

I. 総括・分担研究報告

平成30年度厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）
総括・分担研究報告書

ワーデンブルグ症候群の診断基準および
重症度分類策定に関する調査研究

研究代表者 宇佐美 真一（信州大学学術研究院医学系）
研究分担者 茂木 英明（信州大学学術研究院医学系）
西尾 信哉（信州大学学術研究院医学系）

研究要旨

ワーデンブルグ症候群は常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性疾患であり、症候群性難聴の一つである。聴覚障害および色素異常症を呈することが知られており、毛髪、肌、虹彩などの全身の色素異常、部分白子症や、先天性難聴、眼角離解を呈することが特徴である。また、稀な症状として精神発達遅滞やHirschsprung病を合併する例もある。常染色体優性遺伝形式をとる症候群性難聴の内では最も頻度の高い疾患の一つであり、難聴児童の2～4%に見られると報告されているが、現在までに大規模な疫学調査は行われておらず、その実態は必ずしも明確となっていない。

ワーデンブルグ症候群は、その臨床像から4つのタイプに分類される。WS1型では内眼角離解と、突出した鼻根(鼻根部過形成)が見られ、WS2型はWS1型で内眼角離解・鼻根部過形成が無いものを指す。WS3型は眼角離解と上肢の奇形を伴う。WS4型はWaardenburg-Shah syndromeとしても知られており、Hirschsprung病を合併する。ワーデンブルグ症候群の症候のうち難聴は最も浸透率の高い症候であることが知られており、また難聴の程度も、軽度から高度難聴まで非常にばらつきが大きいことが報告されている。両側性難聴の例が多いが、まれに片側難聴例の報告もある。大部分は感音難聴であるが、伝音性・混合性難聴を呈するケース、内耳奇形を合併する例も報告されている。難聴の浸透率は30～60%程度と推測されておりメンデル遺伝性疾患としては低く、難聴の臨床的特徴に関しては不明な点も多い。

そこで、本研究ではワーデンブルグ症候群に関する疫学調査および遺伝子解析を行い、①遺伝子診断を用いた新しい診断法の確立、②遺伝子診断に基づいた診断基準の確立を目的

に全国 80 施設の共同研究施設を対象に疫学調査研究を行うことを目的に研究を行った。

平成 30 年度は、データベースより得られた臨床的所見（臨床像・随伴症状など）を基に、タイプ毎の臨床的特徴を取りまとめるとともに、ワーデンブルグ症候群の原因とされている 6 種類の原因遺伝子（*PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*EDNRB*、*EDN3*、*SOX10*）の各変異と臨床的所見との関連を詳細に検討した結果、発端者を含む 18 家系中 12 例において原因となる遺伝子変異を特定するとともに、新規遺伝子変異を明らかにした。また、平成 29 年度に引き続き、新たなワーデンブルグ症候群の診断基準の項目を検討した。

A. 研究目的

ワーデンブルグ症候群は 1951 年に Waardenburg が初めて報告した疾患であり、常染色体優性遺伝形式をとる症候群性難聴の一つである。聴覚障害および色素異常症を呈することが知られており、毛髪、肌、虹彩などの全身の色素異常、部分白子症や、先天性感音難聴、眼角離解、精神運動発達遅滞、Hirschsprung 病などを呈することが特徴である。常染色体優性遺伝形式をとる症候群性難聴の内では最も頻度の高い疾患の一つであり、難聴児童の 2～4%に見られると言われ、本邦では約 5 万人に 1 人の発症頻度であると考えられているが、我が国における実態は未だ不明確であり、正確な実態把握が必要な状況である。

ワーデンブルグ症候群は、その臨床像から 4 つのタイプに分かれる。WS1 型では内眼角離解と、突出した鼻根（鼻根部過形成）が見られ、WS2 型は WS1 型で内眼角離解・鼻根部過形成が無いものを指す。WS3 型は眼角離解と上肢の奇形を伴う。WS4 型は Waardenburg-Shah syndrome としても知られており、Hirschsprung 病を合併する。

現在までに 6 種類の原因遺伝子（*PAX3*、

MITF、*SNAI2*、*EDNRB*、*EDN3*、*SOX10*）が報告されており遺伝子型と表現型の相関があることが知られている。

このように大まかな症状の分類に関しては明らかになってきているものの、ワーデンブルグ症候群に伴う難聴は軽度から高度難聴まで様々なタイプの感音難聴が報告されており、両側性が多いが時に片側難聴例の報告もある。また、伝音性・混合性難聴を呈するケースや内耳奇形を合併する例も報告されている。これに加え、難聴の浸透率は 36～69%程度であり、表現型にバリエーションが大きい疾患であるため、その実態は必ずしも明確となっていない。

今年度は、前年度まで行ってきたワーデンブルグ症候群データベースより得られたタイプ毎の臨床的特徴（臨床像・随伴症状など）と本疾患の原因とされている 6 種類の原因遺伝子（*PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*EDNRB*、*EDN3*、*SOX10*）の各変異との関連を詳細に検討することをとおして、①遺伝子診断を用いた新しい診断法の確立、②遺伝子診断に基づいた診断基準の確立することを目的とした。

近年の補聴器・人工内耳の発達により、

聴覚障害に関しては医学的介入による QOL の改善が可能となってきたため、遺伝子診断に基づいたタイプ分類と、分類に応じた適切な介入により聴覚障害を軽減し QOL を向上させることが可能であると期待される。

B. 研究方法

ワーデンブルグ症候群は、聴覚障害および色素異常症を呈することが知られており、毛髪、肌、虹彩などの全身の色素異常、部分白子症や、先天性感音難聴、眼角離解、精神運動発達遅滞、Hirshsprung 病などを呈するが、その表現型にはバリエーションが大きいため、その実態は必ずしも明確となっていない。

そこで、本研究では前年度まで行ってきたワーデンブルグ症候群データベースより得られたタイプ毎の臨床的特徴（臨床像・随伴症状など）と本疾患の原因とされている 6 種類の原因遺伝子 (*PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *EDNRB*, *EDN3*, *SOX10*) の各変異との関連の詳細な検討を行った。

1) 次世代シーケンサーによる原因遺伝子の特定ならびに家族 DNA 試料を含めたワーデンブルグ症候群の遺伝的・臨床的特徴に関する検討

全国 80 施設の協力によって前年度までに構築された症例登録データベースに登録されたワーデンブルグ症候群と診断された発端者、およびその家族から DNA 試料を取得し、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行った。具体的には、現在までにワーデンブルグ症候群の原因遺伝子として報

告されている *PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *EDNRB*, *EDN3*, *SOX10* のスクリーニング解析を AMED のデータベース事業「感覚器障害領域を対象とした統合型臨床ゲノム情報データストレージの構築に関する研究班」との連携で行った。

ワーデンブルグ症候群は、聴覚障害および色素異常症を呈することが知られており、毛髪、肌、虹彩などの全身の色素異常、部分白子症や、先天性感音難聴、眼角離解、精神運動発達遅滞、Hirshsprung 病などを呈する常染色体優性遺伝形式をとる疾患である。基本的にはメンデル遺伝性疾患であるが、各症状はいずれも不完全浸透であり、全ての症状を有する症例は稀である。ワーデンブルグ症候群症例の大部分は、症候のうちの一部を有するのみであり、家系内ではばらつきを認める例も報告されている。そこで、発端者の家族に対しても DNA 試料を用いた次世代シーケンサーによる原因遺伝子の特定を行うと共に、家系における発端者の表現型との関係を明らかにした。

2) ワーデンブルグ症候群の診断基準の検討

平成 29 年度までに作成したワーデンブルグ症候群診断基準 (案) に対し、新たに診断基準を収集された症例の臨床情報を基にその適切性に関して検討した。ワーデンブルグ症候群のタイプの中で、WS1 は疫学的に頻度が高くまた眼角離解が報告されているため、その表現型から診断基準を設けることができると考えられる。本村 (1969, *Audiol. Jpn.*) に基づき、日本人における W

index の検討を行った。具体的には、ワーデンブルグ症候群 WS1 に対し、内眼角間、瞳孔間、外眼角間の各距離を測定し、報告されている数式に当てはめることで W index を算出し、ワーデンブルグ症候群と健常者群間で比較した。

(倫理面への配慮)

- ・ 当該疫学調査に関しては信州大学医学部および各施設の倫理委員会で承認を得ている。また、匿名化など疫学研究に関する倫理指針を遵守している。
- ・ 遺伝子診断に関しては信州大学医学部および各施設の遺伝子解析倫理委員会で承認を得ている。また、実施に当たりヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守している。
- ・ 臨床情報の収集および遺伝子診断に際しては、研究協力者に対する十分な説明の後、書面で同意を得てから解析を行っている。また、サンプルには ID 番号を付加して匿名化することで個人情報の漏洩を防止する手順を遵守して行っている。

C. 研究結果

1) 次世代シーケンサーによる原因遺伝子の特定ならびに家族 DNA 試料を含めたワーデンブルグ症候群の遺伝的・臨床的特徴に関する検討

全国 80 施設から収集されワーデンブルグ症候群のデータベースに登録された 18 家系 50 例 (うちワーデンブルグ症候群、もしくはその疑いと診断されたものは 31 例)

を対象に 6 種類の原因遺伝子 (*PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *EDNRB*, *EDN3*, *SOX10*) を標的とした次世代シーケンサーによるスクリーニングの結果、ワーデンブルグ症候群の原因となる遺伝子変異を特定した。特定された遺伝子変異は、*PAX3* 6 例、*MITF* 11 例、*SOX10* 10 例、*EDNRB* 2 例であった。

PAX3 では、難聴の原因となる新規遺伝子変異が 1 例、既報告である遺伝子変異が 5 例検出された。*MITF* では、難聴の原因となる 4 つの新規遺伝子変異が 10 例から、既報告である遺伝子変異が 1 例検出された。*SOX10* では難聴の原因となる 4 つの新規遺伝子変異が 4 例から、既報告である遺伝子変異が 1 例検出されるとともに、Copy number variation (CNV) が原因とされる 5 例が検出された。*EDNRB* では難聴の原因となる 1 つの新規遺伝子変異が 2 例から検出された。今回、既知遺伝子である *SNAI2*, *EDN3* からは難聴の原因となる遺伝子変異は検出されなかった。

ワーデンブルグ症候群の家系間での表現型をみると、*PAX3* の 1 例では、娘は高度難聴および虹彩異色症を示すのに対し、父親からは虹彩異色症のみが見られる。また、*MITF* 遺伝子の 1 例をみると、発端者娘は両側ともに重度難聴、虹彩異色症、白皮症を示すが、弟は両側高度難聴のみを、父親は一側重度難聴および白皮症を示していた。*SOX10* の CNV (1 copy loss) が見られ

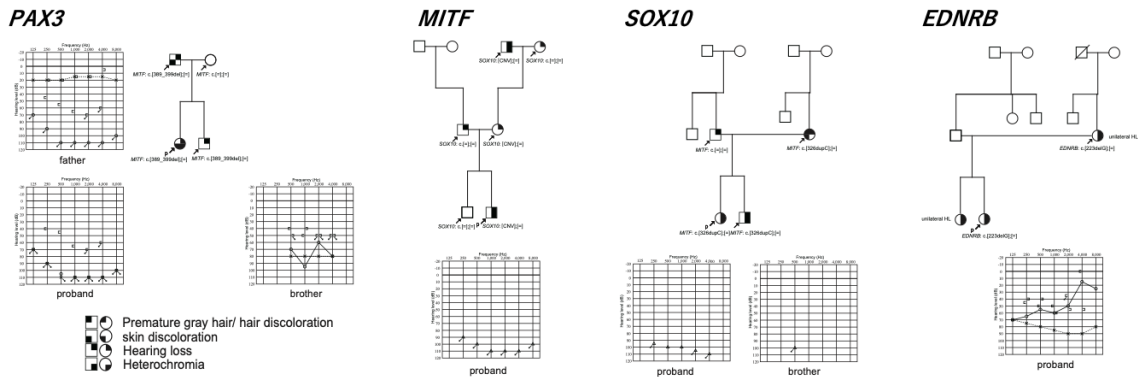


図1 ワーデンブルグ症候群の原因となる遺伝子変異が発見された家系の例 (Ideura et al. submitted)

た2例をみると、同様の変異であるにも関わらず難聴の程度が異なるなど、同一変異を有する家系内においても臨床像が異なることが示された(図1)。

ワーデンブルグ症候群は臨床像から、WS1、WS2、WS3、WS4の4タイプに分けられているが、今回の遺伝子解析と臨床像を比較した結果、原因となる遺伝子変異によってタイプ分類されることはなかった。今回の解析の結果、WS1の原因となった遺伝子は *PAX3*、*MITF*、*SOX10*、WS2では *MITF*、*EDNRB*、*SOX10*、そしてWS4では *SOX10* であった。今回収集された試料の中にはWS3と診断された例はなかった。またWS1またはWS2と診断できない例の原因遺伝子として *PAX3* が同定された。

今回同定された遺伝子変異ごとに聴力像をまとめたところ、*MITF*、*SOX10* 遺伝子変異症例では重度難聴になる傾向があった。一方 *PAX3* では軽度から重度までの難聴の程度を示し、多様であることが明らかになった。*EDNRB* 遺伝子変異例は高度難聴であっ

た(図2)。

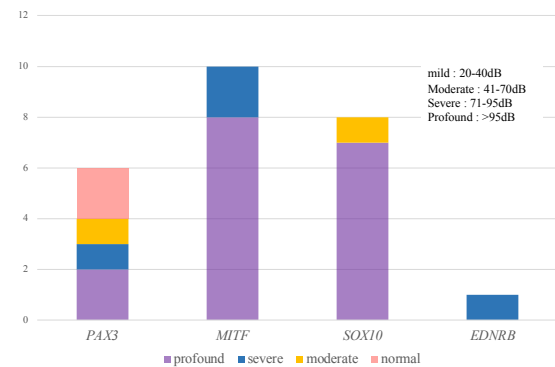


図2 見出されたワーデンブルグ症候群の原因となる遺伝子変異ごとの難聴における臨床像 (Ideura et al. submitted)

2) ワーデンブルグ症候群の診断基準の検討

今回収集したワーデンブルグ症候群のタイプの中で、疫学的に頻度の高いWS1症例に対し、本村(1969, Audiol. Jpn.)の報告に基づき日本人健常者のW indexを算出すると、平均値で2を超える値となった。この結果は、W indexが1.95以上であるとされる諸外国でのワーデンブルグ症候群の診断基準と合致しなかったため、その基準

をそのまま日本人に適用することは困難である可能性が示された。また、これまで WS1 は *PAX3* の遺伝子変異によるもののみ報告されていたが、今回の研究の結果、さらに *MITF*、*SOX10* がその原因になっていることが示された。

D. 考察

ワーデンブルグ症候群の原因とされる 6 種類の遺伝子 (*PAX3*、*MITF*、*SNAI2*、*EDNRB*、*EDN3*、*SOX10*) を標的とした次世代シーケンサーによるスクリーニングの結果、ワーデンブルグ症候群の原因となる遺伝子変異を特定した。見出された遺伝子変異には既知変異のものとともに、13 の新規遺伝子変異 (2 例の CNV 1 copy loss を含む) を明らかにした。

平成 29 年度までに、海外の診断基準を参考に臨床症状を基盤に作成したワーデンブルグ症候群診断基準 (案) では、既知の遺伝子変異を診断基準として加えているが、今回明らかになったワーデンブルグ症候群の原因となる新規遺伝子変異を加える必要がある。今回、ワーデンブルグ症候群症例の中から発見された新規遺伝子変異の中には、Copy Number Variation (1 copy loss) によるものもあり、既知である挿入や欠失だけでなく様々な遺伝子変異がワーデンブルグ症候群の原因となっていることが明らかになったため、今後の遺伝子診断の際には CNV 解析も合わせて行うことの重要性が示唆された。

ワーデンブルグ症候群は、同一の家系内

で同じ原因遺伝子変異を共有していても各症状はいずれも不完全浸透であり、多様な臨床像を呈することが明らかとなった。さらに、*PAX3* 変異の見つかった家系で、遺伝子変異を有するものの、ワーデンブルグ症候群様の症状をひとつも伴わない症例などを経験しており (図 3)、臨床症状のみからワーデンブルグ症候群と診断することが困難な症例があることが明らかとなった。したがって、遺伝子診断を行うことが非常に重要であることが示された。また、原因となる遺伝子変異とタイプ分類が一致しない例があった。具体的には、WS1 の原因としてこれまで *PAX3* の遺伝子変異によるもののみ報告されていたが、今回の研究の結果、*MITF*、*SOX10* が原因として明らかになった。これまで WS1 の診断基準とされる W index は、WS1 の原因が *PAX3* の遺伝子変異のみであるという前提のもとに診断基準の一つとされてきた。しかし今回、日本人症例の中

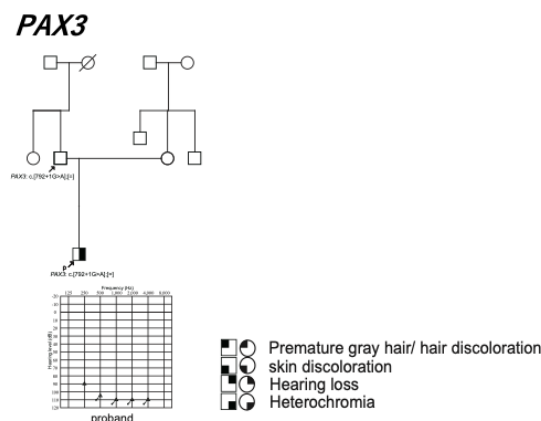


図 3 *PAX3* 変異の見つかった家系で、遺伝子変異を有するもののワーデンブルグ症候群様の症状を伴わない例 (Ideura et al. submitted)

から、新たに WS1 の原因遺伝子 (*MITF*, *SOX10*) が同定された。この理由として、日本人では健常者であっても W index の値が 2 を超える例が多く、W index が 1.95 以上という現在の診断基準の値が適切でないことに由来する可能性がある。そのため今後 W index の閾値の見直しが必要と考えられる。

今後、ワーデンブルグ症候群に関わる様々な遺伝子変異の情報を蓄積していくとともに、症例登録レジストリのさらなる充実を通してワーデンブルグ症候群の臨床像を明らかにすることが必要と考えられる。

E. 結論

平成 30 年度は、ワーデンブルグ症候群の原因とされる 6 種類の遺伝子 (*PAX3*, *MITF*, *SNAI2*, *EDNRB*, *EDN3*, *SOX10*) において、ワーデンブルグ症候群の原因となる遺伝子変異を特定した。特定された遺伝子変異は既知のものとともに、13 の新規遺伝子変異を明らかにするとともに、データベース(症例登録レジストリ)への登録を行った。データベースより得られた臨床的所見(臨床像・随伴症状など)、遺伝子変異を基に、タイプ毎の臨床的特徴を取りまとめ、適切な治療方針を示すことが可能であると期待される。また、診断基準(案)に新たに加えられた新規遺伝子変異は、本症例のより確実な診断に寄与すると考えられる。

全国の共同研究施設から症例登録をとりまとめ、レジストリに集積されたデータを基に詳細な検討が行われることで得られた成果は、発症メカニズムの解明や、今後の

新たな治療法開発のための重要な基盤情報となることが示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 北尻真一郎, 西尾信哉, 宮川麻衣子, 宇佐美真一. <遺伝子変異による耳鼻咽喉科疾患>感音難聴. *耳喉頭頸* 90:632-638, 2018
- 2) Nishio SY, Moteki H, Usami SI. Simple and efficient germline copy number variant visualization method for the Ion AmpliSeq™ custom panel. *Mol. Genet Genomic Med.* 6:678-686, 2018
- 3) 西尾信哉, 宇佐美真一. 最新の遺伝学的検査. *耳喉頭頸* 90:606-615, 2018
- 4) 野口佳裕, 西尾信哉, 宇佐美真一. 次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断のピットフォール. *Audiology Japan* 61:129-135, 2018

2. 学会発表

- 1) Usami SI. The genetic background of the patients with cochlear implantation. International Congress of ORL-HNS 2018, 2018. 4. 27-29 (Grand Hilton Seoul, South Korea)
- 2) Usami SI. Next Generation Sequencing for Deafness Applied to Social Health Insurance-Based Genetic Testing. 6th East Asian Symposium on Otology (EASO 2018), 2018. 5. 24-26 (Millennium Hilton Hotel, Seoul, S

- outh Korea)
- 3) Nishio S, Moteki H, Usami S. Simple and efficient copy number Variant analysis method for the Ion AmpliSeq custom panel. 42nd ANNUAL Mid Winter Meeting, 2019.9.13 (Baltimore, Maryland, USA)
 - 4) 西尾信哉, 茂木英明, 宇佐美真一. 次世代シーケンス解析データを用いた遺伝子コピー数. 第28回日本耳科学会総会・学術講演, 2018.10.3-6 (大阪国際会議場, 大阪)
 - 5) 西尾信哉, 茂木英明, 宇佐美真一. Ion AmpliSeq データを用いた効果的な
 - 6) 宇佐美真一, 茂木英明, 宮川麻衣子, 西尾信哉. 難聴の遺伝学的検査と疾患得意的データストレージ構築. 第63回日本人類遺伝学会, 2018.10.10-13 (横浜国際平和会議場, 横浜市)
 - 7) 宇佐美真一. 遺伝性難聴の診療ガイドライン改定に向けた診断・治療エビデンスの創出. 2018年度6事業合同成果報告会 (難治性疾患実用化研究事業), 2019.2.7-8 (東京国際フォーラム, 東京)