

平成 2 6 年 6 月 1 1 日現在

機関番号：3 1 2 0 1

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：2 4 7 9 1 8 0 2

研究課題名（和文）老人性難聴に関するミトコンドリア遺伝子多型ならびに酸化ストレスの検討

研究課題名（英文）Research of oxidative stress and mitochondrial gene polymorphism in presbycusis

研究代表者

嶋本 記里人（Shimamoto, Kirito）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：8 0 6 0 9 6 7 8

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円、（間接経費） 810,000 円

研究成果の概要（和文）：老人性難聴群においてミトコンドリアの12SrRNAを含むOXHOS構成領域での13部位の遺伝子が統計学的に有意であった。一方、BAP値は年齢には比例してBAP値の低値（平均833 $\mu\text{mol/l}$ ）を認めたが、SNPとの相関はみられず、d-ROM値も同様にSNPとの関連は認められなかった。

外来受診患者数の減少で、また震災による影響もあり、対象となり得る症例が減少しているため、対象の確保数は予定より少なかった。対象の方の震災が原因の生活上の障害が目立ち、また1つ1つの研究過程で影響あるものもあり、今後も、研究体制とともに地方における対象の確保を重要事項として対応していきたい。

研究成果の概要（英文）：13 genes OXHOS site at the construction area, including the mitochondrial 12SrRNA was statistically significant in presbycusis group. On the other hand, BAP values were found low levels of BAP values (average 833 nano mol/l) in proportion to age, there was no correlation with the SNP. d-ROM value was also not observed in the context of the SNP as well.

Because there is the influence of the earthquake also, a decrease in outpatient visits number of patients, cases that can be a target has been reduced, ensuring the number of subjects was less than expected. There is also some influence in the research process one by one earthquake in the direction of the target, and also conspicuous failure of the life of the cause, in the future, we would like to support as important matters to ensure the target in rural areas along with the research system.

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：老人性難聴 FRAS4 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

老人性難聴は先進諸国では高齢者人口 35% 以上が統計学的に発症しているとされ、我が国においては高齢者人口 2958 万人 8) のうち約 1035 万人が罹患していると考えられる。超高齢化社会に突入した我が国において、老人性難聴は高齢者の社会生活に広く影響を及ぼすことから、将来的に特に重要な疾患の 1 つであろう。

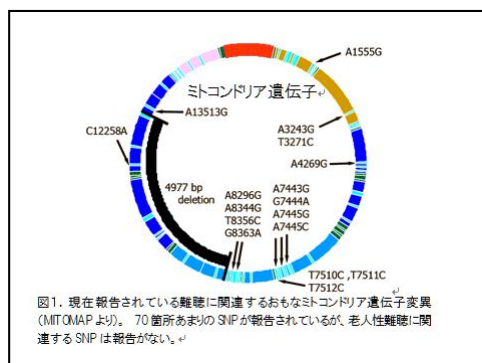
一方、ミトコンドリアは ATP 合成によりエネルギー代謝に必要不可欠であるが、特に聴覚器すなわち蝸牛組織における有毛細胞や血管条といった組織ではエネルギー消費が激しくミトコンドリア機能の重要性は大きい。また、老人性難聴は多様性が大きく、発症時期や聴力障害の程度も様々であり、これはミトコンドリア遺伝子変異を伴う疾患群に認められる多様性と類似している。

そこで今回我々は、老人性難聴の病態を解明する 1 つの先駆けとして、ミトコンドリアに焦点を当て、高齢者におけるミトコンドリア遺伝子変異ならびに酸化ストレスと老人性難聴における聴覚障害との関連を検討することを目的とした。

2. 研究の目的

近年、ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) の変異が様々な疾患の病因であることが明らかにされてきた。糖尿病に感音難聴を随伴する A3243G 変異や、アミノ配糖体への暴露により不可逆的な進行性感音難聴を呈する A1555G 変異など、聴力障害の合併が多く報告されている 1-7)。しかし、今日まで老人性難聴に関連する mtDNA の多型解析はなされていない。

一方でミトコンドリアは老化に伴い上昇する酸化ストレスに直接的に関係すると考えられており、アンチエイジング領域においてはミトコンドリア説として広く定着している。



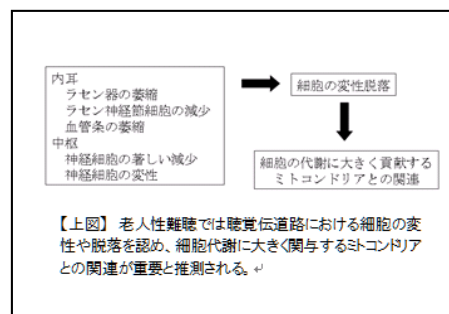
今回我々の研究では 65 歳以上の高齢者を対象とし、分子生物学的手法を用い mtDNA 遺伝子多型を含む遺伝子変異の検索と臨床耳科学的な視野を含めた比較検討、さらにミトコンドリア代謝に関連する酸化ストレスの測定を行うことにより、老人性難聴者に特異的なミトコンドリア遺伝子多型を検索し、酸化ストレスの関与を検出することを目的と

する。

当研究における最終的な目標は、老人性難聴患者に特異的な mtDNA 変異、特に SNPs を見出し、今後拡大していく聴力障害に関連する遺伝子創薬領域、アンチエイジング領域での石杖のひとつを築くことである。

組織学的分類	主な障害
蝸牛感覚細胞障害型	蝸牛の有毛細胞の障害
蝸牛神経変性型	ラセン神経節細胞の障害
蝸牛血管系萎縮型	蝸牛の血管系の萎縮
蝸牛低音障害型	基底核の物理的変化に由来
混合性	

【上表】 (Schuknecht, et al. 1995)。
老人性難聴の側頭骨病理組織学的分類。聴覚器における多くの部位で、多様な細胞の変性や脱落を認める。



文献

- 1) S. Sawada S, et al. Am. J. Otol. 1997;18:332-335
- 2) H.C. Lee, et al. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:372-374
- 3) A. Pandya, et al. Am. J. Genet. 1999;65:1803-1806
- 4) G. Silvestri, et al. NEUROLOGY 2000;54:1693-1696
- 5) M. Mancuso, et al. Acta Neurol Scand 2004;110:72-74
- 6) T. Tsuiki, et al. Ann Otol Rhinol Laryngol 1997;106:643-648
- 7) G.C.Kujoth, et al. Science 2005;309:481-484
- 8) 厚生労働省, 高齢社会白書(2011). 2011.
- 9) Ohtsuka, H., et al. Iwate Med Assoc 59, 193-203. 2007.
- 10) Shimamoto K., Ohtsuka H., et al. Iwate Med Assoc 63(5), 263-269, 2011.

3. 研究の方法

【研究計画に沿った研究前準備】

本研究遂行においては、岩手医科大学医学部の倫理委員会の承認を得た説明内容ならびに説明文書を用い (現在申請中) 耳鼻咽喉科外来を受診された 65 歳以上の個人を対象として行われる。また、対象者の個人情報、プライバシーの厳重な保護が必要不可欠であるため、全ての情報は連結可能匿名化を行ったのち、ネットワーク環境とは隔離された

コンピューター上（起動パスワード付）で情報管理を行う（現在システム構築済）。

平成 24 年度は、STEP1 ならびに STEP2 を計画に沿って進めるが、より STEP1 に重点を置いて遂行する。（これまでの経験から、臨床現場での対象確保は平均で一週間に 6 症例であるため、予定対象数確保には約 8 ヶ月を要すると推測される。）

- 対象確保と対象情報管理（STEP1）

- 対象の設定は岩手医科大学耳鼻咽喉科外来を受診した 65 歳以上の老人性難聴を伴う高齢者と伴わない高齢者、それぞれ 96 名、併せて 192 名を希望対象数とする。

- 倫理委員会の承認を得た説明内容また説明文書を用いて、当研究がヒト遺伝子研究である旨を十分にご理解頂いたうえで、ご承諾ならびにご捺印を得られた方のみを対象とする。

- インフォームドコンセント内容として、以下の点に承諾頂く。対象者には、事前に当研究の要旨を十分に理解いただき、氏名、検査結果ならびに遺伝子情報（mtDNA）を含む個人情報厳重管理下に置くとともに一切公表をしない旨、また個人情報を除外した情報は統計学的な処理を施行後、個人が特定し得ない形式で当研究の報告として学術誌などで発表する旨、さらに検体に関しては研究の目的以外には使用せず、研究終了と同時に破棄する旨に承諾頂く。

- 対象の方には 岩手医科大学耳鼻咽喉科外来および聴力検査室にて聴力検査ならびに上肢末梢静脈より 2cc の採血を施行する。得られた検体は当院内の探索的研究施設（P3）内の-81 の冷凍庫にて保管する。また、確保された対象における全ての情報は匿名化の上、ネットワーク環境とは隔離されたコンピューターに保管する。

- 酸化ストレス測定（STEP2）

- BAP, d-ROMs 測定；得られた末梢全血より、Free Radical Analytical System（FRAS4®: WISMERLL）を用いて、血漿中の活性酸素量（d-ROMs test）と抗酸化物質（BAP test）を測定する。なお測定装置は現有設備である（耳鼻科外来設置）。

- ミトコンドリア遺伝子解析（STEP3）

- mtDNA 抽出；得られた末梢全血液より、市販の抽出キット（QIAGEN DNA mini kit®）を用いてミトコンドリア遺伝子を抽出する。（遺伝子解析室（共同施設）を使用）

- PCR；ミトコンドリア遺伝子の全領域を増幅するために、増幅産物長（600bp～980bp）ならびに隣り合う増幅産物同士の重複領域（200bp）を考慮した 24 セットのプライマーを用いた PCR（polymerase chain reaction）法を行う。サーマルサークルは現有設備であり、遺伝子解析室（共同施設）を使用する。

- シーケンシング；各 24 個の増幅産物をダイレクトシーケンスすることでミトコンドリアフルゲノム配列解析を行う。BDT v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）

ならびに Applied Biosystems 3130 Avant Genetic Analyzer にて配列解析を行う。なお、ダイレクトシーケンサーは現有設備であり、遺伝子解析室（共同研究施設）にて行う。

平成 25 年度は STEP1、STEP2 ならびに STEP3 を継続して行うが、より STEP2 に重点を置き進行させる。

- ミトコンドリア遺伝子多型解析（STEP3 続き）

- 配列アライメント；各検体で得られたミトコンドリアフルゲノム塩基配列情報はマルチプルアライメント解析ソフト ClustalX を用いて配列アライメントを行う。アライメント終了後の配列データを用い遺伝子多型検索ならびに同定を行う。

- 多型解析；得られた塩基配列情報から同定された遺伝子多型（SNP）部位を、各対象の聴力検査結果と併せて、臨床耳科学的視点から検討する。

- SNP（想定数 600 箇所）の出現頻度解析により健聴高齢者群に比し老人性難聴群に特異的な SNP の同定を行う。

- アミノ酸置換を伴う非同義置換 SNP（想定数 200 箇所）を基盤としてハプロタイプ解析を行う。聴覚検査像と併せて、聴力障害に関連する可能性のあるハプロタイプの同定を行う。

以上、STEP1、STEP2、STEP3 の研究遂行に必要な設備は当院の耳鼻咽喉科外来、遺伝子解析室（共同研究施設）、探索的研究施設（P2、P3 完備）の現有施設で対応可能である。

- STEP1、STEP2、STEP3 を平成 25 年度に終了し、国内外での口演・論文発表を行う。さらに、報道機関を通して社会へ報告を行い、今後のさらなる研究進展を請う。

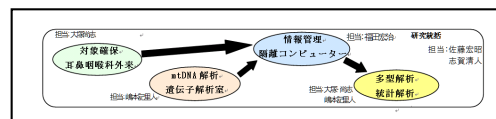
【研究体制】

本研究計画を遂行するための研究体制を以下に記した。

- 本研究課題では情報管理の点から 1 名の医員（大塚尚志）が STEP1 を行う。この際、検体情報の匿名化も同時に行う。

- 全ての情報管理は担当者（福田宏治）が厳重に管理し、情報漏洩の無いよう体制をとる。

- STEP3 では担当（大塚尚志、嶋本記里人）が解析を行う。



【計画どおりに進まない時の対応】

技術的な問題で研究計画が障害される可能性はない。しかし、研究計画の障害要因として以下の点が考えられ、随時対処していく予定である。

- 対象確保数の不足：受診者数の減少時に、対象候補者も減少し対象確保が困難になりうる。

他科外来受診患者や他科入院患

者への御協力の申請を行う。(倫理委員会への申請が新たに必要なる)

○学術的解釈の障壁：得られた結果の学術的解釈に混迷する可能性。

本研究においては、聴覚生理学に精通している佐藤宏昭先生、ならびに酸化ストレスを主研究としている菊池淳先生に、適時指導を仰ぐことが可能な体制である。

4. 研究成果

平成 24 年度は研究計画書の研究計画に沿って遂行した。対象確保と対象情報管理 (STEP1) 外来を受診した 65 歳以上の老人性難聴を伴う高齢者と伴わない高齢者、それぞれ 96 名、併せて 192 名を希望対象数としているが、今日までに計 160 名(老人性難聴群 84 名、健聴高齢者群 76 名)を確保した。各対象には倫理委員会の承認を得た説明内容また説明文書を用いて、ご承諾ならびにご捺印を得られた方のみを対象とした。また、対象には聴力検査ならびに上肢末梢静脈より 2cc の採血を施行し、得られた検体は当院内の探索的研究施設 (P3) 内の -81 の冷凍庫にて保管している。また、確保された対象における全ての情報は匿名化の上、ネットワーク環境とは隔離されたコンピューターに保管管理した。

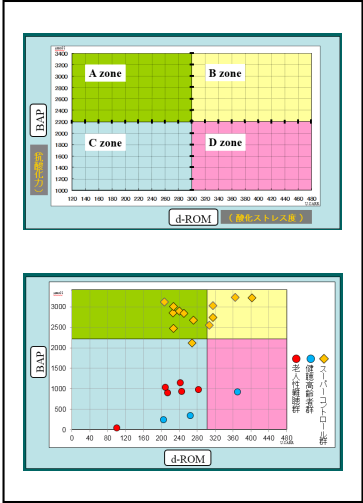
酸化ストレス測定 (STEP2) は得られた末梢全血より、Free Radical Analytical System (FRAS4R: WISMERLL) を用いて、血漿中の活性酸素量 (d-ROMs test) と抗酸化物質 (BAP test) を測定した。ミトコンドリア遺伝子解析 (STEP3) の mtDNA 抽出、PCR、シーケンシングにおこない、SNP を検出した。検出した SNP と BAP 値、d-ROMs 値を統計学的に解析した。

結果、老人性難聴群においてミトコンドリアの 12SrRNA を含む OXROS 構成領域での 13 部位の遺伝子が統計学的に有意であった。

Table 2. Detected SNPs with statistical significance.					
Gene	Nucleotide position	Significant SNPs ($p < 0.05$)		Number	
		Nucleotide substitution	Amino acid substitution	Presbycusis (n=76)	Control (n=81)
12S rRNA	676	G/C	-	3	0
	961	insC	-	8	0
16S rRNA	2831	G/A	-	0	3
ND1	3434	A/G	thr/leu	3	0
ND2	4833	A/G	thr/ala	2	7
	5108	T/C	-	2	7
COII	7600	G/A	-	0	3
COIII	9377	A/G	-	0	3
	9575	G/A	-	0	3
ATP6	8684	C/T	-	0	3
ND4	11696	G/A	val/ile	4	0
	12007	T/C	val/ile	3	0
ND5	12361	A/G	thr/leu	4	0
	13563	A/G	-	0	3
Cytb	15874	A/G	-	5	1

thr: threonine, ala: alanine, val: valine, le: leucine. Bold: non-synonymous mutation

一方、BAP 値は年齢には比例して BAP 値の低値 (平均 833 $\mu\text{mol/l}$) を認めたが、SNP との相関はみられず、d-ROM 値も同様に SNP との関連は認められなかった。



外来受診患者数の減少で、また震災による影響もあり、対象となり得る症例が減少しているため、対象の確保数は予定より少なかった。対象の方の震災が原因の生活上の障害が目立ち、また1つ1つの研究過程で影響あるものもあり、今後も、研究体制とともに地方における対象の確保を重要事項として対応していきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

〔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

嶋本 記里人 (Shimamoto Kirito)

岩手医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

研究者番号：80609678

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：