

201419067A

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究開発事業
(障害者対策総合研究開発事業 (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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 宇佐美真一

平成 27 (2015) 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・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 宇佐美真一（信州大学）	-----	5
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	35

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 26 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（障害者対策総合研究開発事業（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（障害者対策総合研究開発事業（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・教授）

研究要旨

先天性難聴は新生児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、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、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26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「次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析」を前年度に加え難聴患者300例を対象に行うとともに、臨床情報を含めたデータベースの構築を行った。その結果、従来の遺伝子検査手法であるインベータ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、

非常に稀な遺伝子変異による難聴を見出し論文として報告する事ができた。また、昨年度の検討により、「次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析」手法が現在保険診療として実施されている「インベーター法」と同等の性能（感度・特異度）を有することを384例という大規模検体を用いて確認できたため、今後の臨床応用に向けて臨床検査会社への技術移転を行った。

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

茂木英明（信州大学医学部耳鼻咽喉科・助教）、宮川麻衣子（信州大学医学部耳鼻咽喉科・助教）、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・特任研究員）、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

先天性難聴は新生児1,000人に1人に認められる比較的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、臨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

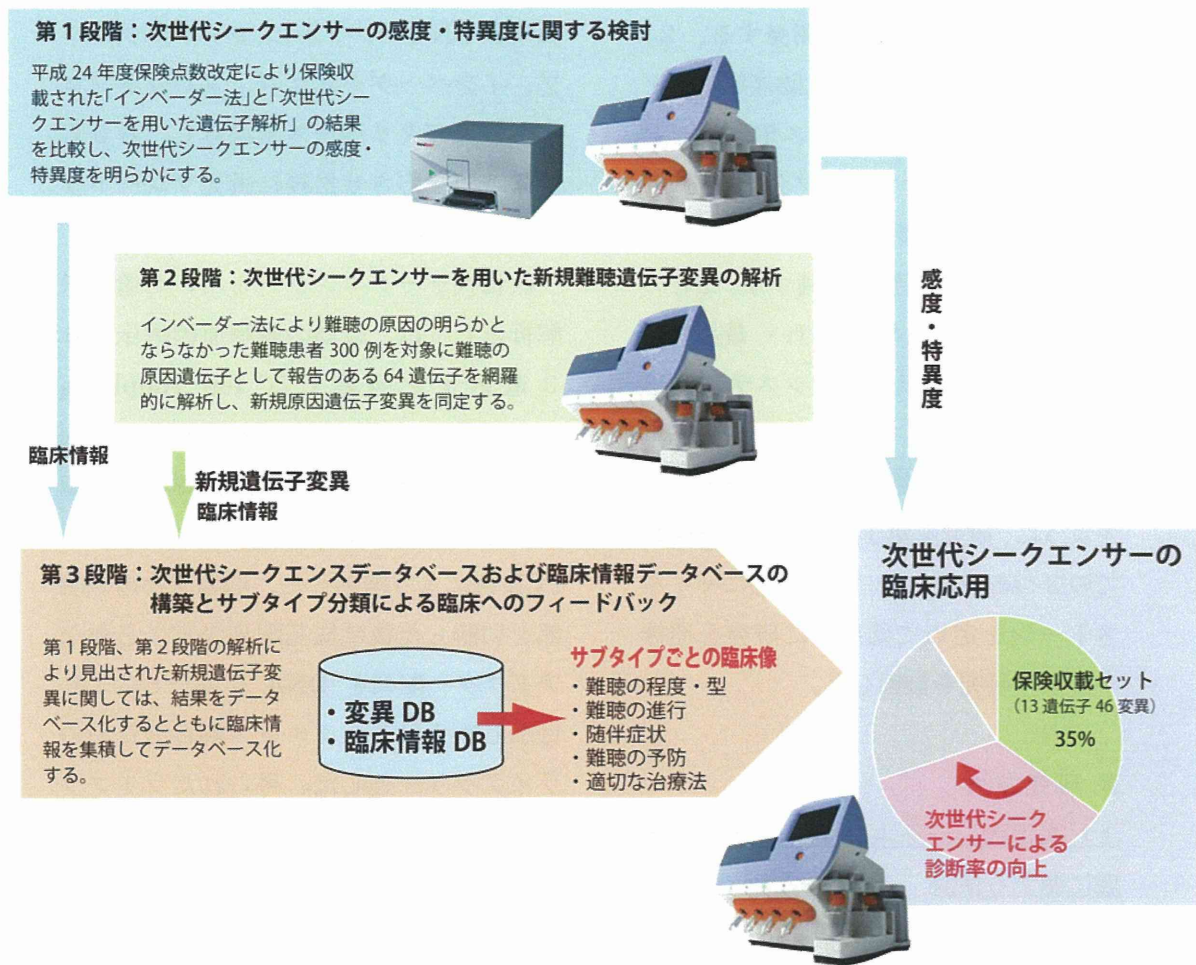


図1 本研究の流れ

本研究では、(1) 既存の検査法（インベーター法）との比較による精度試験、(2) 新規遺伝子変異の探索、(3) データベースの構築と臨床へのフィードバックという3段階のプロセスを踏むことで、次世代シーケンサーを用いた新しい難聴遺伝子診断の臨床応用と、遺伝子診断に基づいたオーダーメイド医療の実現を目的に研究を実施する計画である。

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。

なお、研究の実施に際しては図1に示すように、研究を第1段階～第3段階までの3つの段階に分け、年度毎にマイルストーンを定めて効果的に研究を進捗するよう研究を計画した。

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26年度は、前年度までに引き続き、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、前年度の300例に加えて、新たに難聴患者84例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 (Thermo Fisher Scientific) 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例分を等量ずつ混合した後に、Ion OneTouch 2 システムを用いてエマルジョンPCR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例に対して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) 次世代シークエ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に対しては新規遺伝子変異の探索を行った。前年度までに解析を実施していた300例に加え、新たに300例を対象に既知難聴原因遺伝子の網羅的解析を行った。

具体的には、前述の Ion Torrent システムを用いて既知の難聴原因遺伝子63遺伝子の解析を行った。得られた候補遺伝子変異に関しては、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日本人1,200エクソームでのアレル頻度が1%以下、⑥269例の in house control の同一プラットフォームにおける解析結果においてアレル頻度が1%以下、⑦家族歴と照らし合わせて矛盾が無い、⑧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、さらに直接シークエンスにより変異を確認するとともに家系解析を行った。直接シークエンス解析に関しては、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、BigDye Terminator

v1.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いシークエンスサンプルを調整した。配列決定には ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

(3) 次世代シークエンサーを用いた難聴遺伝子変異データベースおよび臨床情報データベースの構築

第1段階、第2段階の遺伝子解析により得られた次世代シークエンス解析の結果をデータベース化するとともに、原因遺伝子変異ごとに、難聴の程度、進行性、随伴症状、介入効果(補聴器、人工内耳)、語音弁別能や言語成績などの臨床情報のデータベース化を行い、科学的根拠に基づいた適切な治療法および適切な療育プログラムを選択するための情報を臨床にフィードバックするための基盤を整備した。具体的には、前述の方法で前年度までに解析した300例に加えて、本年度新たに解析した300例、Ion Proton シークエンサーで解析した症例を加えた1,120例に関して、次世代シークエンサーの結果と臨床情報をデータベースに蓄積した。

(4) 次世代シークエンサーを用いた遺伝子診断システムの臨床応用に向けた取り組み

平成25年度および26年度に実施した、現在保険診療でもちいられている方法と同等な「インベーター法」と「次世代シークエンサーを用いた新しい遺伝子診断

手法」の比較検討試験（384例）の結果、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十分な精度を有していることが明らかとなったことより、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の臨床応用に向けた準備を行った。具体的には、臨床検査会社および次世代シーケンサーの製造元との連携（共同研究）により新しい遺伝子診断システムの臨床応用に向けた技術移転を行った。平成26年12月には臨床検査会社より検査技師3名を2週間研究員として受入れ、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の技術講習を実施した。また、技術移転後に臨床検査会社でのパイロット検査を開始するとともに、現行法との比較検討を臨床検査会社でも実施し、精度・感度・特異度に関して現行法と同等であることを確認した。また、製造元は医療機器としての申請を行い承認番号を得て、実際に臨床で利用可能な体制を確立することができた。

（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精度・感度・

特異度に関する検討

前年度までの検討により、本研究で開発した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、臨床検査装置として十分な均一性を有していることが明らかとなった事より、本年度は主に精度（感度・特異度）に関する検討を行った。

前年度までの検討により設定したデータの品質基準となる①ターゲット遺伝子領域が平均100depth of coverage以上の深度でデータが得られている、②20x depth of coverage以上の深度を有する領域がターゲット遺伝子領域の96%以上であるの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、384例中14例が基準を下回った（3.4%）。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。以上のことより、今回開発した新しい遺伝子診断システムはDNAの品質に依存せずにつねに一定のデータを出すことができる非常に有用な検査系であることが明らかとなった。また、検査に必要なDNA量も20ngと非常に微量であるため新生児の遺伝子診断など微量検体にも汎用可能な非常に有用なシステムである事が明らかとなった。

また、検査の精度に関して難聴患者384例を対象に平成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

TABLE 1. COMPARISON OF THE INVADER ASSAY-BASED MUTATION SCREENING AND MASSIVELY PARALLEL DNA SEQUENCING-BASED COMPREHENSIVE SCREENING OF DEAFNESS GENES

Mutations	Number of patients with mutations detected by Invader screening (n=384)	Variant alleles detected by Invader screening (n=768)	Variant alleles detected by MPS (n=768)	Variant alleles detected by direct sequencing (n=768)
<i>GJB2</i> :NM_004004:c.235delC:p.L79fs	42 (10.9%)	52 (6.8%)	52	52
<i>GJB2</i> :NM_004004:c.109G>A:p.V37I	19 (4.9%)	21 (2.7%)	21	21
<i>GJB2</i> :NM_004004:c.[134G>A; 408C>A];p.[G45E; Y136X]	16 (4.2%)	17 (2.2%)	18 ^b	17
<i>GJB2</i> :NM_004004:c.427C>T:p.R143W	13 (3.4%) ^a	13 (1.7%) ^a	15 ^b	14
<i>GJB2</i> :NM_004004:c.176_191del16:p.59_64del	9 (2.3%)	10 (1.3%)	10	10
<i>GJB2</i> :NM_004004:c.257C>G:p.T86R	5 (1.3%)	6 (0.8%)	6	6
<i>GJB2</i> :NM_004004:c.299_300del:p.100_100del	6 (1.6%)	6 (0.8%)	6	6
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.2168A>G:p.H723R	15 (3.9%)	20 (2.6%)	20	20
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.1229C>T:p.T410M	4 (1.0%)	6 (0.8%)	6	6
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.1174A>T:p.N392Y	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1	1
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.367C>T:p.P123S	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1	1
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.2162C>T:p.T721M	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1	1
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.601-1G>A:Splicing	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1	1
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.916dupG:p.I305fs	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1	1
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.1648dupT:p.R549fs	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1	1
<i>SLC26A4</i> :NM_000441:c.919-2A>G:Splicing	1 (0.3%)	1 (0.1%)	0 ^c	1
<i>CRYM</i> :NM_001888:c.941A>C:p.K314T	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1	1
Mitochondria 1555A>G	5 (1.3%)	—	—	—
Mitochondria 3243A>G	8 (2.1%)	—	—	—
Mitochondria 8296A>G	1 (0.3%)	—	—	—

^ac.427C>T mutation was not detected by Invader screening in one case (reason unknown).

^bMPS misgenotyped heterozygous as homozygous mutations in one case each because of the other mutations located in the AmpliSeq primer region (see details in main text).

^cc.919-2A>G mutation was located in the region not covered by AmpliSeq primers.

MPS, massively parallel DNA sequencing.

表1 インベダー法の結果と次世代シーケンシングの結果の比較 (n=384例・768アレル)
 インベダー法により検出された遺伝子変異と次世代シーケンシング法により検出された遺伝子変異および直接シーケンシング法の比較。インベダー法で検出された変異のほぼ全てが次世代シーケンシング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。インベダー法と次世代シーケンシング法の一致率は 99.8%であり同等の精度を有していることが明らかとなった。(Nishio et al., 2015)

「インベダー法」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、インベダ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例も認めなかった (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。またインベダ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。384例の検討の中で、1例のみインベダー法の結果と次世代シーケンシング法の結果の不一致が認められたケースがあったが、これは、遺伝子変異の存在する

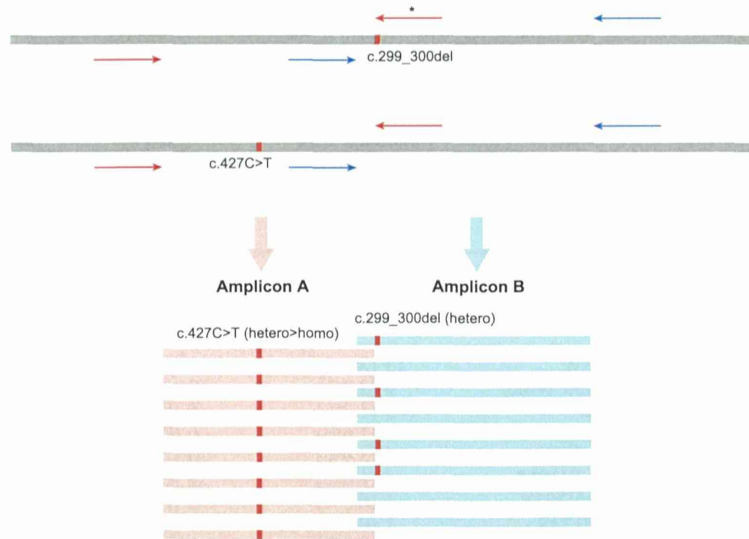


図2 遺伝子型の判定を誤った1例 (384例・768アレル中1アレル)

Ion AmpliSeqで用いるプライマーの3'末端付近に変異が有る場合、プライマーがうまくハイブリッドすることができず(図中*印)、その結果として、上流域は片アレルのみの増幅産物をシーケンすことになるため、ヘテロ接合体をホモ接合体と誤って判定してしまうケースがあることが明らかとなったため、プライマー領域に変異を有する症例では確認作業が必要である。

部位が Ion AmpliSeq による PCR 反応のプライマー部位に存在することによるものであることが、その後の検討により明らかとなった。

このような場合には、本来ヘテロ接合体変異であるものをホモ接合体変異として検出してしまうという結果となるため、結果的に変異の見落としは起こらないため、PCR プライマー領域に辺が存在する場合には、そのプライマーのアンプリコン領域の変異を確認する必要があることが明らかとなった(図2)。

しかしながら、前述のように検査結果の一致率は極めて高く、臨床検査として用いるのに十分な精度を有している事を多検体(384例)を用いて証明することができたため、臨床応用の基盤を整える

ことができたと考えている。

また、従来のインバーダー法では検査対象になっていないものの、日本人難聴患者において比較的多数に認められる遺伝子変異9遺伝子54変異に関して、TaqMan genotyping法を用いて遺伝子型の判定を行うとともに、次世代シーケンサーの結果の比較を行った。前述の384例を対象に比較検討を行った結果、TaqMan genotyping法で検出された遺伝子変異の大部分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でも検出されており、結果の一致率は99.6%であった(表2)。

さらに、難聴の原因として頻度の高い *GJB2* 遺伝子および *SLC26A4* 遺伝子に関して、遺伝子解析のゴールデンスタン

TABLE 2. COMPARISON OF THE TAQMAN ASSAY-BASED MUTATION SCREENING AND MASSIVELY PARALLEL DNA SEQUENCING-BASED COMPREHENSIVE SCREENING OF DEAFNESS GENES

Mutations	Number of patients with mutations detected by TaqMan genotyping (n=384)	Variant alleles detected by TaqMan genotyping (n=768)	Variant alleles detected by MPS (n=768)
CDH23:NM_001171930:c.719C>T:p.P240L	15 (3.9%)	18 (2.3%)	18
CDH23:NM_022124:c.4762C>T:p.R1588W	6 (1.6%)	6 (0.8%)	6
CDH23:NM_022124:c.6085C>T:p.R2029W	4 (1.0%)	5 (0.7%)	5
CDH23:NM_022124:c.4249C>T:p.R1417W	1 (0.3%)	2 (0.3%)	2
CDH23:NM_022124:c.5147A>C:p.Q1716P	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
CDH23:NM_022124:c.5627G>A:p.S1876N	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
CDH23:NM_022124:c.5722G>A:p.V1908I	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
CDH23:NM_022124:c.4877A>C:p.D1626A	1 (0.3%)	1 (0.1%)	0 ^a
CDH23:NM_001171933:c.141T>G:p.N47K	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
CDH23:NM_022124:c.5131G>A:p.V1711I	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
KCNQ4:NM_004700:c.211delC:p.Q71fs	6 (1.6%)	6 (0.8%)	0 ^b
MYO15A:NM_016239:c.9478C>T:p.L3160F	7 (0.9%)	7 (0.9%)	7
OTOF:NM_194323:c.3515G>A:p.R1172Q	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
OTOF:NM_194248:c.1422T>A:p.Y474X	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
SLC26A4:NM00441:c.2229_2301delGAA	1 (0.3%)	1 (0.1%)	0 ^b
SLC26A4:NM_000441:c.1315G>A:p.G439R	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1

^ac.4877A>C mutation did not call by variant calling program (low depth).

^bThese mutations were located in the region not covered by AmpliSeq primers.

表2 TaqMan genotyping 法の結果と次世代シーケンスの結果の比較 (n=384 例・768 アレル)

TaqMan genotyping 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。TaqMan genotyping 法で検出された変異のほぼ全てが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。(Nishio et al., 2015)

ダードである直接シーケンス法（サンガー法）との比較検討を行った結果、次世代シーケンス法では2例を除いて全ての変異を検出できていた。一方、直接シーケンス法で検出できておらず、次世代シーケンサーの結果を基に、再度クロマトグラムの見直しを行った所変異であることが明らかとなった例が2例あった。従って、次世代シーケンス法はサンガーシーケンス法と同程度の精度を有することが明らかとなった(表3)。

このように、現在保険診療や通常の遺伝子診断手法として用いられているインベーター法、TaqMan genotyping 法、直接シーケンス法（サンガー法）と比較して、今回開発した新しい遺伝子診断シ

ステムは同程度の精度を有していることが明らかとなった。また疑陽性を認めなかったことから特異度は同程度であることが示唆された。従って、精度管理された臨床検査室環境で利用すれば十分な精度を有しており、臨床検査として有用であることを明らかにし報告した。

(Nishio et al., Genet Test Mol Biomark. 2015)

しかしながら、検査である以上、どのような手法を用いても100%ということはありません。検査手法の限界に関しても十分に情報提供することが必要であると考えられた。

TABLE 3. COMPARISON OF THE DIRECT SEQUENCING ANALYSIS OF THE SELECTED GENES AND MASSIVELY PARALLEL DNA SEQUENCING-BASED COMPREHENSIVE SCREENING

	Number of patients with mutations detected by direct sequencing (n=384)	Variant alleles detected by direct sequencing (n=768)	Variant alleles detected by MPS (n=768)
GJB2:NM_004004:c.95G>A;p.R32H	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
GJB2:NM_004004:c.11G>A;p.G4D	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
GJB2:NM_004004:c.257C>T;p.T86M	0 ^a	0 ^a	1
GJB2:NM_004004:c.511_512insAACG;p.A171fs	4 (1.0%)	4 (0.5%)	4
GJB2:NM_004004:c.595T>C;p.S199P	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
GJB2:NM_004004:c.558_559ins46;p.E187_K188delinsEKTVFTVFMIAVSGIX	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
GJB2:NM_004004:c.583A>G;p.M195V	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
GJB2:NM_004004:c.53C>G;p.T18S	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
GJB2:NM_004004:c.379C>T;p.R127C	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
GJB2:NM_004004:c.511G>A;p.A171T	0 ^a	0 ^a	1
GJB2:NM_004004:c.334_335del;p.112_112del	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
GJB2:NM_004004:c.318C>A;p.F106L	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
GJB2:NM_004004:c.637T>A;p.L213M	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
GJB2:NM_004004:c.223C>T;p.R75W	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
SLC26A4:NM_000441:c.945T>A;p.Y315X	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
SLC26A4:NM_000441:c.2123T>C;p.F708S	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
SLC26A4:NM_000441:c.641A>G;p.Y214C	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
SLC26A4:NM_000441:c.863T>A;p.L288X	2 (0.5%)	2 (0.3%)	2
SLC26A4:NM_000441:c.1264-2A>G;Splicing	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
SLC26A4:NM_000441:c.918+1G>A;Splicing	1 (0.3%)	1 (0.1%)	1
SLC26A4:NM_000441:c.107_120delI3ins16	1 (0.3%)	1 (0.1%)	0 ^b
SLC26A4:NM_000441:c.147C>G;p.S49R	1 (0.3%)	1 (0.1%)	0 ^b

^aThese mutations were not detected by direct sequencing in one case each (low signal intensity).

^bThese mutations were not detected by MPS (reason unknown).

表3 サンガー法の結果と次世代シーケンシングの結果の比較 (n=384例・768アレル)
サンガー法により検出された遺伝子変異と次世代シーケンシング法により検出された遺伝子変異の比較。サンガー法で検出された変異のほぼ全てが次世代シーケンシング法でも検出されており、同等の精度を有していることが明らかとなった。(Nishio et al., 2015)

(2) 次世代シーケンサーを用いた診断システムによる診断率の向上

(1) の比較検討試験で用いた384例を対象に前述の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を用いた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、各症例にそれぞれ平均275種類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日本人1,200エクソームでのアレル頻度が1%以下、⑥269例のin house controlの同一プラットフォームにおける解析結果においてアレル頻度が1%以下、⑦家族歴と照らし合わせて矛盾が無い、⑧過去に報告のある聴力像と

TABLE 4. PATHOGENIC MUTATION CANDIDATES COMBINED WITH ONE KNOWN PATHOGENIC VARIANT DETECTED BY THE INVADER ASSAY OR TAQMAN GENOTYPING ASSAY OF THE SAME GENES

<i>Gene</i>	<i>Pathogenic mutations detected by Invader assay or TaqMan genotyping assays as heterozygous</i>	<i>MPS detected mutations found in the same gene</i>
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.235delC:p.L79fs	NM_004004:c.511_512insAACG:p.A171fs
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.235delC:p.L79fs	NM_004004:c.511_512insAACG:p.A171fs
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.235delC:p.L79fs	NM_004004:c.C257T:p.T86M
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.235delC:p.L79fs	NM_004004:c.T595C:p.S199P
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.235delC:p.L79fs	NM_004004:c.558_559ins46:p.E187_K188delins
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.C427T:p.R143W	NM_004004:c.A583G:p.M195V
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.G109A:p.Y37I	NM_004004:c.C379T:p.R127C
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.C408A:p.Y136X	NM_004004:c.558_559ins46:p.E187_K188delins
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.C257G:p.T86R	NM_004004:c.C53G:p.T18S
<i>GJB2</i>	NM_004004:c.176_191del:p.59_64del	NM_004004:c.511_512insAACG:p.A171fs
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.A2168G:p.H723R	NM_000441:c.A641G:p.Y214C
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.A2168G:p.H723R	NM_000441:c.T863A:p.L288X
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.A2168G:p.H723R	NM_000441:c.T863A:p.L288X
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.A2168G:p.H723R	NM_000441:c.T945A:p.Y315X
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.A2168G:p.H723R	NM_000441:c.T2123C:p.F708S
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.C2162T:p.T721M	NM_000441:exon7:c.918+1G>A
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.C1229T:p.T410M	NM_000441:exon11:c.1264-2A>G)
<i>CDH23</i>	NM_001171930:c.C719T:p.P240L	NM_001171930:c.G1282A:p.D428N
<i>CDH23</i>	NM_001171930:c.C719T:p.P240L	NM_001171933:c.2079_2085del:p.693_695del
<i>CDH23</i>	NM_001171930:c.C719T:p.P240L	NM_001171933:c.2265dupT:p.H755fs
<i>CDH23</i>	NM_001171930:c.C719T:p.P240L	NM_022124:c.G4672A:p.G1558R
<i>CDH23</i>	NM_022124:c.C4762T:p.R1588W	NM_022124:c.G5419A:p.V1807M
<i>CDH23</i>	NM_022124:c.C4762T:p.R1588W	NM_001171933:c.G746A:p.R249H
<i>MYO15A</i>	NM_016239:c.C9478T:p.L3160F	NM_016239:c.A9938C:p.H3313P
<i>OTOF</i>	NM_194323:c.G3515A:p.R1172Q	NM_194322:c.G1186A:p.G396R

表 4 診断率の向上 (n=384 例・768 アレル)

左列にインベダー法または TaqMan genotyping 法により検出されていたヘテロ接合体変異を、右列に同一症例の次世代シーケンス解析により検出されたもう一つの遺伝子変異を示す。次世代シーケンス法を用いる事で診断率の向上が可能である。(Nishio et al., 2015)

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。

まず、始めに診断率の向上に直結するインベダー法、TaqMan genotyping 法によりヘテロ接合体変異が検出されていた症例においても一つのアレルの変異の配列をシーケンすすることによる診断率の向上に関して検討を行った。その結果、ヘテロ接合体変異症例においても一つのアレルに存在し得る遺伝子変異を見出す事が出来た(表4)。インベダー法または TaqMan genotyping 法によりヘテロ変異の見出された症例で次世

代シーケンス法によりもう一方のアレルが検出された症例は384例中24例あり、これだけでも6.3%の診断率の向上が期待される。さらに、同様に384例の次世代シーケンスの結果に関して論文検索を行った所、インベダー法および TaqMan genotyping 法の解析対象に含まれていないものの、過去に病的変異として報告のある遺伝子変異を20例から検出することができた(表5)。

従って、新規変異を含めなくても11.5%程度の診断率の向上が期待できることが明らかとなった。

TABLE 5. PREVIOUSLY REPORTED PATHOGENIC VARIANTS DETECTED BY MASSIVELY PARALLEL DNA SEQUENCING, WHICH WERE NOT IDENTIFIED IN THE INVADER AND TAQMAN GENOTYPING ASSAYS

Gene name	Reported pathogenic mutation	Reference	
Autosomal dominant inheritance mutations			
<i>ACTG1</i>	NM_001199954:c.A353T;p.K118M	Zhu <i>et al.</i> (2003)	
<i>ACTG1</i>	NM_001199954:c.G721A;p.E241K	Morin <i>et al.</i> (2009)	
<i>KCNQ4</i>	NM_004700:c.C546G;p.F182L	Su <i>et al.</i> (2007)	
<i>KCNQ4</i>	NM_004700:c.C546G;p.F182L	Su <i>et al.</i> (2007)	
<i>KCNQ4</i>	NM_004700:c.C546G;p.F182L	Su <i>et al.</i> (2007)	
<i>MYH9</i>	NM_002473:c.G2114A;p.R705H	Dong <i>et al.</i> (2005)	
<i>TECTA</i>	NM_005422:c.C5597T;p.T1866M	Sagong <i>et al.</i> (2010)	
<i>WFS1</i>	NM_001145853:c.G1846T;p.A616S	Liu <i>et al.</i> (2005)	
<i>WFS1</i>	NM_001145853:c.G2185A;p.D729N	Domènech <i>et al.</i> (2002)	
<i>WFS1</i>	NM_001145853:c.G2590A;p.E864K	Eiberg <i>et al.</i> (2006)	
Gene name	Reported pathogenic mutation	Novel mutation found by MPS	Reference
Autosomal recessive inheritance mutations			
<i>CDH23</i>	NM_001171930:c.C805T;p.R269W	NM_001171933:c.C2407T;p.R803W	Oshima <i>et al.</i> (2006)
<i>MYO7A</i>	NM_000260:c.G635A;p.R212H	NM_000260:c.G3475A;p.G1159S	Weil <i>et al.</i> (1997)
<i>MYO15A</i>	NM_016239:c.G6731A;p.G2244E	NM_016239:c.6457delG;p.A2153fs	Nal <i>et al.</i> (2007)
<i>SLC26A4</i>	NM_000441:c.T2228A;p.L743X	NM_000441:c.C1208A;p.A403D	Yuan <i>et al.</i> (2009)

Among the autosomal recessive causative genes, only the reported pathogenic variants with other mutation candidates in the same genes detected by MPS were listed.

表5 診断率の向上 (n=384例・768アレル)

次世代シーケンシング法により見出された遺伝子変異に関して過去の文献検索を行った所、過去に病的変異として報告のある遺伝子変異を20例より見出すことが出来た。ヘテロ例の診断率向上と併せて、これだけでも11.5%の診断率向上が可能である。(Nishio et al., 2015)

(3) 次世代シーケンサーを用いた診断システムによる新規難聴原因遺伝子変異の探索

(1) の比較検討試験で用いた384例に加え、本年度新たに遺伝子解析を実施した300例にIon Protonシステムで解析を実施した症例を加えた1,120例を対象に新しい遺伝子診断システムを用いた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、日本人難聴患者においては非常に稀な *ACTG1*、*TMPRSS3*、*MYO15A*、*POU3F4*、*LRTOMT*、*LOXHD1*、*PTPRQ* などの遺伝子変異を複数見出し報告する事ができた (Miyagawa et al., 2015^{abc}、Moteki et al.,

2015、Ichinose et al., 2015、Mori et al., 2015、Sakuma et al., 2015)。

また、各症例の詳細な臨床症状に関して調査を行い報告した。その結果、*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」を受けた症例に比較的多く認められる遺伝子変異であることが明らかになった (Miyagawa et al., 2015^{ab})。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ため (Miyagawa et al., 2015^{ab})、今後更に症例数を増やす事で、新しい遺伝子診断シ

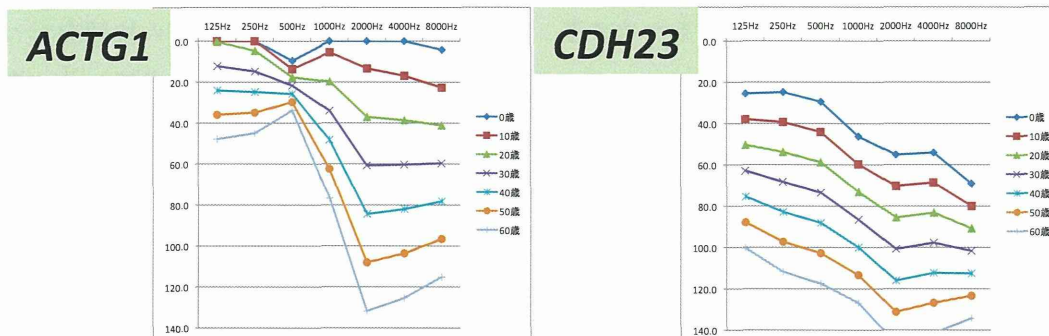


図3 難聴の進行性に関する検討

次世代シーケンス法により遺伝子変異の検出された症例の経過観察より推測された難聴の進行の様子。ACTG1 遺伝子変異による難聴症例では、高音部は進行し重度難聴となるのに比較し、低音部の聴力は比較的維持される。一方、CDH23 遺伝子変異による難聴症例の場合には、高音障害型の難聴として難聴が始まり、全周波数とも、ほぼ均一のスピードで難聴が進行することが明らかとなった。このように、予後の予測に有用であり、今後、更に症例を重ねることで、より適切な医学的介入手法が明らかとなると考えられる。(Miyagawa in preparation)

システムに基づいた個別化医療を実現できることが可能となった。

また、*MYO15A* 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。特に、*MYO15A* 遺伝子変異に関しては、従来稀な遺伝子変異であると考えられていたが、実際に網羅的解析を行うと、小児の先天重度難聴症例においてある程度の割合を占める重要な原因遺伝子変異であることが明らかとなった (Miyagawa et al., 2015⁶)。

このように本研究により開発した次世代シーケンスを用いた新しい遺伝子診断システムは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。

(4) 次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子変異データベースおよび臨床情報データベースの構築

本研究では、研究で得られた成果を順次臨床に還元するサイクルを効率的に回すことを目的に、第1段階、第2段階の遺伝子解析により得られた次世代シーケンス解析の結果を蓄積するための専用のデータベースを開発した。

開発したデータベースでは、次世代シーケンス解析の結果を蓄積するとともに、原因遺伝子変異ごとに、難聴の程度、進行性、随伴症状、介入効果（補聴器、人工内耳）、語音弁別能や言語成績などの臨床情報のデータベース化を行い、科学的根拠に基づいた適切な治療法および適切な療育プログラムを選択するための情

報を臨床にフィードバックするための基盤を整備した。

具体的には、前述の方法で前年度までに解析した300例に加えて、本年度新たに解析した300例、Ion Proton シークエンサーで解析した症例を加えた1,120例に関して、次世代シークエンサーの結果と臨床情報をデータベースに蓄積した。また、これらの情報を基に遺伝子型により難聴の進行をある程度予測可能であることを明らかにした(図3)。

このような臨床的な特徴に加えて、前項までに記載したように、人工内耳や補聴器といった医学的介入の有効性に関するデータを収集していくことで、今後、遺伝子解析を基盤としたオーダーメイド医療を実現することが可能であること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クエンサー(超並列シークエンサー)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研究を行っている。

平成26年度は次世代シークエンサーを用いた新しい遺伝子診断システムの感度・特異度を明らかにすることを目的に難聴患者384名を対象に、「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「次世代シークエンサーを用い

た遺伝子解析法」の結果との比較を行った。その結果、次世代シークエ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、99.8%と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。

また、既存の遺伝学的検査手法としてよく利用される TaqMan genotyping 法および遺伝学的検査のゴールドスタンダードである直接シークエンス法(サンガー法)と次世代シークエンス法の比較検討を行った所、インベーター法の比較検討の結果と同様に、非常に高い一致率を有しており、精度という面では直接シークエンス法(サンガー法)と同程度であることが確認された。また、いくつかの遺伝子に関しては、患者群、コントロール群を用いた検討を行い、従来法と比較しても十分な特異度を有しており、また、新規遺伝子変異を含めることで、診断率(感度)の向上が期待できる優れた検査手法であることを明らかにすることができた。

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点や、AmpliSeqのプライマー領域(特に3'末端付近)に遺伝子変異のある場合には遺伝子変異の検討が出来ないアレルが存在す

る可能性があることが明らかとなった。しかしながら、プライマーの配列情報は既知であるため、他のアンプリコンでプライマー領域内に変異がある場合にのみ他の検査法を組み合わせる事で問題を解消可能であることが明らかとなった。

しかしながら、検査である以上、どのような手法を用いても100%ということはありません。検査手法の限界に関しても十分に情報提供することが必要であると考えられた。

また、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の診断率の向上に関しては、インベーター法などでヘテロ接合体変異が検出されていた症例の、もう一方のアレルに認められる変異、過去に報告のある病的変異を解析することにより、新規変異を含めなくても11.5%程度の診断率の向上が期待できることが明らかとなった。

また、新規遺伝子変異の探索に関しては、日本人難聴患者においては非常に稀な *ACTG1*、*TMPRSS3*、*MYO15A*、*POU3F4*、*LRTOMT*、*LOXHD1*、*PTPRQ* 遺伝子変異を効率よく見出す事が出来た。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

平成26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と、従来法であるインベーター法、*TaqMan genotyping* 法、直接シーケンス法（サンガー法）の比較検討を384例で行い、従来法と同程度の精度（特異度）を有する事を明らかにすることが出来た。また、診断率に関しては、新規遺伝子変異を含めなくても11.5%程度の診断率（感度）の向上が期待できる事が明らかになった。今後、さらに新規遺伝子変異についても解析対象に追加する事でさらなる診断率の向上を行うことが可能である事が示唆されることより、非常に有用な臨床検査ツールであることを示す事が出来た。また、臨床検査会社および機器の製造開発メーカーとの共同研究により、本検査手法の臨床応用に向けた準備を行い、医療機器承認を得るとともに、臨床検査会社でのパイロット試験も完了したため、次年度以降に実際に臨床検査として実施するための基盤を整えることができた。