

難聴遺伝子解析による内耳聴覚・前庭の分子機構

●喜多村 健 ◆野口佳裕 ◆堤 剛 ◆岡村洋沖

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科 耳鼻咽喉科学

〈研究の目的と進め方〉

遺伝性感音難聴者を対象にして連鎖解析を施行し、難聴遺伝子座を同定する。原因不明の難聴症例については、既知の難聴遺伝子変異の有無を検討する。難聴遺伝子の変異が同定された症例の聴覚、前庭機能解析を行い、難聴遺伝子による表現型を病理学的検討も含めて行う。実験動物モデルでは、老化促進マウスと内耳奇形マウスの内耳機能・内耳組織を解析し、原因遺伝子の同定と機能解析を行う。これらの研究により、聴覚・平衡感覚の生理学的機能の解明を行う。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1 難聴遺伝子の同定には、原因不明の感音難聴症例、遺伝性非症候群性感音難聴家系の難聴者ならびに血縁者で協力が得られる症例を対象とする。
- 2 非症候群性感音難聴（特発性両側性感音難聴を含む）の臨床的所見、遺伝子解析を研究している全国の臨床医、研究者で設立された共同研究機構に登録された症例も対象とする。
- 3 対象症例の詳細な電気生理学的な聴覚検査を施行する。
- 4 遺伝性難聴家系の症例では、その遺伝形式を検討し家系図を作成して、遺伝形式を明らかとする。対象症例ならびに血縁者で本研究に協力が得られる全員から末梢血を採取し、インフォームドコンセントを書面で得た後に、ゲノムDNAを抽出する。今回申請の研究内容については、所属施設の倫理委員会より、すでに承認を得ている。
- 5 抽出したゲノムDNAをPCRにより増幅する。PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、画像解析装置によりマイクロサテライト多型を検出する。次いでDNAマーカーを用いて、連鎖検定のコンピュータープログラムを用いて、連鎖解析を行う。さらに、連鎖を認めた領域の近傍に位置する複数のマーカーを用いて、多点連鎖解析とハプロタイプ解析を行うことにより原因遺伝子座の領域を特定する。
- 6 老化促進ならびに突然変異内耳奇形マウスの聴性脳幹反応（ABR）を防音、電氣的に遮閉された暗室内にて、Dia Medical社製音刺激装置DPS-725より音刺激を与えて測定し、聴覚閾値を測定する。組織学的検討のため、標本作成後、光学ならびに走査顕微鏡にて内耳組織を観察する。
- 7 遺伝子変異が同定されているヒト側頭骨標本の標本作製を行い、光学顕微鏡による観察と内耳代謝に関する免疫組織学を行い、内耳機能障害を解析する。

〈研究期間の成果〉

① 遺伝性感音難聴者を対象にして、難聴遺伝子変異の検討を行った。その結果、低音障害型感音難聴者を対象にしてWFS1遺伝子変異を同定した(2)。この遺伝子変異の同定は、日本人家系では第2例目となる家系である。さらに、BO症候群を対象にした検討では、EYA1遺伝子に新規の変異を同定し(9, 17)、さらにSIX1遺伝子にも変異を同定した(1)。

② 本邦の家系を対象にして初めて同定されたMYO7A遺伝子変異症例の詳細な聴覚検査で、進行性の感音難聴を同定した(13, 15)。

③ ミトコンドリア遺伝子1555変異症例の難聴を耳音響放射、蝸電図検査を含めた詳細な聴覚検査を施行し、難聴発症の原因部位として内毛細胞の病変を想定した(8)。

④ ミトコンドリア遺伝子変異3243によるMELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, and lactic acidosis) の側頭骨病理を検索し、主な病理組織変化は血管条、ラセン神経節細胞に存在し、有毛細胞は比較的良好に保存されていると報告した(10)。また、同時に同一症例の側頭骨よりミトコンドリア遺伝子を抽出してミトコンドリア3243遺伝子変異率を側頭骨内の有毛細胞、血管条、ラセン神経節細胞、顔面神経、脳組織、脾臓等の各組織について検討した。その結果、側頭骨内の組織では高率のミトコンドリア遺伝子変異を同定したが、重症の糖尿病にかかわらず、脾臓組織内のミトコンドリア遺伝子変異率は低値であった。

⑤ ヒト側頭骨病理標本の切片から、レーザーを用いて数個の細胞を採取して、ミトコンドリア遺伝子を抽出して定量し、ヒト組織標本から細胞レベルでのゲノム解析可能を示した(3)。

⑥ 内耳奇形のJackson shakerマウスの聴覚を解析し、原因遺伝子をsansと同定した(12)。

⑦ 転写因子であるsix4遺伝子は、内耳発生・分化には関与しないが(18)、six1遺伝子は必須であることを同定した(5)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

多くの疾患の原因遺伝子が同定され、病変の病態解明も進み、遺伝子診断が可能になってきている。難聴の原因遺伝子も例外でない。ヒトゲノムのドラフト作成にて、30の疾患遺伝子が同定されたが、そのうち4個は非症候群性感音難聴の原因遺伝子であり、遺伝子研究において難聴遺伝子の同定は、トピックのひとつである。難聴は約650の出生当たり1人が発症し、そのうち約半数が遺伝性とされている。遺伝性難聴の約70%は、難聴以外には症候をもたない非症候群性感音難聴である。これらの疾患の原因遺伝子座は100以上同定され、内耳障害を呈する遺伝子そのものも、すでに30個以上判明しているが、まだ多数の遺伝子が未発見である。難聴遺伝子の同定により、難聴あるいは前庭障害を生じる内耳の障害部位と発症機序が明らかになり、聴覚を生理学的ならびに分子細胞生物学的に解明することが可能になっている。

本研究の研究代表者らは、日本人を対象にして難聴遺伝子の同定に本邦では初めて成功し(Nature Genet 17, 1997)、その精細な臨床経過を明らかにして、Genome-Phenotypeの相関を明らかにした。さらに、複数の内耳奇形マウスの難聴遺伝子、組織学的研究を施行し、ヒトの難聴遺伝子でもあるsans遺伝子変異を新たに同定し、この遺伝子が内耳感覚細胞のMechano-sensory transductionに深く関与していると示した。また、ミトコ

ンドリア遺伝子変異によるMELAS症例の詳細なヒト側頭骨病理を遺伝子変異の定量解析と関連して世界で初めて報告した。内耳の発生・分化の鍵となる遺伝子としてSix1遺伝子変異をマウスにて同定し、この遺伝子がヒトでは内耳奇形を生じることを示した。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

10名程度の難聴者を有し、優性遺伝性難聴家系と想定される症例を経験し、連鎖解析により難聴遺伝子座の解析を検討した。しかし、正確な家系図の聴取ができず、連鎖解析を施行し得なかった。難聴の成因が加齢によるものとの十分な鑑別ができていないのがひとつの理由である。

〈今後の課題〉

- 1) 新規の難聴遺伝子座の同定
優性遺伝性難聴家系を対象にして、正確な家系図を作成し、新規の難聴遺伝子座の同定を行う。
- 2) 加齢性難聴感受性遺伝子の同定
マウス17番染色体にマップされている加齢性難聴感受性遺伝子座から、新規遺伝子を単離する。この遺伝子は、音響外傷による感受性が高く、音響負荷による難聴出現を指標にしてハプロタイプ解析を行う。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文／プロシーディング（査読付きのものに限る）
1. Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Kitamura K: SIX1 mutation associated with enlargement of the vestibular aqueduct in a patient with Branchio-Oto syndrome. *Laryngoscope* (in press)
2. Noguchi Y, Yashima T, Hatanaka A, Uzawa M, Yasunami M, Kimura A, Kitamura K :A mutation in Wolfram syndrome type 1 gene in a Japanese family with autosomal dominant low-frequency sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol* 125:1189-1194, 2005
3. Kimura Y, Kouda H, Eishi Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Ishige I, Iino Y, Kitamura K : Detection of mitochondrial DNA from human inner ear using real-time polymerase chain reaction and laser microdissection. *Acta Otolaryngol* 125 : 697-701, 2005
4. Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, et al: An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5 untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 77:280-296,2005
5. Ozaki H, Nakamura K, Funahashi J, Ikeda K, Yamada G, Tokano H, Okamura H, Kitamura K, Muto S, Kotaki H, Sudo K, Horai R, Iwakura Y, Kawakami K: Six1 controls patterning of the mouse otic vesicle. *Development* 131:551-562,2004
6. Takahashi H, Ishikawa K, Tsutsumi T,et al: A clinical and genetic study in a large cohort of patients with spinocerebellar ataxia type 6. *J Hum Genet* 49:256-264,2004
7. Noguchi Y, Nishida H, Tokano H, Kawashima Y, Kitamura K : A comparison of acute low-tone sensorineural hearing loss versus Meniere' s disease in electrocochleography. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 113:194-199,2004
8. Noguchi Y, Yashima T, Ito T, Sumi T, Tsuzuku T,

- Kitamura K: Audiovestibular findings in patients with mitochondrial A1555G mutation. *Laryngoscope* 114:344-348,2004
9. Yashima T, Noguchi Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Kitamura K. A mutation of the EYA1 gene in patients with Branchio-oto syndrome. *Acta Otolaryngol* 123:279-282, 2003
 10. Takahashi K, Merchant SN, Miyazawa T, Yamaguchi T, Mckenna MJ, Kouda H, Iino Y, Someya T, Tamagawa Y, Takiyama Y, Nakano I, Saito K, Boyer P, Kitamura K : Temporal bone histopathological and quantitative analysis of mitochondrial DNA in MELAS. *Laryngoscope* 113 :1362-1368,2003
 11. Maehara H, Okamura H, Kobayashi K, Uchida S, Sasaki S, Kitamura K : Expression of CLC-KB gene promoter in the mouse cochlea. *Neuro Report* 14 (12) :1571-1573,2003
 12. Kikkawa Y, Shitara H, Wakana S, Kohara Y, Takada T, Okamoto M, Taya C, Kamiya K, Yoshikawa Y, Tokano H, Kitamura K, Shimizu K, Wakabayashi Y, Shiroishi T, Kominami R, Yonekawa H : Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice. *Hum Mol Genet* 12:453-461,2003
 13. Tamagawa Y, Ishikawa Ka, Ishikawa Ko, Ishida T, Kitamura K, Makino S, Tsuru T, Ichimura K : Phenotype of DFNA11:A nonsyndromic hearing loss caused by a myosin VIIA mutation. *Laryngoscope* 112:292-297,2002
 14. Mizukawa Y, Nishizawa T, Nagao T, Kitamura K, Urushidani T : Cellular distribution of parchorin , a chloride intracellular channel-related protein, in various tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C786-C795,2002
 15. Tamagawa Y, Ishikawa Ka, Ishikawa Ko, Ishida T, Kitamura K, Makino S, Tsuru T, Ichimura K: Clinical Presentation of DFNA11 (MYO7A) . *Genetic Hearing Impairment. Adv Otorhinolaryngol* 61. Karger , Basel, 2002 ,pp79-84
 16. Kamiya K , Takahashi K , Kitamura K , Momoi T , Yoshikawa Y : Mitosis and apoptosis in postnatal auditory system of the C3H/He strain. *Brain Res.* 901:296-302 , 2001
 17. Fukuda S , Kuroda T , Chida E , Shimizu R , Usami S , Koda E , Abe S , Namba A , Kitamura K , Inuyama Y : A family affected by branchio-oto syndrome with EYA1 mutations. *Auris Nasus Larynx* 28:S7-S11 , 2001
 18. Ozaki H , Watanabe Y , Takahashi K , Kitamura K , Tanaka A , Urase K , Momoi T , Sudo K , Sakagami J , Asano M , Iwakura Y , Kawakami K : Six4 , a putative myogenin gene regulator , is not essential for mouse embryonal development. *Mol Cell Biol* 21: 3343-3350 , 2001