

平成 21 年 6 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592001  
 研究課題名（和文）日本人感音難聴の原因におけるミトコンドリア遺伝子変異の全体像の解明  
 研究課題名（英文）General image of mitochondrial DNA mutations as a cause of deafness in Japanese deaf patients.  
 研究代表者 松永 達雄（90245580）  
 独立行政法人国立病院機構 東京医療センター臨床研究センター  
 聴覚・平衡覚研究部聴覚障害研究室 室長

## 研究成果の概要：

ミトコンドリア DNA の A1555G 変異と A3243G 変異および GJB2 遺伝子変異を除外した日本人の原因不明の両側性感音難聴患者（先天性難聴 100 家系および後天性難聴 120 家系）において、これまでに難聴遺伝子としての報告があるミトコンドリア遺伝子 7 種類（12SrRNA、tRNA Leu (UUR)、tRNA Ser (UCN)、tRNA Lys、tRNA His、tRNA Ser (AGY)、tRNA Glu) の変異をスクリーニングした。この結果、難聴者のみで同定される遺伝子変異が、12SrRNA 遺伝子を含む 2 遺伝子に同定された。本研究成果は日本人難聴者の診断におけるミトコンドリア遺伝子変異解析の重要性を示すものである。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳鼻咽喉学 聴覚医学

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴のデータベースとして現在最も活用されているアイオワ大学耳鼻咽喉科の hereditary hearing loss homepage (<http://webhost.ua.ac.be/hhh/>) によると、現在までに難聴の原因として報告されているミトコンドリア遺伝子は、非症候群性難聴遺伝子として 12SrRNA 遺伝子および tRNA Ser (UCN) 遺伝子、症候群性難聴遺伝子として tRNA Phe、16SrRNA、tRNA Leu (UUR)、tRNA Ser

(UCN)、tRNA Lys、tRNA His、tRNA Ser (AGY)、tRNA Glu の各遺伝子である（2006 年 10 月のデータ）。一方、ミトコンドリア遺伝子変異のデータベースとして国際的に最も活用されている MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>) では、上記以外にも非症候群性難聴遺伝子として cytochrome oxidase subunit 2、そして多数の症候群性難聴遺伝子が含まれている（2006 年 10 月のデータ）。このことはミトコンドリア遺伝子変異が感

音難聴において頻度の高い重要な原因である可能性を示している。一方で、これら難聴に関連する各ミトコンドリア遺伝子には複数の変異部位があること、さらに細胞内の多数のミトコンドリアがそれぞれ複数のミトコンドリアDNAを持っていて、その一部が変異（ヘテロプラスミー）あるいはすべてが変異（ホモプラスミー）している場合があり、難聴関連ミトコンドリア遺伝子の網羅的解析は技術的に困難であった。このため難聴の原因におけるミトコンドリア遺伝子変異の全体像の解明は医学的に重要な課題であったにもかかわらずこれまで実施されていなかった。

我々はこれまで、原因不明の難聴者において複数の難聴遺伝子の解析を行い、ミトコンドリア遺伝子の12SrRNA遺伝子のA1555G変異および961変異などを中心に、従来のPCR-RFLPあるいはシークエンスによる解析を進め、その過程でミトコンドリア遺伝子解析の重要性を認識していた(Matsunaga et al. Laryngoscope 2004, Matsunaga et al. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005)。近年、核遺伝子の変異解析に用いられているDenaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)法という遺伝子変異スクリーニング技術(van den Bosch et al. Nucleic Acid Research 2000)が改良されて、ミトコンドリア遺伝子解析の最大の技術的問題点であるヘテロプラスミー変異とホモプラスミー変異の網羅的解析を極めて高感度かつ効率的に活用できるようになったため本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで主として技術的な問題から実施されていなかった日本人の原因不明の感音難聴患者におけるミトコンドリアDNA変異の関与の全体像を、新しい解析方法を導入することで解明することを目的とする。新たに同定された難聴遺伝子変異については、その難聴の臨床的特徴を明らかにする。

具体的には、日本人の原因不明の両側性感音難聴患者から難聴遺伝子解析のために提供を受けたDNAにおいて、これまでに難聴遺伝子として報告された10種類の各ミトコンドリア遺伝子にどのような変異がどの程度の頻度で認められるかを解明する。検出された変異について、個人差による多型ではなく難聴の原因であることを確認するために、正常コントロール200人での変異の有無と頻度、家系内メンバーの難聴の有無と遺伝解析を行う。これによりミトコンドリア遺伝子変異の日本人の難聴における関与を初めて網羅的に解明できると共に、ミトコンドリアDNAにおける

新たな難聴遺伝子変異が発見できる可能性がある。

本研究の達成は将来的に高感度かつ効率的な難聴遺伝子診断に役立つとともに、感音難聴の聴覚管理と聴覚リハビリテーション、遺伝カウンセリングなどに応用可能である。

## 3. 研究の方法

国立病院機構東京医療センター聴覚障害研究室が、日本人の原因不明の両側性感音難聴患者から難聴遺伝子解析のために連結可能匿名化の上で現在までに提供を受けたDNA検体から、以下のaとbのスクリーニングにより日本人難聴者に比較的頻度の高いミトコンドリアDNAのA1555G変異とA3243G変異およびGJB2遺伝子変異を除外した先天性難聴100家系および後天性難聴120家系の検体を用いる。

- a. ミトコンドリアDNAのA1555G変異およびA3243G変異は全検体でPCR-RFLP法でのスクリーニングにより除外。
- b. 先天性難聴の原因として頻度の高いGJB2遺伝子変異は、先天性難聴のDNA全てでGJB2蛋白質翻訳領域のシークエンスを行い除外。

正常コントロールとしては、現在までに難聴遺伝子解析のために聴力正常の日本人200人(全員純音聴力検査実施してオーデオグラム正常を確認)から連結不可能匿名化の上で当研究室が提供を受けたDNAを用いる。

難聴者および正常コントロールの各症例の臨床情報(年齢、性別、難聴発症の経過、各種聴覚検査およびそれ以外の耳鼻咽喉科検査結果、合併症の有無と詳細、家系図と各血縁者の難聴の有無)は全てDNA検体提供の際に記録されており、必要に応じて検索できる。

まず難聴者DNAにおいて、難聴との関連が報告されている各ミトコンドリア遺伝子(12SrRNA, tRNA Leu (UUR), tRNA Ser (UCN), tRNA Lys, tRNA His, tRNA Ser (AGY), tRNA Glu)の変異の有無をWAVE遺伝子変異検出システム(Transgenomic社, USA)およびMitoScreen Assay Kit(Transgenomic社, USA)を用いたDHPLC法でスクリーニングする。

ホモプラスミー変異が陽性の検体においては、変異陽性部位を含む領域のダイレクトシークエンスを行い塩基配列を決定する。スクリーニングでヘテロプラスミー変異が陽性の検体においては、変異部位のフラグメントを回収してダイレクトシークエンスを行い塩基配列を決定する。変異の率が数%と低い場合ダイレクトシークエンスで判別できない場合は、TAクローニングを行

った上でシーケンスを行い塩基配列を決定する。

以上の解析で同定された変異については、まず難聴遺伝子変異として確定している変異 (12S rRNAのC1494T、tRNA Ser (UCN)のA7445Gなど) がどの程度の頻度で認められるかを明らかにする。それ以外の変異に関しては個人差による多型ではなく難聴の原因であるかどうかを検討するために、国際的ミトコンドリアDNA多型データベース

(MITOMAP (<http://www.mitomap.org/>)) および日本人ミトコンドリアDNA多型データベース (ヒトミトコンドリアゲノム多型データベース

(<http://www.giib.or.jp/mtsnp/index.shtml>)) で検索を行う。2つのデータベースで多型の登録がない変異については、正常コントロール200検体で本変異を含む部位のシーケンスを行い、多型か否かを検討する。以上の検討から多型の可能性が低いことが明らかになった変異に関しては、家系内メンバーの難聴の有無と遺伝形式 (母系遺伝) とに矛盾がないかを検討する。この際、他のミトコンドリア遺伝子変異による難聴家系の検討から浸透率が極めて低い場合もあるためその可能性を考慮する。

#### 4. 研究成果

日本人の原因不明の両側性感音難聴患者における mtDNA の遺伝子配列を解析した。まずホモプラスミー変異について解析した。

12SrRNA の領域には、Mitomap および NCBI データベースで難聴の原因であると報告されている 3 種類の変異 (未発表データのため詳細省略) を 146 人中の 4 人で同定した。これらの変異は正常コントロールでも 138 人中 6 人で同定された。このことは、本遺伝子変異のみで難聴が発症するのではなく、他の環境要因 (アミノグリコシド系抗生剤の投与など) が加わることにより発症すると考えられた。

さらに病的意義が不明の既存変異 10 種類を認めたが、1 種類を除いて、正常コントロールでも同定された。正常コントロール 139 人で同定されなかった 1 種類 (未発表データのため詳細省略) は、これまでに全く報告のない変異であり、新たな難聴遺伝子である可能性が示唆される。

次にヘテロプラスミー変異の解析では、先天性難聴および後天性難聴の 129 人中 3 人にヘテロプラスミー変異を認めた。この中の 1 人で Mitomap および NCBI データベースに難聴の原因として登録されている変異が認められた (未発表データのため詳細省略)。

他の遺伝子の解析では、12SrRNA、tRNA Leu (UUR)、tRNA Ser (UCN)、tRNA Lys、tRNA His、

tRNA Ser (AGY)、tRNA Glu の各遺伝子について、ホモプラスミー変異およびヘテロプラスミー変異の解析を行った。この結果、その中の 1 遺伝子 (未発表データのため詳細省略) において同一の変異が、3 人の難聴患者で同定された。その変異は、正常コントロール 174 人で同定されなかった。

以上より、日本人の原因不明の両側性感音難聴患者において、ミトコンドリア DNA は、難聴遺伝子としてよく知られている A1555G 変異と A3243G 変異以外にも、頻度は低いが、原因となっている可能性が示された。本研究成果は日本人難聴者の診断におけるミトコンドリア遺伝子変異解析の重要性を示すものである。さらに、本研究成果は、今後の難聴遺伝子検査において、今回同定されたミトコンドリア遺伝子の探索も考慮する必要性を示している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Matsunaga T. Value of genetic testing in determination of therapy for auditory disorders. Keio J Med (in press) 査読有

2. Kunishima S, Matsunaga T, Ito Y, Saito H. Mutations in MYH9 exons 1, 16, and 30 are infrequently found in Japanese patients with nonsyndromic deafness. Genetic Testing (in press) 査読有

3. 松永達雄

小児難聴の遺伝子診断の実際  
小児耳鼻咽喉科 2008;29(3):284-286 査読有

4. 松永達雄、務台英樹  
Auditory Neuropathy の遺伝子研究の動向  
MB ENT 2008;93:11-16 査読無

5. 松永達雄  
難聴の遺伝  
小児内科 2008;40(8):1354-1358 査読無

6. 松永達雄、幸池浩子、務台英樹  
難聴の遺伝子検査  
神経内科 2008;68(5):415-421

7. 松永達雄  
先天性難聴と遺伝子スクリーニング

医療 2008;62(2):104-108. 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 松永達雄、加我君孝、藤井正人、務台英樹、孫こうい、橋本省、三沢逸人、瀧口哲也、中原はるか、上田勉、竹腰英樹、徳丸裕、羽生昇、矢島陽子、泰地秀信、守本倫子  
小児難聴の系統的遺伝子解析と診療への活用

第 62 回国立病院総合医学会

2008 年 11 月 22 日、東京国際フォーラム、東京

2. Matsunaga T.

Value of genetic testing in determination of therapy for auditory disorders.

The Meeting of the Keio Medical Society. Oct14, 2008.

Koyosha Auditorium, Tokyo

3. 松永達雄、加我君孝、務台英樹、孫こうい、守本倫子、泰地秀信、竹腰英樹、藤井正人、井上泰宏、小川郁

小児難聴に対する系統的遺伝子解析の第一次解析の検討

第 53 回日本聴覚医学会総会

2008 年 10 月 2-3 日

明治記念館、東京

4. 松永達雄、孫こうい、務台英樹、幸池浩子、守本倫子、松田明史、川城信子、山下大介、竹腰英樹、矢島陽子、羽生昇、徳丸裕、藤井正人、泰地秀信、加我君孝

新生児・乳幼児難聴に対する GJB2 遺伝子およびミトコンドリア DNA 変異の遺伝子診断

第 3 回日本小児耳鼻咽喉科学会総会

2008 年 6 月 21-22 日

城山観光ホテル、鹿児島市

5. 松永達雄、加我君孝、竹腰英樹、山下大介、矢島陽子、羽生昇、徳丸裕、藤井正人、守本倫子、泰地秀信、井上泰宏、小川郁

小児難聴に対する系統的遺伝子検査を用いた遺伝学的診断

第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会

2008 年 5 月 15-17 日

大阪国際会議場、大阪市

6. 松永達雄、山下大介、竹腰英樹、矢島陽子、羽生昇、徳丸裕、藤井正人、加我君孝、佐藤美奈子、井上泰宏、小川郁、守本倫子、松田明史、川城信子、泰地秀信

新生児・乳幼児難聴の遺伝子診断に関する研究

日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会例会第 179 回学術講演会

2008 年 3 月 8 日

東京

7. 松永達雄

DHPLC を用いたミトコンドリア遺伝子解析の難聴診断への応用

第 25 回日本染色体遺伝子検査学会総会・学術集会

2007 年 11 月 19 日

東京

8. 松永達雄、藤井正人、幸池浩子、務台英樹、孫こうい、橋本省、三沢逸人、瀧口哲也、小室哲、永橋立望、竹内直信、上田勉、加我君孝

原因不明の両側性感音難聴に対して行う難聴遺伝子解析の臨床的意義

第 61 回国立病院総合医学会

2007 年 11 月 16、17 日

名古屋

9. 松永達雄、幸池浩子、務台英樹、孫こうい、藤井正人、守本倫子、泰地秀信、宇佐美真一、佐藤美奈子、小川郁、加我君孝

原因不明の日本人難聴者における 12S ribosomal RNA (MTRNR1) 遺伝子変異解析

第 17 回日本耳科学会総会

2007 年 10 月 18-20 日

福岡

10. 松永達雄、幸池浩子、孫こうい、務台英樹、藤井正人、加我君孝、武井泰彦、武井聡、相馬啓子、佐藤美奈子、小川郁

A3243GtRNA<sup>Leu</sup>(UUR) 遺伝子変異による両側性感音難聴 10 家系の検討

第 52 回日本聴覚医学会総会

2007 年 10 月 4、5 日

名古屋

11. 松永達雄

基礎・臨床の融合基礎研究

「聴覚障害の分子生物学研究の進歩」

第 5 回感覚器研究会「産学官+患」連携東京会議

感覚器（視覚と聴覚の両分野）臨床と研究の 21 世紀～融合領域研究の課題解決とブレークスルー～

東京医療センター外来診療棟 3 階大会議室

平成 19 年 9 月 7 日

[図書] (計 4 件)

1. Matsunaga T

Trends in genetic research on auditory neuropathy.

In: Neuropathies of the Auditory and Vestibular Eighth Cranial Nerves. Kaga K,

Starr A (Eds). Springer, London. 2009 ;  
43-50

## 2. 松永達雄

中等度難聴の遺伝子

In: 加我君孝、内山勉、新正由紀子・編. 小  
児の中等度難聴ハンドブック. 金原出  
版: 東京 2009 ; 51-57

## 3. 松永達雄

薬剤性難聴

In: 服部光男、岡島重孝・総監修. 新版 家  
庭医学大事典. 小学館: 東京 2008 ; 1141

## 4. 遺伝性難聴

In: 服部光男、岡島重孝・総監修. 新版 家  
庭医学大事典. 小学館: 東京 2008 ; 1141

[その他]

ホームページ

[http://www.kankakuki.go.jp/lab\\_c-1.html](http://www.kankakuki.go.jp/lab_c-1.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松永 達雄 (matsunaga tatsuo)

独立行政法人国立病院機構

東京医療センター臨床研究センター

聴覚・平衡覚研究部聴覚障害研究室

室長

研究者番号: 90245580

### (2) 研究分担者

幸池 浩子 (kouike hiroko)

独立行政法人国立病院機構

東京医療センター臨床研究センター

聴覚・平衡覚研究部聴覚障害研究室

研究員

研究者番号: 70415892

務台 英樹 (mutai hideki)

独立行政法人国立病院機構

東京医療センター臨床研究センター

聴覚・平衡覚研究部聴覚障害研究室

研究員

研究者番号: 60415891