

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 科学的エビデンスに基づいた遺伝性難聴の治療法確立に関する調査研究
(英語) Development of evidence based treatments for inherited hearing loss.
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人信州大学学術研究院医学系 教授 宇佐美 真一
所属 役職 氏名： (英語) Shinshu University School of Medicine Professor Shin-ichi Usami
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

遺伝性難聴などの難治性聴覚障害は音声コミュニケーション等の大きな障害となり長期に渡って生活面に支障を来すため診断法・治療法の確立が期待されている疾患の一つである。難聴の原因としては、現在までに約 100 種類の原因遺伝子が同定されており、臨床症状から原因遺伝子変異を推定することは必ずしも容易ではない。従って、遺伝性難聴という疾患の中には、難聴という共通の症状を呈する様々な疾患が混在している状況である。しかし、原因遺伝子毎に症例を詳細に見て行くと、難聴の程度、進行性の有無、随伴症状の有無(めまい、甲状腺腫、糖尿病、網膜色素変性症など)などの臨床症状が異なるサブタイプに分類可能であることが明らかとなってきた。

そこで、本研究では遺伝性難聴を対象に、All Japan の研究体制で ①遺伝子診断により疾患のタイプ分類を行う。②各タイプ毎に医学的介入前(治療前)の聴力・日本語の弁別能力を評価する。③各タイプ毎に医学的介入後(治療後)の聴力・日本語の弁別能力を評価する。④各タイプ毎に随伴する症状とその発生率を明らかにし、科学的エビデンスに基づいた治療法を確立し、ガイドラインに反映させることを目的としている。

本年度では、難治性疾患政策研究事業「難治性聴覚障害に関する調査研究」班および全国の共同研究施設との連携により、保険診療の遺伝学的検査においても原因診断に至らなかった症例を対象に次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を実施し、効率的に難聴のサブタイプ分類を実施することができた。検体の収集に関しては、当初計画以上に順調に進行しており、2016 年度目標を超え

る 600 例の検体を収集するとともに遺伝子解析を実施することができた。また、遺伝子解析の成果としては既知難聴原因遺伝子において新規の原因遺伝子変異を複数見出しており、家系解析等を実施して病原性の確認を行っている。特に本年度は常染色体優性遺伝形式をとる難聴の原因遺伝子解析を重点的に行い、常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者 75 例の解析を行い 46 例から原因遺伝子を同定し学術論文として報告した (Iwasa et al., PLoS ONE 2016)。また、難治性疾患政策研究事業「難治性聴覚障害に関する調査研究」との連携により、指定難病である若年発症型両側性感音難聴の新規候補遺伝子として *POU4F3* 遺伝子に着目し、昨年度および本年度に収集された検体を用いた遺伝子解析を実施した。その結果、*POU4F3* 遺伝子変異症例は日本人難聴患者には比較的多く認められ、難聴患者の 0.6% に認められることを明らかにした。また、発症年齢は 3~54 歳と幅広く、成人期以降に発症した症例が約半数を占めていること、また、全例難聴の進行を自覚していることを明らかにした。また、聴力像に関しては若年期には皿型の聴力像を呈するが高音部が進行し高音障害型となり重度難聴へといたる経過を取り、若年発症型両側性感音難聴の原因の一つであることを明らかにした (Kitano et al., PLoS One 2017)。

また、厚生労働省難治性疾患政策研究事業「難治性聴覚障害に関する調査研究班」および共同研究施設との連携により、遺伝子解析により原因が確定した症例に対する二次調査を実施し、難聴のタイプ、重症度に加えて、難聴の自然経過（難聴の進行の程度）および人工内耳や残存聴力活用型人工内耳の効果に関する情報収集と分析を行っており、本研究で得られた成果の一部を「遺伝性難聴の診療の手引き 2016 金原出版・東京」に反映した。2016 年にガイドラインの出版した後も日本人難聴患者で初となる原因遺伝子の変異や新規遺伝子変異などが多数見出すことができ、今後、これらの原因遺伝子についても臨床情報を収集するとともに、二次調査を行い補聴器や人工内耳、残存聴力活用型人工内耳の有効性に関する情報の収集を行う計画である。

Hearing loss is one of the most common sensory disorders, appearing in one out of 700 to 1000 newborns, with 50% to 70% of cases attributable to genetic causes. Inherited hearing loss demonstrates great heterogeneity and approximately one hundred genes are estimated to be involved. Thus, it is difficult to estimate the genetic cause of hearing loss from the symptoms. Regarding the medical treatment of hearing loss, cochlear implantation (CI), which directly stimulates the cochlear nerves, is the most effective and widely used medical intervention for patients with severe to profound sensorineural hearing loss. Recently, the development of new electrode and the improvement of atraumatic surgery methods enabled hearing preservation after cochlear implantation. EAS (electric acoustic stimulation) accompanied with hearing preservation is a new trend for patients with residual hearing at the lower frequencies. However, the outcomes of CI vary among patients. One of the reasons of this heterogeneous outcome for cochlear implantation is thought to be the heterogeneous nature of hearing loss. Indeed, genetic factors, the most common etiology in severe-to-profound hearing loss, might be one of the key determinants of outcomes for CI and electric acoustic stimulation (EAS).

In this research program, we intend to create the evidence for hearing loss treatment based of precise diagnosis using genetic analysis. In this year, we collected over 600 hearing loss patients and their family member samples from nation wide collaborators and performed targeted

re-sequencing analysis of these patients. As a result, we identified many novel pathogenic variants and diagnosed the genetic cause of many Japanese hearing loss patients. Especially, we focused the genetic analysis of autosomal dominant inherited sensory neural hearing loss patients using next generation sequencing analysis. As a result of genetic analysis, total of 46 (61.3%) patients were found to have at least one candidate gene variant in previously reported autosomal dominant inherited hearing loss genes (Iwasa et al., 2016). In addition, we also focused on the *POU4F3* gene responsible for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing loss, DFNA15. We performed genetic screening for *POU4F3* variants was carried out for a large series of Japanese hearing loss patients to clarify the prevalence and clinical characteristics of DFNA15 in the Japanese population. Massively parallel DNA sequencing of 68 target candidate genes was performed for 2,549 unrelated Japanese patients and identified 12 novel *POU4F3* pathogenic variants (six missense variants, three frameshift variants, and three nonsense variants) in 15 patients. To obtain the clinical features of the patients harboring *POU4F3* variants, we collected audiograms and vestibular symptoms of the probands and their affected family members. Audiovestibular phenotypes in a total of 24 individuals from the 15 families possessing variants were characterized by progressive hearing loss, with a large variation in the onset age and severity. Pure-tone audiograms indicated the most prevalent configuration as mid-frequency hearing loss for 20-40 years old patients, and high-frequency hearing loss for 50-70 years old patients (Kitano et al., 2017)

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 7 件、国際誌 13 件)

1. Kitano T, Miyagawa M, Nishio SY, Moteki H, Oda K, Ohyama K, Miyazaki H, Hidaka H, Nakamura KI, Murata T, Matsuoka R, Ohta Y, Nishiyama N, Kumakawa K, Furutate S, Iwasaki S, Yamada T, Ohta Y, Uehara N, Noguchi Y, Usami SI. *POU4F3* mutation screening in Japanese hearing loss patients: Massively parallel DNA sequencing-based analysis identified novel variants associated with autosomal dominant hearing loss. PLoS One. 2017;12:e0177636.
2. Nishio SY, Usami SI. Outcomes of cochlear implantation for the patients with specific genetic etiologies: a systematic literature review. Acta Otolaryngol.2017 in press.
3. Kitoh R, Nishio SY, Usami SI. Prognostic impact of gene polymorphisms in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Acta Otolaryngol.2017 in press.
4. Nishio SY, Usami SI. The Clinical Next-Generation Sequencing Database: A Tool for the Unified Management of Clinical Information and Genetic Variants to Accelerate Variant Pathogenicity Classification. Hum Mutat. 2017; 38: 252-259.
5. Moteki H, Nishio SY, Miyagawa M, Tsukada K, Iwasaki S, Usami SI. Long-term results of hearing preservation cochlear implant surgery in patients with residual low frequency hearing. Acta Otolaryngol. 2017;137(5):516-521.

6. Nishio SY, Takumi Y, Usami SI. Laser-capture micro dissection combined with next-generation sequencing analysis of cell type-specific deafness gene expression in the mouse cochlea. *Hear Res.* 2017;348:87-97.
7. Iwasa YI, Nishio SY, Usami SI. Comprehensive Genetic Analysis of Japanese Autosomal Dominant Sensorineural Hearing Loss Patients. *PLoS One.* 2016;11:e0166781.
8. Ueyama T, Ninoyu Y, Nishio S, Miyoshi T, Torii H, Nishimura K, Sugahara K, Sakata H, Thumkeo D, Sakaguchi H, Watanabe N, Usami S, Saito N, Kitajiri S. Constitutive activation of DIA1 (*DIAPH1*) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. *EMBO Molecular Medicine* 2016; 8: 1310-1324.
9. Mori K, Moteki H, Miyagawa M, Nishio SY, Usami S. Social Health Insurance-Based Simultaneous Screening for 154 Mutations in 19 Deafness Genes Efficiently Identified Causative Mutations in Japanese Hearing Loss Patients. *PLoS ONE* 2016; 11: e0162230.
10. Moteki H, Azaiez H, Sloan-Heggen CM, Booth K, Nishio SY, Wakui K, Yamaguchi T, Kolbe DL, Iwasa YI, Shearer AE, Fukushima Y, Smith RJ, Usami SI. Detection and Confirmation of Deafness-Causing Copy Number Variations in the *STRC* Gene by Massively Parallel Sequencing and Comparative Genomic Hybridization. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2016 ;125:918-923.
11. Kitoh R, Nishio SY, Ogawa K, Okamoto M, Kitamura K, Gyo K, Sato H, Nakashima T, Fukuda S, Fukushima K, Hara A, Yamasoba T, Usami S. *SOD1* gene polymorphisms in sudden sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol.* 2016;136(5):465-9.
12. Yoshimura H, Miyagawa M, Kumakawa K, Nishio SY, Usami S. Frequency of Usher syndrome type 1 in deaf children by massively parallel DNA sequencing. *J Hum Genet.* 2016;61:419-22.
13. Sakuma N, Moteki H, Takahashi M, Nishio SY, Arai Y, Yamashita Y, Oridate N, Usami S. An effective screening strategy for deafness in combination with a next-generation sequencing platform: a consecutive analysis. *J Hum Genet.* 2016;61:253-61.
14. 西尾信哉、宇佐美真一:若年発症型両側性感音難聴。耳喉頭頸。2016; 88: 224-232.
15. 宇佐美真一: 人工聴覚器手術 人工内耳手術—残存聴力型人工内耳—。JOHNS 2016; 32: 1282-1284.
16. 茂木英明、宇佐美真一:残存聴力活用型人工内耳 (EAS: Electric Acoustic Stimulation) における内耳機能温存。Otol Jpn. 2016; 26: 149-153.
17. 宇佐美真一:聴覚障害と遺伝。Medical Science Digest. 2016; 42:166-169.
18. 西尾信哉、宇佐美真一:難聴の遺伝子診断とその臨床応用。耳鼻臨床。2016; 109: 828-829.
19. 西尾信哉、宇佐美真一:難聴の遺伝学的検査の現状と展望。医学のあゆみ。2017; 261: 337-339.
20. 宇佐美真一、塚田景大:進行性難聴、変動する難聴。MB ENT. 2017; 205: 1-5.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Deafness gene variations in a 1,120 nonsyndromic hearing loss cohort: Molecular epidemiology and deafness mutation spectrum of patients in Japan, 口頭, Nishio S, Usami S, 第13回国際人類遺伝学会, 2016.4.3-7. 国内.
2. Massively parallel DNA sequencing for deafness applied to social health insurance-based genetic testing, 口頭, Usami S, 第13回国際人類遺伝学会. 2016.4.3-7, 国内.
3. 小児に対する残存聴力活用型人工内耳, 口頭, 宇佐美真一、茂木英明、宮川麻衣子, 第117回日本耳鼻咽喉科学会, 2016.5.18-21, 国内
4. 先天性難聴の遺伝子診断における遺伝子コピー数変化 (Copy Number Variation) 同定の試み, 口頭, 茂木英明、宮川麻衣子、宇佐美真一, 第117回日本耳鼻咽喉科学会, 2016.5.18-21, 国内.
5. 当科における指定難病 (若年発症型両側性感音難聴、遅発性内リンパ水腫、アッシャー症候群) の現状と問題点, 口頭, 塚田景大、宮川麻衣子、吉村豪兼、岩佐陽一郎、宇佐美真一, 第117回日本耳鼻咽喉科学会, 2016.5.18-21, 国内.
6. 次世代シーケンサーによって見出された日本人難聴患者における *WFS1* 遺伝子変異の検討, 口頭, 小林正史、宮川麻衣子、茂木英明、宇佐美真一, 第117回日本耳鼻咽喉科学会, 2016.5.18-21, 国内.
7. 次世代シーケンサーを用いた日本人難聴患者における *POU4F3* 遺伝子変異の検討, 口頭, 北野友裕、宮川麻衣子、茂木英明、宇佐美真一, 第117回日本耳鼻咽喉科学会, 2016.5.18-21, 国内
8. Comprehensive vestibular functions of hereditary hearing loss patients with *GJB2* mutations, 口頭, Tsukada K, Fukuoka H, Usami S, 29th Barany Society Meeting 2016, 2016.6.5-8, 海外
9. 難聴の遺伝子診断の臨床応用, 口頭, 西尾信哉、宇佐美真一, 第78回耳鼻咽喉科臨床学会, 2016.6.23-24, 国内.
10. 若年発症型進行性感音難聴を呈した *TMPRSS3* 遺伝子変異例, ポスター, 笹森かおり、金城信祐、小林有美子、平海晴一、佐藤宏明、宇佐美真一, 第78回耳鼻咽喉科臨床学会, 2016.6.23-24, 国内
11. 当科における小児残存聴力活用型人工内耳植込み術2症例, ポスター, 小林有美子、嶋本紀里人、水川知子、笹森かおり、金城信祐、平海晴一、佐藤宏明、宇佐美真一, 第78回耳鼻咽喉科臨床学会. 2016.6.23-24. 国内.
12. 小児残存聴力活用型人工内耳植込み術2症例. 口頭, 小林有美子、水川知子、笹森かおり、金城信祐、平海晴一、佐藤宏明、宇佐美真一, 第11回日本小児耳鼻咽喉科学会, 2016.6.30-7.1, 国内
13. EAS in children-with special reference to etiology, 口頭, Usami S, Collegium 2016, 2016.8.28-31, 海外
14. 内耳研究に魅せられて: 形態学から遺伝子研究まで, 口頭, 宇佐美真一, 第26回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内
15. 日常診療における遺伝子診断—診療の手引きをふまえて, 口頭, 野口佳裕, 第26回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
16. *HOXA2* 変異によるアブミ骨奇形を呈する常染色体優性遺伝性混合性難聴, 口頭, 野口佳裕、西尾信哉、宇佐美真一, 第26回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.

17. 先天性難聴の遺伝学的検査一次世代シーケンサーの臨床応用一, 口頭, 茂木英明、西尾信哉、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
18. 難聴に対する遺伝学的診断の検討, 口頭, 佐久間直子、茂木英明、高橋優宏、荒井康裕、西尾信哉、折館伸彦、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
19. 当科データベースにおける次世代シーケンサーを用いた *OTOF* 遺伝子の変異解析, 口頭, 岩佐陽一郎、西尾信哉、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
20. 全エクソーム解析で見出された新規難聴原因遺伝子と考えられる *CDC14A* 遺伝子変異症例, 口頭, 吉村豪兼、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
21. 残存聴力活用型人工内耳 (EAS: Electric Acoustic Stimulation) における残存聴力と聴取成績, 口頭, 茂木英明、宮川麻衣子、西尾信哉、塚田景大、工 穰、岩崎聡、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
22. 突発性難聴の治療効果と関連する遺伝子多型の検討～難治性内耳疾患の遺伝子バンクプロジェクト～, 口頭, 鬼頭良輔、西尾信哉、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
23. 人工内耳装用患者の遺伝学的背景とその装用成績, 口頭, 宮川麻衣子、西尾信哉、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内
24. 次世代シーケンサーをベースにした 19 遺伝子 154 変異の難聴遺伝学的検査, ポスター, 森 健太郎、西尾信哉、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内
25. 次世代シーケンサーにより見出された *POU4F3* 遺伝子変異症例の臨床像, ポスター, 北野友裕、宮川麻衣子、西尾信哉、茂木英明、野口佳裕、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
26. 次世代シーケンサーを用いた日本人症候群性難聴の遺伝子解析, ポスター, 出浦美智恵、西尾信哉、宇佐美真一, 第 26 回日本耳科学会, 2016.10.5-8, 国内.
27. 難聴医療従事者に必要な遺伝子診断の知識, 口頭, 宇佐美真一, 第 61 回日本聴覚医学会総会, 2016.10.19-21, 国内
28. 当科で施行した先天性難聴の遺伝学的検査に関する検討, 口頭、藤原敬三、内藤泰、宇佐美真一、道田哲彦, 第 61 回日本聴覚医学会総会, 2016.10.19-21, 国内.
29. *SLC26A4* 遺伝子変異症例における平衡障害の検討, 口頭, 塚田景大、小林正史、森健太郎、宮川麻衣子、宇佐美真一, 第 75 回日本めまい平衡医学会総会, 2016.10.27-28, 国内.
30. 次世代シーケンサーにより見出された *POU4F3* 遺伝子変異症例の臨床, 口頭, 北野友裕、西尾信哉、茂木英明、野口佳裕、宇佐美真一, 第 5 回 耳鼻咽喉科フロンティアカンファレンス, 2016.11.19, 国内
31. 次世代シーケンサーによって見出された日本人難聴患者における *WFS1* 遺伝子変異の検討, 口頭, 小林正史、野口佳裕、宮川麻衣子、西尾信哉、宇佐美真一, 第 5 回 耳鼻咽喉科フロンティアカンファレンス, 2016/11/19, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 難聴の診断と治療の最前線, 宇佐美真一, 信州医学振興財団 夜間健康講座シリーズ 第4回
2017.03.08, 国内.

(4) 特許出願

該当なし