が高い。報告されている大多数の変異はミスセンス変異で、ついでアミノ酸の欠失や挿入、スプライス部位変異、ナンセンス変異とフレームシフト変異の順に頻度が高い。前庭水管拡大を伴う難聴者での、*SLC26A4* 遺伝子変異の頻度も人種により大きく異なる。白人では、変異を2アレルもつ場合が約25%、1アレルの場合が約25%、0アレルの場合が約50%である⁷⁾。一方、我が国では前庭水管拡大を伴う難聴者の大多数で*SLC26A4* 遺伝子変異を2アレルもつ⁸⁾。これまでに著者らの施設で前庭水管拡大あるいは拡大疑いの約100例で*SLC26A4* 遺伝子を解析した結果も同様であった。

遺伝子型と表現型の検討から、*SLC26A4* 遺伝子の変異を2アレルで認める場合はPendred 症候群となり、1アレルまたは0アレルの場合はDFNB4になると報告されている。しかし、変異を2アレルで認める場合でもDFNB4になるという報告もあり、まだ確定していない^{8,9)}。

この点を確定できない理由として幾つかの問題点が存在している。まず、DFNB4の患者で発見された変異が本当に難聴の原因となっているかは、細胞実験で機能解析まで行わないと確定できないことが一つの理由である。実際に、DFNB4で報告された変異が、後に行われた機能解析で難聴との関係が否定された例も多い。また、甲状腺腫の有無およびパークロレート放出試験の方法や陽性と陰性の判断基準が統一されていないこと、パークロレート放出試験は偽陽性あるいは偽陰性の結果を呈しやすいこと、*SLC26A4* 遺伝子変異と関係しない甲状腺疾患の鑑別が十分でないことなども、遺伝子型と表現型の関係を解明する障害となっており、今後の研究の重要な課題である。

近年、Pendred 症候群の新たな原因遺伝子として、*FOXI1* 遺伝子と *KCNJ10* 遺伝子が報告された^{10,11)}。*FOXI1* 遺伝子は *SLC26A4* 遺伝子の発現調節に働く転写因子であり、*FOXI1* 遺伝子変異と *SLC26A4* 遺伝子の2重ヘテロ接合体が本症候群患者で報告されている。また、本症候群患者では *SLC26A4* 遺伝子の上流に存在する *FOXI1* 遺伝子の結合部位の変異のヘテロ接合体も報告されている。*KCNJ10* 遺伝子は蝸牛で発現しているカリウムチャンネルで、正常の聴覚に必要である内リンパ電位の形成に働いている。また、*SLC26A4* 遺伝子のノックアウトマウスでは、この *KCNJ10* 遺伝子の発現が消失して、そのため難聴になると考えられている。そして実際に、Pendred 症候群の患者で *KCNJ10* 遺伝子と *SLC26A4* 遺伝子の2重ヘテロ接合体が報告されている。しかしこれらの変異は、これまでにそれぞれ1研究グループからの報告しかないので、原因遺伝子と確定するためには今後の更なる検討が必要な状況にある。

3. *SLC26A4* 遺伝子変異の機能解析

SLC26A4 遺伝子変異の種類と甲状腺腫の発症の関係を解明する初めての研究として、変異遺伝子を導入したアフリカツメガエルの卵母細胞で I⁻と Cl⁻の取り込みの研究が行われた。この研究では、DFNB4で認められた変異では機

能の部分的残存が認められ、Pendred 症候群で認められた変異では機能が消失しており、この違いで甲状腺腫の発症の有無が説明されると報告された。しかし、Pendred 症候群と DFNB4で同じ変異が認められることが後に報告されて、この関係は現在では否定されている⁸⁾。その後、*SLC26A4* 遺伝子変異の機能解析の方法が進み、ヒト細胞の使用、極性のある哺乳類細胞の使用、蛍光タンパク質の使用、細胞内局在の検討、I⁻/Cl⁻交換輸送と Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送の検討が取り入れられて、多くの *SLC26A4* 遺伝子変異が検討された。この結果、現在ではタンパク質切断型の変異(ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライス部位変異など)とプロリンのミスセンス変異では機能消失が原則として生じることが解明されている¹²⁾。一方、正常コントロールでの頻度が低い、動物種を越えて保存されているという根拠でこれまでミスセンス変異と判断されていた複数の変異(p.F354S, p.K369E, p.L597Sなど)が、機能解析でPendred 症候群に関係しない変化(single nucleotide polymorphism: SNP)であることも判明している。現在、このようなSNPが継続的に報告されている状況にあり、アメリカのNational Center for Biotechnology Information (NCBI)のデータベースのdbSNPsで確認できる。このため、*SLC26A4* 遺伝子検査で新規ミスセンス変異を疑った場合には、機能解析の結果を得てから結論を出すことが望ましいと考えられている。

4. *SLC26A4* 遺伝子変異による難聴の分子病態

SLC26A4 は1997年に、Pendred 症候群の原因遺伝子として同定された²⁾。*SLC26A4* がコードするタンパク質が、PENDRINである。PENDRINは生体内においてアニオントランスポーターとして機能し、主に Cl⁻, I⁻, HCO₃⁻, 蟻酸の輸送にかかわっている(図3)。PENDRINは、様々な臓器に発現していることが知られており、甲状腺、内耳のほかにも、腎臓、子宮、乳腺、絨毛などに発現することが知られている。発現部位の違いによって機能は異なり、PENDRINは内

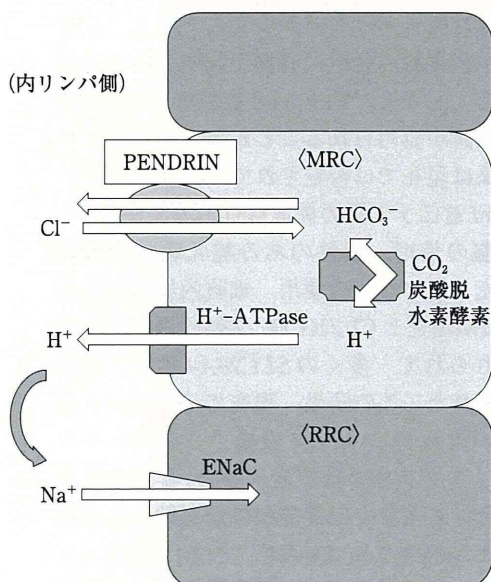


図3 内リンパ嚢に発現するPENDRINの機能の模式図(文献¹⁴⁾より改変)

mitochondria-rich細胞(MRC)の内リンパ側に発現するPENDRINは、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換輸送に関与し、その機能低下により細胞内に HCO_3^- が蓄積すると細胞内炭酸脱水素酵素の機能阻害が生じ、最終的に細胞外にこみ出される H^+ の産生が阻害される。この H^+ は内リンパ側からのナトリウムの取り込みを電気的に駆動しており、最終的にこのナトリウム取り込みが阻害されることが内リンパ水腫の一因となると考えられている。

耳においては、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ の交換輸送、甲状腺においては、 Cl^-/I^- の交換輸送に主に働いている。

PENDRINは内耳においては、内リンパ嚢、蝸牛外らせん溝細胞および外側壁において発現がみられ、前庭でも一部発現していることが知られている。同遺伝子の変異モデルとして、*Slc26A4*^{-/-}マウスが作製されており¹³⁾、同マウスの解析により、*Slc26A4*の変異が内リンパ水腫と蝸牛管の拡大とそれに伴う蝸牛内静止電位の消失、内リンパの酸性化とカルシウム濃度の上昇を起こして難聴をきたすと考えられている。この難聴のメカニズムに主にかかわっているのは、内リンパ嚢に発現しているPENDRINと考えられている。内リンパ嚢においてはmitochondria-rich細胞(MRC)とribosomal-rich細胞(RRC)の2種類の細胞が存在する。MRCに存在する H^+ -ATPaseにより作られる電

位差により、RRCにおいて Na^+ の吸収が促進されている。PENDRINはこのうちMRCに存在し、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 対向輸送にかかわっている。同細胞内の炭酸脱水素酵素によって作られる HCO_3^- の細胞外への排出を促進することで、同酵素によって作られ H^+ -ATPaseによって内リンパ中に輸送される H^+ の合成を促進している。このため、PENDRINの機能低下はMRCからの H^+ の内リンパ中への輸送を阻害し、RRCにおける内リンパ中からの Na^+ の吸収障害を招き、結果として内リンパ水腫および蝸牛管の拡大をきたし¹⁴⁾、細胞間伝達を阻害することで正常聴力の発達を阻害すると考えられている。内リンパ水腫に伴う蝸牛管の拡大は、蝸牛内静止電位を維持するためのKチャンネル(Kcnj10)への負荷を増大し、Kcnj10の減少をもたらす(後述)。結果、蝸牛内静止電位の消失とそれに伴う聴力障害を生じる¹⁵⁾。また、PENDRINの機能低下により内リンパの酸性化と Ca^{2+} の濃度上昇が生じ、内耳有毛細胞の機能低下が生じ、難聴が生じると考えられている。

5. *SLC26A4* 遺伝子変異による甲状腺腫の分子病態

PENDRINは甲状腺においては、濾胞細胞の濾胞面に発現し、甲状腺濾胞内へのヨウ素輸送にかかわっていると考えられている(図4)。甲状腺濾胞細胞においては、濾胞面と対側の細胞外から Na^+/I^- 共輸送体(NIS)により I^- は細胞内に取り込まれるが、この取り込まれた I^- の濾胞内への輸送にかかわっているのがPENDRINとされている。NISや甲状腺ホルモン合成に必須の酵素(TPOなど)、甲状腺のホルモン合成を調整するシグナル系(甲状腺刺激ホルモンおよび甲状腺刺激ホルモン受容体)の異常においては生下時から甲状腺機能低下が生じ、特に甲状腺ホルモン合成にかかわる酵素の場合は、甲状腺腫の形成は生後より著明である。しかし、Pendred症候群においては、そのような生後すぐの甲状腺機能低下と甲状腺腫の形成はみられない。また、内耳と異なり、*Slc26A4*^{-/-}マウスは、甲状腺では表現型を示さないことから、

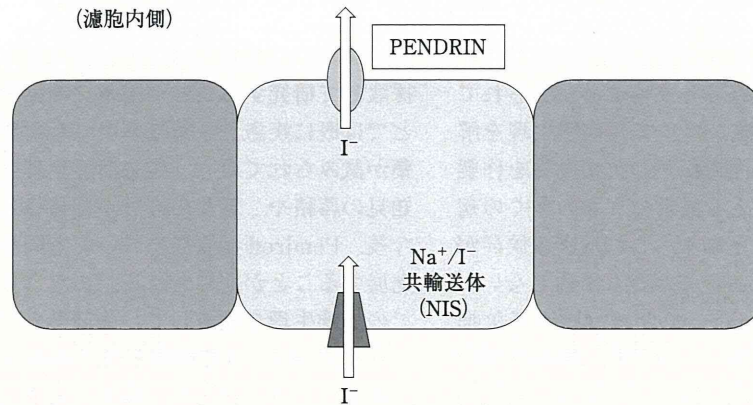


図4 甲状腺に発現する PENDRIN の機能の模式図 (文献¹⁶⁾より改変)
濾胞細胞の濾胞面に発現する PENDRIN は、甲状腺濾胞内へのヨウ素輸送にかかわっている。PENDRIN は細胞外から Na^+/I^- 共輸送体 (NIS) により細胞内に取り込まれた I^- の濾胞内への輸送を行っていると考えられている。

PENDRIN は甲状腺ホルモン合成には必ずしも必要ではないと考えられており、特にヨウ素の供給が豊富なときはその果たす役割は小さいと考えられている¹⁶⁾。しかしながら、その研究は進んでおらず知見の集積は不十分である。

6. *FOXI1* 遺伝子変異と *KCNJ10* 遺伝子変異の分子病態

前述のように、これまでに *SLC26A4* のほかに Pendred 症候群の病態にかかわる遺伝子として *FOXI1* と *KCNJ10* が報告されている。Foxi1 は、PENDRIN のプロモーター領域に結合し、転写を促進することが知られている。Foxi1 null マウスの解析により、マウスにおいて、内リンパ嚢の PENDRIN の発現が消失し、*Slc26A4*^{-/-} マウスと同様に内リンパ水腫と難聴をきたすことが知られている¹⁷⁾。このマウスにおいては、蝸牛と前庭での PENDRIN の発現は維持されているにもかかわらず内リンパ水腫と難聴が生じ、この知見からも PENDRIN の発現部位における病態への関与の違いが示唆される。実際にヒトにおいて、*FOXI1* と *SLC26A4* の二重ヘテロ変異による Pendred 症候群の報告があることは、先に記したとおりである。

KCNJ10 は、蝸牛外側壁血管条に発現し、蝸牛静膜電位維持にかかわるカリウムチャンネル

である。*KCNJ10* は PENDRIN と異なる細胞に発現し、その発現は *SLC26A4* 変異に直接依存しないが、*Slc26A4*^{-/-} マウスにおいて発現が減少することが知られている。前述のように *Slc26A4*^{-/-} マウスにおいては内リンパ水腫が生じ、外側壁に対する内リンパの体積の比が上昇する。したがって内リンパの静止電位を保つためには通常の場合より多くの負荷が蝸牛外側壁のカリウムチャンネル発現細胞にかかり、より多くの ATP 産生を必要とする。その結果、フリーラジカルストレスにより *KCNJ10* の発現が低下して蝸牛内静止電位は保てなくなり、難聴をきたすと考えられている¹⁵⁾。ヒトにおいても *FOXI1* と同様に、*KCNJ10* と *SLC26A4* の二重ヘテロ変異によって Pendred 症候群が生じることも先に記したとおりである。

7. 疾患モデルの研究

疾患の病態生理を理解し将来の治療法を検討する目的で、一般に動物モデルが汎用されており、遺伝子異常が明らかにされている疾患では、発生工学を用いて変異を導入した齧歯類を作製し個体レベルでの機能を観察することがしばしば行われる。Pendred 症候群/DFNB4 では前述のように 170 種類もの変異が報告されているが、代表的な変異タンパクの解析から、その多くは

細胞質で分子シャペロンを介して三次元構造を形作る段階で分解されてしまうことが知られている¹⁸⁾。すなわち組織レベルでの病態生理を解析するうえで、原因遺伝子の欠損動物を作製することで170を超える異常のうちの多くの病態を理解しうることとなる。これは本症候群が常染色体劣性遺伝であることとも矛盾しない。上述のように *Slc26A4*^{-/-}マウスではホモ欠損で臨床症候と同様に内リンパ水腫、蝸牛内電位の低下とそれに伴う聴力低下を認める¹³⁾。その発生機序は直接的にはトランスポーターとしてのイオン交換機能異常による蝸牛内の酸性化と内リンパ水腫だが、多くの研究から、細胞同士の接着が水腫によって傷害されること、そのために炎症反応が誘導されること、血管条での活性酸素の発生とそれによる蝸牛内電位の低下が生じることが二次的な障害の原因として明らかになっている^{11,14,17,19)}。また *Slc26A4*^{-/-}マウスに対して遺伝子改変技術によりその機能を一定の期間レスキューする実験系での報告によれば、胎生16.5日目から生後2日目でのPENDRINの機能が聴力獲得に必須であり、症候の完全なコントロールには早期からの治療が必要であることが示唆されている²⁰⁾。

Pendred症候群の内耳における分子生物学的知見は、疾患をもつヒトの内耳を研究することができないため、主に上述した *Slc26A4*^{-/-}マウスの解析と *in vitro*でのヒト細胞株への変異PENDRINの強制発現によって進められてきたが、種間での違いや、腫瘍化した培養細胞株と本来の内耳の細胞との相違から、これらの手法には原理的に限界があることも指摘されてきた。また、Pendred症候群の難聴は様々な経過を示すことから、環境による影響に加えて個体差があることが想定され、病態生理の検討のための新規アプローチが求められている。近年山中らにより樹立されたリプログラミングの技術により、患者由来の疾患特異的iPS細胞を樹立し、検討したい細胞をiPS細胞から分化誘導する時

代が訪れつつある。内耳と同様にヒト生体から採取して研究することが困難な中枢神経領域などでは既に疾患iPS細胞を用いた疾患研究と創薬が試みられており、疾患病態生理への新しい知見の蓄積や、新薬の開発が期待されている。今後、Pendred症候群についても同様の研究が進展することが期待される。また、個別の患者での病態生理を検討して、薬剤への反応性をあらかじめ *in vitro*で確認してから投薬する、いわゆるテーラーメイド医療も期待される。

おわりに

筆頭著者が小児難聴例の画像検査で初めて家庭水管拡大に遭遇したのは2000年6月であった。当時4歳であったその難聴児は、聴力の変動があり、低音域に伝音難聴を示唆する気導閾値と骨導閾値の差があり、実際に中耳炎の合併も繰り返していたため、それまで難聴の評価と治療にたいへん苦慮していた。その後、遺伝子検査により *SLC26A4* 遺伝子変異が判明したことで、病態に対する理解、症状の見通し、医学的対応方法などについての明確な指針をもつことができたことは、大きな衝撃であった。それ以来、患者の診察あるいは遺伝子検査の依頼などで、これまでに著者らが経験したPendred症候群の診断例は70例を超えた。この間の医学と医療の進歩は著しく、原因と病態の解明、診断と治療の方法も大きく進展した。しかし、まだ根本的治療法は開発されていない。新たな技術とアイデアで研究と臨床に取り組み、これからの10年で何とか解決していきたいと考えている。

最後に本症候群の研究にあたり、これまで多数の難聴者とそのご家族、担当医師を中心とした多くの医療関係者のご協力を頂いたことに感謝したい。また、本稿に記した著者らの研究成果は厚生労働省の難治性疾患克服研究事業および国立病院機構共同臨床研究による支援を受けて行われたことを記す。

■ 文 献

- 1) Fraser GR: Association of Congenital Deafness with Goiter (Pendred's syndrome) A study of 207 Families. *Ann Hum Genet* **28**: 201-249, 1965.
- 2) Everett LA, et al: Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* **17**: 411-422, 1997.
- 3) Li XC, et al: A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* **18**: 215-217, 1998.
- 4) Reardon W, et al: Prevalence, age of onset, and natural history of thyroid disease in Pendred syndrome. *J Med Genet* **36**: 595-598, 1999.
- 5) Alasti F, et al: Pendred Syndrome/DFNB4. In: GeneReviews™ (ed by Pagon RA, et al) [Internet], p1993-2013, University of Washington, Washington, 2012. [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1467/>]
- 6) Okamoto Y, et al: Subgroups of enlarged vestibular aqueduct in relation with SLC26A4 mutations and hearing loss. *Laryngoscope*. [in press]
- 7) Campbell C, et al: Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* **17**: 403-411, 2001.
- 8) Tsukamoto K, et al: 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**: 916-922, 2003.
- 9) Azaiez H, et al: Genotype-phenotype correlations for SLC26A4-related deafness. *Hum Genet* **122**: 451-457, 2007.
- 10) Yang T, et al: Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet* **80**: 1055-1063, 2007.
- 11) Yang T, et al: Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *Am J Hum Genet* **84**: 651-657, 2009.
- 12) Dossena S, et al: Molecular and functional characterization of human pendrin and its allelic variants. *Cell Physiol Biochem* **28**: 451-466, 2011.
- 13) Everett LA, et al: Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* **10**: 153-161, 2001.
- 14) Kim HM, Wangemann P: Failure of fluid absorption in the endolymphatic sac initiates cochlear enlargement that leads to deafness in mice lacking pendrin expression. *PLoS One* **5**: e14041, 2010.
- 15) Singh R, Wangemann P: Free radical stress-mediated loss of Kcnj10 protein expression in stria vascularis contributes to deafness in Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**: F139-148, 2008.
- 16) Twyffels L, et al: Pendrin: the thyrocyte apical membrane iodide transporter? *Cell Physiol Biochem* **28**: 491-496, 2011.
- 17) Hulander M, et al: Lack of pendrin expression leads to deafness and expansion of the endolymphatic compartment in inner ears of Foxi1 null mutant mice. *Development* **130**: 2013-2025, 2003.
- 18) Ishihara K, et al: Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations. *Hear Res* **270**: 110-118, 2010.
- 19) Jabba SV, et al: Macrophage invasion contributes to degeneration of stria vascularis in Pendred syndrome mouse model. *BMC Med* **4**: 37, 2006.
- 20) Choi BY, et al: Mouse model of enlarged vestibular aqueducts defines temporal requirement of Slc26a4 expression for hearing acquisition. *J Clin Invest* **121**: 4516-4525, 2011.

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

松永 達雄、鈴木 直大、務台 英樹、難波 一徳、加我 君孝
国立病院機構東京医療センター臨床研究センター

A review of studies using next-generation sequencing for the genetic diagnosis of hearing loss

Tatsuo Matsunaga, Naohiro Suzuki, Hideki Mutai, Kazuhiro Namba, Kimitaka Kaga
National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization Tokyo Medical Center

In this review, we evaluate recent studies that have used next-generation sequencing (NGS) for the genetic diagnosis of hearing loss. Hereditary hearing loss is genetically heterogeneous and caused by a large number of deafness genes. Because of the extreme genetic heterogeneity, genetic diagnosis has been applied only to a subset of patients. NGS can perform parallel sequencing of billions of nucleotides at low cost and high speed, which makes it ideally suited for the comprehensive genetic testing of hereditary hearing loss. We are developing an original protocol based on NGS for the targeted genomic capture of all known deafness genes with the aim of establishing an efficient genetic test for deafness.

Key words : Hereditary hearing loss, deafness gene, genome, comprehensive genetic testing

和文キーワード : 遺伝性難聴, 難聴遺伝子, ゲノム, 網羅的遺伝子検査

論文要旨

本稿では次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer : NGS) を用いた難聴の遺伝子診断の研究について、我々の研究の概要を含めて紹介する。遺伝性難聴では極めて多数の原因遺伝子があることが際立った特徴である。我々のこれまでの遺伝子検査結果の検討からは、遺伝子診断が可能な遺伝性難聴はまだ一部に限られた。NGSを用いた遺伝子解析ではDNA配列を断片化して同時に超並列に塩基配列を読むことで大量の遺伝子解析を短時間で安価に行える。このため、この解析技術は既知の全難聴遺伝子の網羅的解析に適していると考えられた。我々は既知の全難聴遺伝子のタンパク質コード領域のみに解析のターゲットを絞ったNGSにより高い頻度で原因診断が可能であると考えて研究を進めている。

はじめに

遺伝性難聴が疑われる患者の診療において、患者あるいはその両親から難聴の原因を知りたいと求められる機会は多い。また、医師としての立場からは難聴の原因を

理解した上で診療を行いたいと考える。近年の難聴の分子遺伝学的研究の進歩により、一部の遺伝子変異に対する遺伝子検査が可能となり、こうした要望に応えることができる機会が徐々に増えている。そして遺伝子検査により原因が確定した上での診療経験は、原因別に整理・検討できるため、後の患者の医療により効果的に活かせる。しかし、現在のところ大多数の難聴遺伝子は主として技術的困難のために検査できない。本稿では、より効果的、効率的な難聴の遺伝子診断を目標とした次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer : NGS) を用いた研究について、我々の取り組みと国際的な状況を紹介する。

遺伝性難聴と遺伝子診断について

難聴はおよそ出生500人に1人で認められる頻度の高い障害であり、その難聴者の約3分の2では原因が遺伝子にある¹⁾。この遺伝性難聴においては、約70%の患者が難聴以外の症状を伴わない非症候群性難聴であり、それ以外の約30%の患者が難聴以外の症状を伴う症候群性

難聴である²⁾。非症候群性難聴の原因遺伝子はこれまでに61種類報告されており、現在も増え続けている(Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://hereditaryhearingloss.org>)。また、難聴以外の症状を伴う症候群性難聴も多数存在している。そして、これらの遺伝性難聴の大部分は単一遺伝子疾患であり、遺伝子検査で原因診断が確定する。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。

遺伝性難聴が疑われる難聴者あるいは原因不明の難聴者において、遺伝子検査を行い遺伝的原因を診断するのが遺伝子診断である。難聴の遺伝子診断の診療への活用の具体例としては、原因および病態の理解と説明、難聴および合併症の特徴と経過の予測、治療法の選択、予防的対応と増悪時対応、遺伝カウンセリングなどがある。近年、国内でも新生児聴覚スクリーニングの普及により、難聴の早期発見例が増えているが、乳幼児では聴覚や難聴の病態の評価が困難な場合がある。このような時にも遺伝子診断による難聴の病態や特徴の予測が有用となる。

これまでの遺伝子診断の検討

現在、診断を目的とした難聴遺伝子検査を行う国内外の多くの施設においては、1) 頻度の高い遺伝子

(GJB2遺伝子など)、2) 比較的頻度の高い遺伝子の特定の変異(数種類~数百種類)、3) 臨床的特徴から可能性があると推測される遺伝子、の一部あるいは組み合わせで解析を行っている。

我々の施設でも、これまで上述の1)~3)の方法を組み合わせた方法で遺伝子検査を行い遺伝子診断に活用してきた^{3),4)}。2012年までの10年間の原因不明の難聴者での結果を図1にまとめた。原因が確定した難聴者は、保存臍帯を用いたサイトメガロウイルス検査を実施して先天性サイトメガロウイルス感染が難聴の原因と判明した症例を含めても、発症が4歳以下では約42%、5-19歳では20%、20-39歳では13%であった。原因が確定しなかった症例の中には遺伝的要因以外の原因による難聴も含まれていると考えられるが、これまでの検査方法では調べることができない原因遺伝子による遺伝性難聴も多く含まれていると推測される。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必要であることが示された。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子検査の確立のための検討

NGSは近年開発された全く新しいシーケンス技術であり、DNA配列を断片化して同時に超並列に塩基配列を読むことで、大量の遺伝子解析を短時間で安価に行うことが可能である⁵⁾。そこで我々はNGSを用いた遺伝子検査による遺伝子診断の確立を目指して研究を進めた。NGSを用いた解析ではヒト全ゲノム(30億塩基)

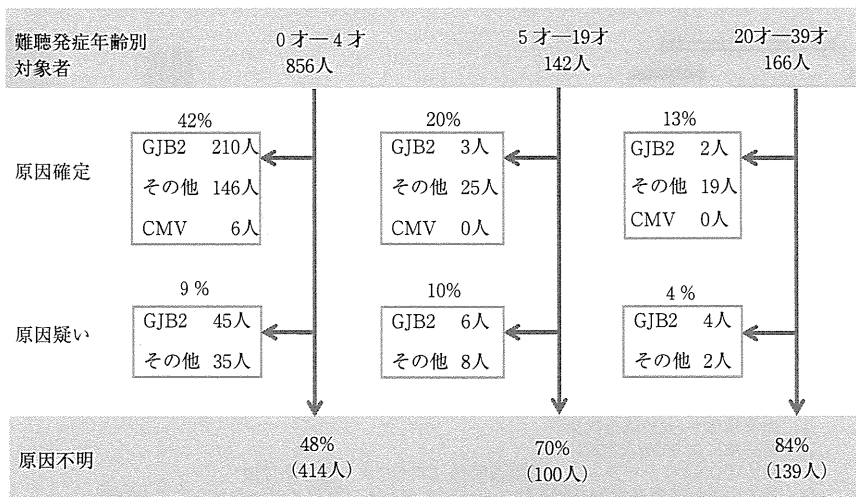


図1 当施設における難聴者の遺伝子検査結果

の塩基配列も解読できるが、それには時間もかかり、費用も高い。全ゲノム中でタンパク質をコードしているのは約2%であり、その領域に遺伝性疾患の原因となる変異の85%が存在していると推測されている⁶⁾。そこで、ゲノム上の特定の領域にターゲットを絞り解析するターゲットリシーケンシングという技術を用いて、タンパク質コード領域のみにターゲットを絞り解析するエクソーム解析が、遺伝性疾患の効率的・網羅的ゲノム解析法として報告されている^{7),8)}。さらに難聴遺伝子のみにターゲットを絞ったターゲットリシーケンシングも報告されている^{9)~13)}。

我々は難聴遺伝子検査をより高い感度で短時間で安価に行うことを目指して、既知の全難聴遺伝子のタンパク質コード領域のみに解析のターゲットを絞ったNGS検査の確立を目指して研究を進めている(図2)。NGSを用いた遺伝子解析では、例えば既知難聴遺伝子のターゲットリシーケンシングであっても1人の難聴者に対して多数の原因候補となる遺伝子変異が見つかり、その中から一つに絞る(つまり難聴の原因を確定する)ことが困難である場合が多い。我々は図3に示した多段階の解析

を行って絞り込みを行うことで、高い確率で原因を確定できると考えている。

以上のようなNGSを用いたシーケンスとそのデータ解析は膨大かつ複雑であるため、適正な遺伝子診断につなげるためには遺伝診療の専門家、分子生物学の専門家、バイオインフォマティクスの専門家が連携して進める必要がある。我々は、慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センターおよび分子生物学教室、理化学研究所ゲノム医科学センター情報解析研究チームとの連携により本研究を進めている。

今後の展望

分子遺伝学的検査の臨床活用には、分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性、倫理的法的社会的問題の検討と問題点の解決が必要とされている。我々は、分子遺伝学的検査及びNGSの診療活用に関するガイドライン(表1)に沿って、NGSを用いた難聴遺伝子検査の確立のための検討と問題点の解決に取り組んでいる。さらに、NGS検査を効果的に医療に活用できるための総合的なチーム医療体制の確立と、効果的な臨床活用を進めるた

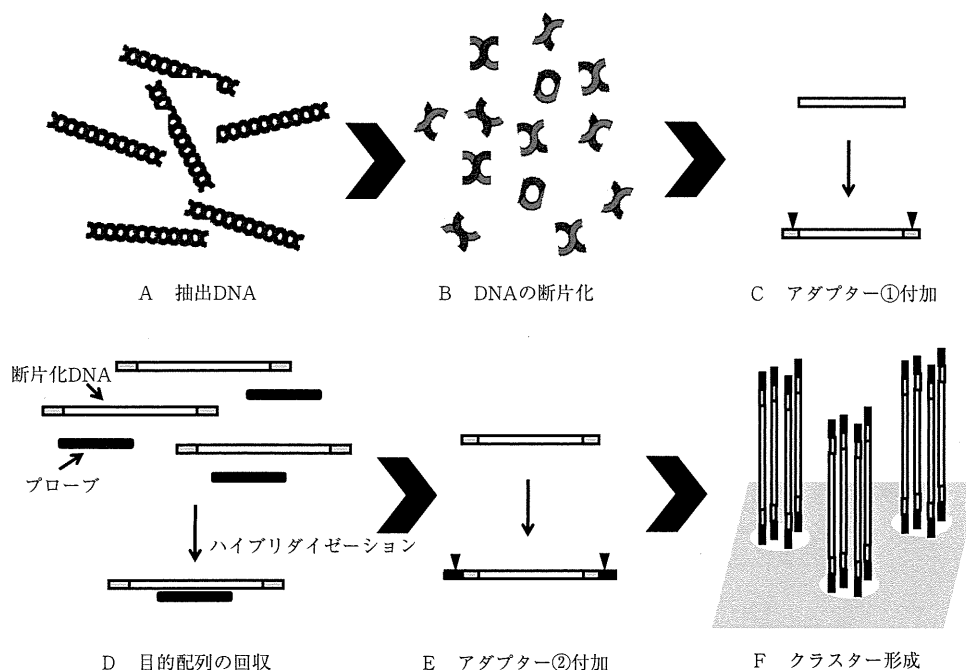


図2 当施設における難聴遺伝子のNGS解析

- A: 血液検体からDNAを抽出
- B: 超音波によりDNAを断片化
- C: 断片化DNAにシーケンス用塩基配列(アダプター①)を付加
- D: 目的の遺伝子塩基配列を特異的プローブとのハイブリダイゼーションにより回収
- E: 回収したDNAにクラスター形成用塩基配列(アダプター②)を付加
- F: チップ上でクラスター形成、その後NGSでシーケンス

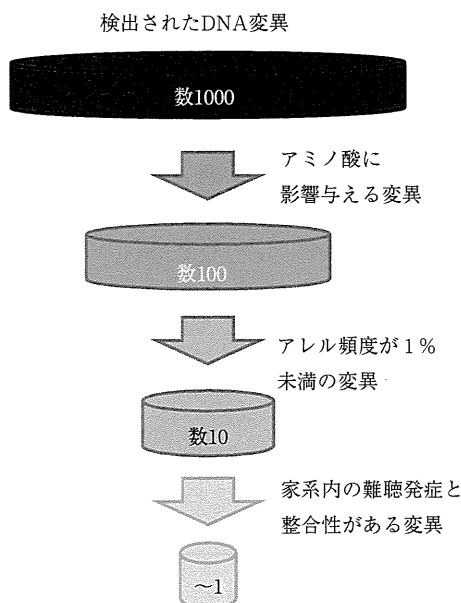


図3 当施設におけるNGS解析データの絞り込み工程

表1 分子遺伝学的検査及びNGSの診療活用に関するガイドライン

- ・「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン（日本医学会、2011）」
- ・「稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査を実施する際のベストプラクティス・ガイドライン（日本人類遺伝学会遺伝学的検査標準化準備委員会、2010）」
- ・「遺伝学的検査に関するガイドライン（遺伝医学関連学会、2003）」
- ・「全ゲノムシーケンシング・全エクソンシーケンシングを診療に活用する際の留意点（アメリカ臨床遺伝専門医会、2012）」[Points to consider the clinical application of genomic sequencing (American College of Medical Genetics and Genomics, 2012)]

めの基盤データベースの構築ならびにガイドラインの検討にも取り組んでいる。遺伝的背景は人種によって大きく異なるため、日本人の遺伝性難聴の遺伝子変異と臨床像を解明していく必要がある。このように、今後取り組むべき課題が多く残されているが、疫学的な研究には多施設共同研究による集団的アプローチが適しており、個別化された研究や独創的アイデアの研究には個別のチームによるアプローチが適している。今後、この両方のアプローチをバランス良く進めることで、我が国の難聴の

遺伝子診断研究が世界をリードできると考えている。

謝 辞

発表の機会を頂いた第22回日本耳科学会総会会長の村上信五先生、座長の森望先生、川瀬哲明先生に感謝致します。本研究にご協力頂いた難聴者およびそのご家族の方に感謝申し上げます。また、本研究にご協力頂きました慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター、小崎健次郎教授、慶應義塾大学医学部分子生物学教室、清水厚志講師、慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室小川郁教授、国立病院機構東京医療センター臨床研究センター藤井正人部長に感謝申し上げます。本研究は厚生労働科学研究補助金（H23－実用化（難病）－一般－013）により行った。

付 記

本稿の受理後に関連する論文が掲載された。

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 Oct 28; 8 (1): 172.

参考文献

- 1) Morton CC, Nance WE : Newborn hearing screening -a silent revolution. *N Engl J Med* 18 : 2151-2164, 2006.
- 2) Smith RJ, Bale JF Jr, White KR : Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 365 : 879-890, 2005.
- 3) 松永達雄、幸池浩子、務台英樹：難聴の遺伝子検査. *神経内科* 68 : 415-421, 2008.
- 4) Matsunaga T : Value of genetic testing in the otological approach for sensorineural hearing loss. *Keio J Med* 58 : 216-222, 2009.
- 5) Mardis ER : The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 24 : 133-141, 2008.
- 6) Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, et al. : What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48 : 580-589, 2011.
- 7) Choi M, Scholl UI, Ji W, et al. : Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 : 19096-19101, 2009.