

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 30日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791887

研究課題名（和文） メニエール病発症関連遺伝子多型の同定

研究課題名（英文） Candidate gene association study of Meniere's disease

研究代表者

福岡 久邦（FUKUOKA HISAKUNI）

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90419391

研究成果の概要（和文）：

メニエール病は回転性めまいと難聴・耳鳴・耳閉感の症状が同時に重なる症状を繰り返す内耳疾患であり、内リンパ水腫が原因であることが示唆されているが、その発症メカニズムに関しては良く分かっていないのが現状である。本研究では、低音障害感音難聴を呈するメニエール病の原因となる遺伝子多型を同定するために、信州大学が中心となって行っている「難治性内耳疾患の遺伝子バンク構築研究」と連携し、すでにインフォームドコンセントを取得のうえ、採血にて得られたメニエール病患者約200例のDNAサンプルを使用して遺伝子相関解析を行った。その結果、1次解析では19SNPsのうち5SNPsで有意差が認められた。1次解析で有意差の認められたSNPsに関して症例を追加して2次解析を行ったところ、メニエール病患者群とコントロール群との間に有意差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：

Meniere's disease (MD) is an idiopathic disorder of the inner ear characterized by fluctuating sensorineural hearing loss (SNHL), tinnitus, aural fullness, and recurrent spontaneous episodic rotational vertigo. Meniere's disease has been thought to be attributable to endolymphatic hydrops (ELH), but the mechanism of the endolymphatic hydrops was unknown. Many genes, like water channel or potassium ion channel was reported to associate with Meniere's disease but there was small amount of patients were analyzed in these reports. In this study, we performed gene association study with 200 Meniere's disease patients and 100 control. In first screening we identified 5 significantly associated SNPs but all of them did not associate significantly in second screening.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：耳科学、平衡医学、メニエール病、内耳、難聴、内リンパ水腫

1. 研究開始当初の背景

メニエール病は回転性めまいと難聴・耳鳴・耳閉感の症状が同時に重なる症状を繰り返す

内耳疾患であり、厚生省調査研究班の報告によると、罹患者は女性に多く、発症年齢は30歳台後半から40歳台前半にピークを持

ち、厳密な診断基準に沿った有病率は人口 10 万人当たり 15~18 人程度とされている。

メニエール病の病態に関しては、内リンパ水腫が原因と考えられるようになってきたが、その誘因については明らかではない。これまでに、ウイルス感染、片頭痛、自己免疫疾患、循環障害、アレルギー疾患などの多くの疾患がメニエール病の病態に関連があるとの報告がなされているが、いずれも世界的なコンセンサスを得るに達していない。

また、メニエール病の遺伝的背景に関する研究としては、水チャンネルであるアクアポリン (AQP) やカリウムイオンチャンネルなどの遺伝子の解析が行われており、メニエール病の発症に遺伝的要因も強く関わっているとされているが (土井ら 2008、Jeffrey et al. 2008)、いずれも非常に少数サンプルの解析であり未だ解明には至っていない。

このように、発症メカニズムが明らかと成らない原因の一因として、メニエール病の診断が自覚症状を中心になされており、他覚的検査法に基づく診断がなされるケースが乏しいことが挙げられる。

現在のメニエール病の診断基準は「耳鳴、難聴に伴い回転性めまいが反復すること」とされており、患者の訴えのみで診断されるケースが多い。この診断基準は簡便であるが、申告のみに依存するなど正確性に問題があることが予想される。

近年、メニエール病 (内リンパ水腫) の診断に MRI での画像診断が有効である報告がなされており、当施設でも MRI によるメニエール病の診断を行い、その有効性について徐々に明らかとなってきた。

また、遺伝子に関しては、水チャンネルであるアクアポリン (AQP) やカリウムイオンチャンネルなどの遺伝子の解析が行われていたが、いずれも非常に少数サンプルの解析であり、より多いサンプルでの解析が必要な状況であった。

2. 研究の目的

メニエール病は回転性めまいと難聴・耳鳴・耳閉感の症状が同時に重なる症状を繰り返す内耳疾患であり、難治性疾患に指定されている疾患である。

厚生労働省調査研究班の報告によると、罹患者は女性に多く、発症年齢は 30 歳後半から 40 歳前半にピークを持ち、厳密な診断基準に沿った有病率は人口 10 万人当たり 15~18 人程度とされている。

メニエール病の発症メカニズムとしては、ウイルス感染、片頭痛、自己免疫疾患、循環障害、アレルギー疾患などの多くの疾患が関与することが報告されているが、未だ明らかとなっていない。

また、メニエール病の遺伝的背景に関する研究としては、水チャンネルであるアクアポリン (AQP) やカリウムイオンチャンネルなどの遺伝子多型を用いた遺伝相関解析が行われており、メニエール病の発症に遺伝的要因が強く関わっているとされていることが報告されているが (土井ら 2008、Jeffrey et al. 2008)、いずれも非常に少数サンプルの解析であり、より多いサンプルでの解析が必要な状況である。特に、発症には遺伝的要因と環境要因の組み合わせにより発症する多因子疾患と考えられているため、その遺伝的背景の検討に関しては多数のサンプルでの解析が必要である。

本研究では、全国共同研究施設よりメニエール病患者の臨床情報および遺伝子サンプルの収集を行い、メニエール病患者 200 名を対象に、メニエール病との関連が指摘されている多型を中心に、メニエール病の原因となる遺伝子多型を解析するとともに、コントロール集団での遺伝子型との頻度の比較を行う事で、メニエール病の関連遺伝子多型を同定することを目的とした。遺伝子多型の選定には、Hapmap JAPAN のデータを参考に、日本人の連鎖不平衡ブロックを基準に頻度の高い遺伝子多型を選択して解析を行うものとした。

また、メニエール病患者の遺伝子解析により関連性が見いだされた遺伝子を中心に、MRI 画像による内リンパ水腫の評価を行い、画像診断的にメニエール病と診断された患者約 50 名を対象に同様の遺伝子相関解析を行い疾患関連遺伝子を特定する事も目的とした。

3. 研究の方法

前述のように、メニエール病の遺伝的背景に関する研究としては候補遺伝子の多型を用いた遺伝相関解析が行われており、いくつかの遺伝子の関与が報告されているが、いずれも少数サンプルの解析であり、より多いサンプルでの解析が必要な状況である。特に、発症には遺伝的要因と環境要因の組み合わせにより発症する多因子疾患と考えられているため、その遺伝的背景の検討に関しては多数のサンプルでの解析が必要である。

メニエール病の有病率は人口 10 万人あたり 15~18 人程度とされており、単独施設での対象患者の収集は数に制限があり関連解析は困難とされるため、本研究では、全国共同研究施設よりメニエール病患者の臨床情報および遺伝子サンプルの収集を行い、メニエール病患者 200 名を対象に、メニエール病との関連が指摘されている多型を中心に、メニエール病の原因となる遺伝子多型の関連解析を行った。

遺伝子多型の解析には、過去にメニエール病との関連が報告されている SNPs に関しては、同一部位の SNPs を、突発性難聴や脳血管障害など他の疾患との関連が示唆されている SNPs に関しては同一 SNPs もしくは、HapMap プロジェクトの JPT (日本人コントロールサンプル) の連鎖ブロック情報を基に同一ハプロブロックの代表となる SNPs (Tag SNPs) を解析した。遺伝子型の決定には、Applied biosystems 社の TaqMan Genotyping Assays より SNP 検出用の probe をカスタム合成して用いた。アッセイは、Applied biosystems 社の TaqMan Genotyping Master Mix を用い、StepOne Plus システムを用いて決定した。

本研究では、検出力を高める目的で 2 段階絞り込み法による解析を行った。1 次解析では、メニエール病患者 96 名の遺伝子型を TaqMan Genotyping 法で決定し、決定された遺伝子型の頻度をアレル頻度情報に変換し、HapMap プロジェクトの JPT データ (48 名) をコントロールしてアレル頻度および遺伝子型の頻度差を χ^2 検定により有意差のある SNPs を同定した。

また、2 次解析では、1 次解析により有意差の認められた SNPs のみを対象に、メニエール病患者をさらに 84 名加え 180 名とするとともに、信州大学の管理するコントロールサンプル 96 名の遺伝子型を決定し、同様にアレル頻度および遺伝子型の頻度差を χ^2 検定を用いて解析した。

Function	Gene/Protein
water channel	AQP2, AQP3, AQP4, AQP5
K ⁺ transport within stria vascularis	KCNE1, KCNE3
HSV entry/transcription	HCFC1
HSV susceptibility/reaction	CASP3, RENBP
others	PON1, UCP2, CFH, PADI4, IL4R, SOD1

表 1 : 解析した遺伝子一覧

過去にメニエール病との関連が報告されている水チャンネル遺伝子、カリウムイオン輸送関連遺伝子、ウイルス感染関連遺伝子、脳梗塞や心筋梗塞などの循環障害関連遺伝子などの多型の解析を行った。

4. 研究成果

「メニエール病」や最近注目されている「急性低音障害型感音難聴」など低音部が中心に障害される感音難聴は、その他の感音難聴と発症メカニズムや病態が異なると考えられているが現在までのところ良く分かっていないのが現状である。

本研究では、全国共同研究施設よりメニエール病患者の臨床情報および遺伝子サンプルの収集を行い、メニエール病患者 200 名を

対象に、メニエール病との関連が指摘されている多型を中心に、メニエール病の原因となる遺伝子多型を解析するとともに、コントロール集団での遺伝子型との頻度の比較を行う事で、メニエール病の関連遺伝子多型を同定することを目的に解析を行った。

本研究では、検出力を高める目的で 2 段階絞り込み法による解析を行った。1 次解析では、メニエール病患者 96 名の遺伝子型を TaqMan Genotyping 法で決定し、決定された遺伝子型の頻度をアレル頻度情報に変換し、HapMap プロジェクトの JPT データ (48 名) をコントロールしてアレル頻度および遺伝子型の頻度差を χ^2 検定により有意差のある SNPs を同定した。その結果、解析を行った 15 遺伝子 19 SNPs のうち、PON1、UCP2、PADI4、IL4R、SOD1 遺伝子多型において有意差が認められた。一方、過去の報告で関連が示唆されていた水チャンネル遺伝子やカリウムイオンチャンネル遺伝子では有意差が認められなかった。

SNPs	Gene	χ^2 p-value	
		Alleles	Genotypes
rs467199	AQP2	0.347	0.564
rs3759126	AQP2	0.172	0.351
rs2227285	AQP3	0.757	0.072
rs162004	AQP4	0.684	0.325
rs3736309	AQP5	0.668	0.748
rs3759129	AQP5	0.690	0.623
rs2834502	KCNE1	0.329	0.688
rs1805127	KCNE1	0.670	0.247
rs2270676	KCNE3	0.304	0.169
rs17421	HCFC1	0.329	0.088
rs762653	HCFC1	0.602	0.296
rs1049316	CASP3	0.076	0.074
rs2269372	RENBP	0.842	0.514
rs800292	CFH	0.255	0.235
rs662	PON1	0.002	0.007
rs660339	UCP2	0.029	0.045
rs1748033	PADI4	0.007	0.007
rs1801275	IL4R	0.010	0.009
rs4998557	SOD1	0.000	0.001

表 2 : 1 次解析の結果

遺伝子解析の結果、解析を行った 15 遺伝子 19 SNPs のうち、PON1、UCP2、PADI4、IL4R、SOD1 遺伝子多型において有意差が認められた。一方、過去の報告で関連が示唆されていた水チャンネル遺伝子やカリウムイオンチャンネル遺伝子では有意差が認められなかった。(p-value は Bonferoni 補正前の値を示す)

また、2 次解析では、1 次解析により有意差の認められた SNPs のみを対象に、メニエール病患者をさらに 84 名加え 180 名とするとともに、信州大学の管理するコントロールサンプル 96 名の遺伝子型を決定し、同様にアレル頻度および遺伝子型の頻度差を χ^2 検定を用いて解析した。その結果、1 次解析による有意差の認められた 5 遺伝子 5 SNPs を対象に別の患者集団およびコントロールを用いて遺伝子型の解析を行ったところ、いずれにおいても有意差が認められなかった。

過去の報告でメニエール病との関連が示唆されていた水チャンネル遺伝子およびカリウムイオンチャンネル遺伝子多型において再現性のあるデータが得られなかったことより、メニエール病のような多因子疾患の場合、遺伝子だけでなく環境要因による影響の可能性もあるため、今後、さらに解析対象人数を増やすとともに、解析対象遺伝子を増やすことにより、メニエール病の発症に関与する遺伝子を同定することが可能となり低音障害型感音難聴のメカニズム解明が期待される。

SNPs	Gene	X ² p-value	
		Alleles	Genotypes
rs662	PON1	0.512	0.760
rs660339	UCP2	0.238	0.268
rs1748033	PADI4	0.626	0.501
rs1801275	IL4R	0.051	0.123
rs4998557	SOD1	0.621	0.740

表 3 : 2 次解析の結果

1 次解析による有意差の認められた 5 遺伝子 5SNPs を対象に別の患者集団およびコントロールを用いて遺伝子型の解析を行ったところ、いずれにおいても有意差が認められなかった。(p-value は Bonferoni 補正前の値を示す)

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 1 件)

①Fukuoka H, Takumi Y, Tsukada K, Miyagawa M, Oguchi T, Ueda H, Kadoya M, Usami S. Comparison of the diagnostic value of 3T-MRI after intratympanic injection of GBCA, electrocochleography, and glycerol test in patients with Meniere's disease. Acta Otolaryngol.132: 141-145. 2012 査読あり
doi: 10.3109/00016489.2011.635383.

[学会発表] (計 5 件)

①Fukuoka H, Takumi Y, Miyagawa M, Oguchi T, Usami S, Ueda H, Kadoya M. Comparison of the diagnostic value of 3T-MRI after intratympanic injection of GBCA in patients with Meniere's disease. 27th Barany Society Meeting 2012. 6. 10-13 Uppsala, Sweden

②Fukuoka H. Comparison of the diagnostic value of 3T-MRI after intratympanic injection of GBCA, electrocochleography, and glycerol test in patients with

Meniere's disease. The 14th Japan-Krea Joint Meeting 2012. 4. 12-14 京都

③福岡久邦 3 T-MRI を用いた内リンパ水腫の診断 第 8 回信越耳鼻咽喉科セミナー 2012. 3. 3 白馬

④福岡久邦, 工 穰, 宮川麻衣子, 塚田景太, 宇佐美真一 画像により、イソソルビドの内リンパ水腫軽減効果を確認できた 1 例. 第 70 回日本めまい平衡医学会総会 2011. 11. 16~18 ニューオータニ幕張

⑤福岡久邦, 工 穰, 宮川麻衣子, 塚田景太, 小口智啓, 宇佐美真一メニエール病の診断における 3 T-MRI の有用性 第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会 2011. 6. 23~24 松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福岡 久邦 (FUKUOKA HISAKUNI)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90419391

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし