

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390459

研究課題名(和文) 難聴症例のミトコンドリア遺伝子変異の網羅的解析法確立と内耳細胞内の変異定量解析

研究課題名(英文) Extensive and rapid comprehensive screening for mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss and quantitative analysis of mtDNA mutation in the cells of the inner ear

研究代表者

喜多村 健 (Kitamura, Ken)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90010470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円、(間接経費) 3,990,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性ならびに非遺伝性感音難聴症例を対象に、ミトコンドリア遺伝子変異の有無を網羅的に解析した。61種類のミトコンドリア遺伝子変異の有無を解析し、m.1555A>Gを11例、m.3243A>Gを9例、m.8348A>G、m.11778G>A、15498G>A、m.7444G>A、m.7472C>ins C変異を各々1名例検出した。さらに、tRNA^{Leu}(UUR)遺伝子の3243A>G変異の68歳女性のMELAS側頭骨標本を対象に、レーザーキャプチャー・マイクロダイセクションによるヒト内耳細胞からの個別のDNA抽出法により、変異ミトコンドリア遺伝子量を定量解析した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 373 patients with suspected hereditary HL using an extensive and rapid suspension-array screening system for 61 major mtDNA mutations. The m.1555A>G and m.3243A>G mutations were detected in 11 (2.9%) and 9 (2.7%) patients, respectively. In addition, five mutations, that is, m.8348A>G, m.11778G>A, 15498G>A, m.7444G>A, and m.7472C>ins C mutations were detected in one patient for each. This screening system is useful for the genetic diagnosis. We extracted mtDNA using laser capture microdissection method from cells of interest from inner ear taken from patients with m.3243A>G mutations and quantitatively analyzed mtDNA mutation.

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(8310)

キーワード：遺伝子 脳・神経 神経科学 臨床

1. 研究開始当初の背景

1 網羅的解析法確立の必要性

難聴は頻度の高い疾患であり、約1000の出生当たり、1人は言語習得前に高度難聴あるいは聾となり、しかもその半数は遺伝性とされている。この遺伝性難聴のなかで、難聴以外に臨床徴候のない症例が非症候群性難聴であり、一般耳鼻咽喉科診療においても経験することが多い。非症候群性難聴の原因遺伝子で、最も罹患者数が多いのは、*GJB2* である。次に多いのがミトコンドリア遺伝子変異で、欧米に比較して我が国では高率に見られる。ミトコンドリア遺伝子変異による非症候群性難聴で、最も多いのはリボソーム RNA (rRNA) の12SrRNA 遺伝子変異で、アミノ配糖体抗菌薬に高い感受性を示す点からも重要である。この12SrRNA 遺伝子領域では、961del(T, insCn)、1494C>T、1555A>Gの3つの変異部位が報告され、1555A>G 変異は特に高頻度で自験例の遺伝性難聴家系では5.7%の家系にみられ、母系遺伝を示さない原因不明の孤発性難聴症例においても変異が同定されている(Laryngoscope, 2004)。さらに、非症候群性難聴に関わるミトコンドリア遺伝子変異で、もうひとつ注目すべき領域は、転移RNA (tRNA) の $tRNA^{Ser(UCN)}$ 遺伝子である。この領域においては、7445A>G、7472insC、7510T>C、7511T>Cの4つの変異が同定されている。tRNA 領域の変異では、 $tRNA^{Leu(UUR)}$ 遺伝子の3243A>G 変異が、症候群性難聴の MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode) において高率に同定される。症候群性難聴は、難聴以外の症状を呈するので確定診断が容易であるが、我々は、 $tRNA^{Leu(UUR)}$ 遺伝子の3243A>G 変異は難聴以外の臨床症状を呈さない症例でも同定している(Ann Otol Rhinol Laryngol, 1997)。すなわち、ミトコンドリア遺伝子変異は、遺伝性あるいは遺伝性疾患が疑われない孤発例があり、非

ならびに症候群性難聴のいずれの様式も呈し、しかも多数の症例に変異が見られることから、網羅的かつ効率的な遺伝子変異解析法の確立が重要である。

2 ヒト内耳細胞におけるミトコンドリア遺伝子変異の定量解析の必要性

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, 1997)、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、新規遺伝子としては *Sans* 遺伝子変異を同定した(Hum Mol Genet, 2003)。これらの難聴遺伝子変異がヒトでどのような病理変化を生じるかは重要な課題であるが、研究代表者らは、ミトコンドリア遺伝子変異によるヒト側頭骨病理を、世界で初めて報告した(Laryngoscope, 2003)。しかし、いまだに難聴遺伝子変異のヒト側頭骨病理研究は極めて少ない。一方、難聴発症の際に、内耳組織にどのような機能的変化が生じているかについては、ヒト内耳の個々の細胞における難聴遺伝子の発現解析が重要となる。特にミトコンドリア遺伝子変異は、細胞内で変異型と野生型が混在しており、細胞障害の発現と変異ミトコンドリア遺伝子量の相関の解析が病態解明には必須である。幸いにも、研究代表者らは、 $tRNA^{Leu(UUR)}$ 遺伝子の3243A>G 変異の3例の MELAS 側頭骨の標本を取得している。この側頭骨標本を対象にして、我々が開発したレーザーキャプチャー・マイクロダイセクションによるヒト内耳細胞からの個別の DNA 抽出法(Acta Otolaryngol, 2005)により、変異ミトコンドリア遺伝子量を定量解析して内耳細胞の組織学的所見との相関を検討する。

2. 研究の目的

ミトコンドリア遺伝子変異の網羅的解析手法として開発した蛍光ビーズ・アレイPCR-Luminex®法を用いて、原因不明の遺伝性ならびに非遺伝性感音難聴症

例を対象に、ミトコンドリア遺伝子変異の有無を解析する。さらに、68歳女性のMELAS症例でtRNA^{Leu}(UUR)遺伝子の3243A>G変異のMELAS側頭骨標本を対象に、我々が開発したレーザーキャプチャー・マイクロダイセクションによるヒト内耳細胞からの個別のDNA抽出法により、変異ミトコンドリア遺伝子量を定量解析して内耳細胞の組織学的所見との相関を検討する。

3. 研究の方法

1 ミトコンドリア遺伝子変異網羅的解析法によるミトコンドリア遺伝子変異の同定

遺伝子変異網羅的解析手法として用いるのは、蛍光ビーズ・アレイPCR-Luminex®法で、Suspension Array Technologyと呼ばれる、1本のマイクロチューブ内で多項目のAssayをバッファ液に懸濁した状態で、同時に施行可能な多項目同時解析手法である。本法は、スライドガラス等の平板の基盤上に目的の遺伝子やタンパクを検出するためにプローブが固定されている通常のバイオチップとは異なり、2種類の蛍光色素が異なる割合で配合された直径5.6 μmの微少なポリエチレンビーズ上にプローブが固定されている。蛍光色素の配合割合が識別コードになっており、最大100種類のビーズを同一のマイクロチューブ内で使用・解析可能であり、変異検出感度が高く、ミトコンドリア遺伝子変異に特有に見られるヘテロプラスミーで変異ミトコンドリア遺伝子量の少ない症例でも検出可能である。

上記の蛍光ビーズ・アレイPCR-Luminex®法により、28種類のミトコンドリア遺伝子変異(シリーズA)と、32種類のミトコンドリア遺伝子変異(シリーズB)を開発しており、未解析の遺伝性感音難聴症例を対象に、ミトコンドリア遺伝子変異の有無を解析する。

2 ミトコンドリア遺伝子変異による内耳組織病理

ミトコンドリア遺伝子3243変異症例の68歳女性の側頭骨病理を解析し、主要な組織病理所見は、蝸牛全回転の血管条の高度萎縮、全回転の内外有毛細胞の高度消失、ラセン神経節細胞の中等度から高度萎縮、三半規管前庭感覚細胞の高度消失、耳石器感覚細胞の中等度から高度の消失、特に球形囊感覚細胞で消失が高度であった。

同症例の対側の側頭骨病理標本をEDTAにて脱灰後、パラフィン包埋後、切片を作成し、ホルマリン切片上にて、レーザーキャプチャー・マイクロダイセクションにて対象とする細胞を抽出し、当該細胞のミトコンドリア遺伝子変異の相対量を計測し、病理組織変化と対比する。

4. 研究成果

蛍光ビーズ・アレイPCR-Luminex®法を用いて、61種類のミトコンドリア遺伝子変異の有無を解析し、m.1555A>Gを11例、m.3243A>Gを9例、その他としてm.8348A>G、m.11778G>A、15498G>A、m.7444G>A、m.7472C>ins C変異を各々1名例検出した。この網羅的解析法により、臨床所見では診断が困難であったミトコンドリア遺伝子変異例を診断し、治療指針の確立に有用であった。また、61個のミトコンドリア遺伝子点変異の有無を同定して、日本人に見られる主要な12のハプログループとの関連を検索し、ハプロタイプD4bが、有意に健常者より遺伝性感音難聴発症に関与していると同定した。

ミトコンドリア遺伝子変異による難聴として代表的なtRNA^{Leu}(UUR)遺伝子の3243A>G変異の68歳女性のMELAS側頭骨標本を対象に、内耳細胞からの個別のDNA抽出法により、変異ミトコンドリア遺伝子量を定量解析し、3243A>G変異率は、有毛細胞は2.2%、血管条は2.4%、ラセン神経節細胞は26.6%であった。また、ホルマリン固定ヒト側頭骨標本のパラ

フィン包埋切片から、ラセン神経節細胞、外有毛細胞、ラセン神経節細胞をレーザーキャプチャにて採取し、RNAを抽出、COCHとSLC26A5のmRNAを解析した。

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56件)一覧は全て査読有

1. Nishio A, Noguchi Y, Sato T, Naruse T, Kimura A, Takagi A, Kitamura K: A *DFNA5* Mutation Identified in Japanese Families with Autosomal Dominant Hereditary Hearing Loss. *Ann Hum Genet* (in press)
2. Honda K, Noguchi Y, Kawashima Y, Takahashi M, Nishio A, Kitamura K: Ex Vivo Visualization of the Mouse Otoconial Layer Compared to Micro-computed Tomography. *Otol Neurotol*. (accepted)
3. Noguchi Y, Nishio A, Takase H, Miyanaga M, Takahashi H, Mochizuki M, Kitamura K. Audiovestibular findings in patients with Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Acta Otolaryngol*. 134(4):339-44, 2014
4. 野口佳裕, 伊藤卓, 川島慶之, 西尾綾子, 本田圭司, 喜多村 健: 前庭水管拡大症を伴う SLC26A4, ATP6V1B1, SIX1 変異例の聴平衡覚所見の検討. *Equilibrium Res* 72 (2) : 97-106, 2013
5. Kimura Y, Kubo S, Koda H, Shigemoto K, Sawabe M, Kitamura K: RNA analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) archival human temporal bone section using laser microdissection - A technical report. *Hear Res* 302: 26-31, 2013
6. 本田圭司, 野口佳裕, 加藤智史, 奥野秀次, 喜多村 健: 網羅的解析により診断された耳小骨奇形を合併したミトコンドリア 3243 変異例. *Otology Japan* 23(3) : 227-32, 2013.
7. Sumi T, Watanabe I, Tsunoda A, Nishio A, Komatsuzaki A, Kitamura K: Longitudinal study of 29 patients with Meniere's disease with follow-up of 10 years or more (In commemoration of Professor Emeritus Isamu Watanabe). *Acta Otolaryngol*. 2011 Nov 6. [Epub], *Acta Otolaryngol* 132: 10-5, 2012
8. Takahashi N, Tsunoda A, Shirakura S, Kitamura K: Anatomical feature of the middle cranial fossa in fetal periods: possible etiology of superior canal dehiscence syndrome. *Acta Otolaryngol*. *Acta Otolaryngol* 132: 385-90, 2012
9. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Fuku N, Ito T, Mikami E, Kitamura K and Tanaka M: Extended screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. *J Hum Genet*. 57:772-5, 2012
10. Kato T, Fuku N, Noguchi Y, Murakami H, Miyachi M, Kimura Y, Tanaka M and Kitamura K: Mitochondrial DNA haplogroup associated with hereditary hearing loss in a Japanese population. *Acta Otolaryngol*. 132: 1178-82, 2012
11. Noguchi Y, Ito T, Nishio A, Honda K, Kitamura K : Audiovestibular findings in a branchio-oto syndrome patient with a SIX1 mutation. *Acta Otolaryngol* Apr;131(4):413-8, 2011
12. Kitamura K, Nakamura Y, Noguchi Y, Takahashi M: Long term follow-up study of mastoid obliteration using bone pate in cholesteatoma. *The Journal of International Advanced Otology*, 7, (3), supplement 2, 42-3, 2011

13. Mochizuki E, Okumura K, Ishikawa M, Yoshimoto S, Yamaguchi J, Seki Y, Wada K, Yokohama M, Ushiki T, Tokano H, Ishii R, Shitara H, Taya C, Kitamura K, Yonekawa H, Kikkawa Y : Phenotypic and Expression Analysis of a Novel Spontaneous MYOSIN VI Null Mutant Mouse. *Exp Anim* 59(1) : 57-71, 2010
 14. 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* 120:166-171, 2010
 15. Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K : Hereditary hearing loss and deafness genes in Japan. *J Med Dent Sci* 57 : 1-10, 2010
 16. Abe S, Noguchi Y, Kitamura K: What do patients with hereditary deafness think of genetic studies? *Auris Nasus Larynx* 37 : 422-426, 2010
 17. 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*, 130 : 1002-1008, 2010
 18. Takahashi M, Kimura Y, Sawabe M, Kitamura K: Modified paraffin-embedding method for the human cochlea that reveals a fine morphology and excellent immunostaining results. *Acta Otolaryngol* 130 : 788-792, 2010
 19. Koda H, Kimura Y, Ishige I, Eishi Y, Takahashi K, Iino Y, Kitamura K : Quantitative cellular level analysis of mitochondrial DNA 3243A>G mutations in individual tissues from the archival temporal bones of a MELAS patient. *Acta Otolaryngol* 130 : 344-350, 2010 (電子出版 2009.8)
 20. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Ueno H, Hosoya H, Ito T, Kimura Y, Kitamura K and Tanaka M : Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. *J Hum Genet* 55 : 147-154, 2010
 21. Tsunemi T, Ishikawa K, Tsukui K, Sumi T, Kitamura K, Mizusawa H. The effect of 3,4-diaminopyridine on the patients with hereditary pure cerebellar ataxia. *J Neurol Sci.* 15;292(1-2):81-4.2010
 22. Yagi H, Noguchi Y, Kitamura K, Sato M : Deficiency of V1gr1 resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of V1gr1 knockout mice. *Neurosci Lett* 461 190-195, 2009
 23. Kawashima Y, Noguchi Y, Ito T, Kitamura K : Vestibular evoked myogenic potentials in patients with the mitochondrial A1555G mutation. *Laryngoscope* 119 1874-1879, 2009 他 33 件
- [学会発表](計 272 件)
1. Kato T, Noguchi Y, Kimura Y, Kitamura K: Comprehensive analyses for mitochondrial DNA in patients with hereditary hearing loss. 13th Triennial Meeting of the International Otopathology Society. Boston, USA June 9-11, 2013
 2. Kimura Y, Koda H, Kubo S, Shigemoto K, Arai T, Kitamura K: A case of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS); histopathology and mutational analysis of the temporal bone. 13th Triennial Meeting of the International Otopathology

- Society. Boston, USA June 9-11, 2013
3. Kitamura K, Takahashi N, Tsunoda A, Shirakura S: Anatomical feature of the middle cranial fossa in fetal periods causes superior canal dehiscence. 29th Politzer Society Meeting, Antalya Turkey, Nov 14- 17, 2013
 4. Kitamura K, Sato T, Noguchi Y, Nishio A, Naruse T, Kimura A, Takagi A: A DFNA5 mutation in two Japanese families with autosomal dominant hereditary hearing loss. 29th Politzer Society Meeting, Antalya Turkey, Nov 14- 17, 2013
 5. Kitamura K: Pitfalls of bone-anchored hearing aid (BAHA) surgery from 10-year experience in Japan. 18th Combined Congress of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. Gwangju, Korea October 19-20, 2012 (invited)
- 他国際学会発表 35、国内学会発表 232 件

〔図書〕(計 44 件)

1. 喜多村 健：言語聴覚士のための聴覚障害学 第1版第8刷 喜多村 健(編) 医歯薬出版, 2012.
2. 喜多村 健：第7章：聴覚・平衡機能系疾患の医療ニーズ 第3節特発性両側性感音難聴．稀少疾患/難病の診断・治療と製品開発．技術情報協会, 1027-30, 2012
3. 喜多村 健：3. 感染症．急性中耳炎．五十嵐隆(編)小児科診療ガイドライン-最新の診療指針-第2版:総合医学社, 120-24, 2011
4. 喜多村 健：D 感音難聴 2. 突発性難聴に対する抗ウイルス薬の根拠は？．池田勝久, 武田憲昭, 井ノ口 昭, 原渕保明, 丹生健一(編)2010-2011 EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の治療 中外医学社, 東京, 155-157, 2010 .
5. 喜多村 健：前庭・平衡神経系の構造と機能について．1 末梢前庭系c 第8脳神経．イラストめまいの検査 改訂第2版．日本平衡神経科学会(編) 診断

- と治療社, 東京, 102-103, 2009
6. 喜多村 健：難聴の遺伝子．医学のあゆみ 229(11)：1087-1088, 2009 他 38 件

〔産業財産権〕

- 取得状況(計 1 件)
- 名称：自然骨と酷似した切削性を有する人工骨モデルの製造方法
- 発明者：角田篤信、伊藤卓、喜多村健、大野秀則、杉山久幸
- 権利者：株式会社大野興業
- 種類：特許
- 番号：特許第 5215350
- 取得年月日：登録日平成 25 年 3 月 8 日
- 国内外の別：国内

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
- 喜多村 健 (KITAMURA KEN)
- 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
- 研究者番号：90010470

(2)研究分担者

- 木村 百合香 (KIMURA YURIKA)
- 東京都健康長寿医療センター・研究所・研究員
- 研究者番号：40450564

(3)野口 佳裕 (NOGUCHI YOSHIHIRO)

- 東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
- 研究者番号：50282752

(4)研究分担者

- 田中 雅嗣 (TANAKA MASASHI)
- 東京都健康長寿医療センター・研究所・研究部長
- 研究者番号：60155166

(5)研究分担者

- 加藤 智史 (KATO TOMOFUMI)
- 東京都健康長寿医療センター・研究所・研究員
- 研究者番号：80469965