

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19791195

研究課題名（和文） 難聴遺伝子GJB2と6変異による難聴発症機序の解析

研究課題名（英文） The analysis of hearing loss mechanism affected from the combination with GJB2 and GJB6

研究代表者

伊藤 卓（ITO TAKU）

研究者番号：40401400

研究成果の概要（和文）：非症候群性難聴の原因遺伝子として最も高頻度に変異がみられるGJB2（ギャップジャンクションβ2）について、われわれの382家系の研究成果によって、GJB2による難聴は言語習得前難聴の18.6%、先天性難聴の28%、常染色体劣性遺伝形式の非症候群性難聴の26.1%を占めることが判明した。遺伝子型では、235delCが52.6%と約半数を占め、G45E、Y136X、V37I、R143Wなどが確認された。表現型-遺伝型の関係では、235delCのホモ接合では高度～重度難聴を呈すること、非短縮型変異の組み合わせでは中等度難聴を示すことを明らかにした。一方、家族性難聴もしくは原因不明の両側性感音難聴を示したヘテロ接合のGJB2変異者には、GJB2とGJB6を含む欠失によるDFNB1複合遺伝子座の変異は検出できなかった。従って、日本人においては本変異は少ないものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：It turned out that hearing loss caused by GJB2 accounted for 18.6% of prelingual, 28% of congenital and 26.1% of autosomal recessive non-syndromic hereditary hearing loss, according to our study. In the genotype, 235delC accounted for 52.6% of mutant alleles, and G45E, Y136X, V37I, and R143W were also confirmed in Japanese. In the point of phenotype-genotype corelationship, 235delC homozygosis cause profound hearing loss, and the combination of non-truncating mutations show moderate hearing loss. On the other hand, any patients affected from the combination with heterozygous GJB2 and GJB6 mutation. Therefore, this mutation was thought to be little in the Japanese.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,300,000	750,000	4,050,000

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：遺伝学、遺伝子、ゲノム、神経科学、難聴

1. 研究開始当初の背景
遺伝性難聴は、難聴以外に症状がみられる症候群性難聴と、難聴以外には他の臨床症

状を示さない非症候群性難聴の2種類に分類される。多くの難聴遺伝子が同定され、どちらのタイプの遺伝性難聴でも臨床的に

難聴の原因あるいは治療を考える上で重要なものである。研究代表者である伊藤は、前庭水管拡大を合併した非症候群性難聴のBO症候群患者に対して分子生物学的手法を用いて、日本人ではじめての*SIX1*変異(Y129C)を同定した。また、非症候群性遺伝性難聴の原因の一つとされているミトコンドリアDNAにおけるA1555G変異の有無を、血縁関係のない非症候群性遺伝性難聴110例を対象として検討し、7例(6.4%)に変異を認めた。一方、非症候群性難聴の原因遺伝子として最も高頻度に変異がみられるものは*GJB2*(ギャップジャンクションβ2)であり、欧米では孤発性の先天性高度難聴の約3分の1、劣性遺伝の高度感音難聴症例の約半数の原因遺伝子とされていた。われわれのこれまでの研究成果でも268家系の非症候群性劣性遺伝難聴のうち26家系(9.7%)に*GJB2*変異が認められた。*GJB2*はイオンチャネルを構成するコネクシンタンパクの1つであるコネクシン26をコードする遺伝子である。内耳ではカリウムイオン再利用という重要な役割を担っており、劣性遺伝性難聴(DFNB1)と優性遺伝性難聴(DFNA3)の原因遺伝子である。コネクシンは6つ集合して1つのコネクソンを形成し細胞間結合のギャップ結合タンパクとして細胞膜に存在している。一方、*GJB6*はコネクシン30をコードしており成熟した内耳ではコネクシン26と30が多く存在していることが報告されている。コネクシン26と30はヘテロメリックなコネクソンを形成し、チャネルもさまざまな組み合わせで形成される。2002年、スペインのdel Castilloらの研究成果として、本来保因者と考えられるヘテロ接合の*GJB2*変異を有する難聴者の2/3が、*GJB2*と*GJB6*を含む欠失(Δ(*GJB6-D13S1830*))によるDFNB1複合遺伝子座の変異によることが明らかとなった。さらに、同様な研究成果は欧州、北米、南米からも報告されており、新たな欠失として(Δ(*GJB6-D13S1854*))も同定されていた。しかし、日本を含めアジアからの報告はなかった。我々の研究成果では上述の26家系中18家系がヘテロ接合による*GJB2*変異であり、日本でも*GJB2*と*GJB6*を含むDFNB1複合遺伝子座の変異により難聴が生じている可能性は十分に考えられた。

2. 研究の目的

当施設において、家族性難聴もしくは原因不明の両側性感音難聴を示し、研究協力が得られる症例から血液を採取しDNAを採取する。*GJB2*の翻訳領域における変異の有無を直接シーケンス法により検索する。この中で、ヘテロ接合の*GJB2*変異者を対象とする。その後、Δ(*GJB6-D13S1854*)を

検出する適当な3つのプライマーを用い、日本人に同様の欠失がみられるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

対象者に対して、*GJB2*の5'非翻訳領域と3'非翻訳領域の遺伝子解析を行い、その領域の一塩基置換や欠失がないことを確認する。その後、*GJB6*からマイクロサテライトマーカーD13S1830内の342kbの欠失の有無を調べる。具体的には、この領域を含むような3つのプライマーを設定し、これらの3つのプライマーによりPCRを施行後、電気泳動を行う。なお、正常者では、650bpのバンドのみが検出され、ヘテロ接合のΔ(*GJB6-D13S1830*)を有する症例では650kbと478kbの二本のバンドが検出される用に工夫する。

4. 研究成果

*GJB2*について、われわれの382家系の研究成果によって、日本人における遺伝子型の頻度、および表現型-遺伝型の関係を明らかにした。症例の内訳は、性別が女性235例、男性147例で年齢は0-84歳で、平均が40.22±18.83歳であった。その結果、*GJB2*による難聴は言語習得前難聴の18.6%、先天性難聴の28%、常染色体劣性遺伝形式の非症候群性難聴の26.1%を占めることが判明した。遺伝子型では、235delCが52.6%と約半数を占め、G45E、Y136X、V37I、R143Wなどが確認された。表現型-遺伝型の関係では、235delCのホモ接合では高度〜重度難聴を呈すること、非短縮型変異の組み合わせでは中等度難聴を示すことを明らかにした。また、聴力型は遺伝型と無関係であった。一方、家族性難聴もしくは原因不明の両側性感音難聴を示したヘテロ接合の*GJB2*変異者には、*GJB2*と*GJB6*を含む欠失によるDFNB1複合遺伝子座の変異は検出できなかった。従って、日本人においては本変異は少ないものと考えられた。

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 8 件)

- ① Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K. Hereditary Hearing Loss and deafness genes In Japan, J Med Dent Sci., 査読あり, 55 巻, 2010, 1~10
- ② Yashima T, Noguchi Y, Kawashima Y, Rai T, Ito T, Kitamura K. Novel ATP6V1B1 mutations in distal renal tubular acidosis and hearing loss. Acta

Otolaryngol. 査読あり, 130 巻, 2010, 1002~8

③ Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Ueno H, Hosoya H, Ito T, Kimura Y, Kitamura K, Tanaka M. Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. J Hum Genet. 査読あり, 55 巻, 2010, 147~54

④ 伊藤卓, 野口佳裕, 大野十央, 喜多村健, 特発性両側性感音難聴の検討 -孤発例と家族例の違い-, Audiology Japan, 査読あり, 53巻, 2010, 150~7

⑤ Fujikawa T, Noguchi Y, Ito T, Takahashi M, Kitamura K: Additional heterozygous 2507A>C mutation of WFS1 in progressive hearing loss at lower frequencies. **Laryngoscope** 査読あり, 120:166-171, 2010

⑥ Kawashima Y, Noguchi Y, Ito T, Kitamura K: Vestibular evoked myogenic potentials in patients with the mitochondrial A1555G mutation. **Laryngoscope** 査読あり, 119:1874-1879, 2009

⑦ 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** 査読あり, 116:796-799, 2006

⑧ Noguchi Y, Yashima T, Ito T, Sumi T, Tsuzuku T, Kitamura K: Audiovestibular findings in patients with mitochondrial A1555G mutation. **Laryngoscope** 査読あり, 114:344-348, 2004

[学会発表] (計 8 件)

① ミトコンドリアDNA1555A > G変異症例の前庭誘発筋電位 (川島慶之、野口佳裕、伊藤卓、八島隆敏、喜多村健) 第 16 回 日本耳科学会

② 難聴を初発症状とした顕微鏡的多発血管炎の検討 (伊藤卓, 野口佳裕, 八島隆俊, 川島慶之, 畑中章生, 有泉陽介, 喜多村健) 第 108 回 日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会

③ A novel mutation in WFS1 in a Japanese

family shows U-shaped audiogram in childhood. (Fujikawa T, Noguchi Y, Ito T, Takahashi M, Kitamura K) 6th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference

④ Saccular dysfunction in patients with mitochondrial 1555 A to G mutation (Kawashima Y, Noguchi Y, Ito T, Wasano Y, Kitamura K) 6th Molecular Biology of Hearing & Deafness conference

⑤ 平衡障害を示したミトコンドリアDNA1555点変異の 1 例 (野口佳裕, 川島慶之, 伊藤卓, 喜多村健) 第 67 回 日本めまい平衡医学会

⑥ ミトコンドリア遺伝子変異網羅的検出法による遺伝性難聴 373 例の解析 (加藤智史, 野口佳裕, 西垣裕, 上野仁美, 田中雅嗣, 伊藤卓, 木村百合香, 喜多村健) 第 110 回 日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会

⑦ 特発性両側性感音難聴の検討 孤発例と家族例の違い (伊藤卓, 野口佳裕, 大野十央, 喜多村健) 第 54 回 日本聴覚医学会

⑧ 前庭水管拡大症を伴う SIX1 変異による Branchio-oto症候群の聴平衡覚検査所見 (野口佳裕, 伊藤卓, 喜多村健) 第 68 回 日本めまい平衡医学会

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤卓 (ITO TAKU)
東京医科歯科大学・耳鼻咽喉科・助教
研究者番号：40401400

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：