

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20199

研究課題名(和文) 新規ミトコンドリア遺伝子変異による難聴の解析と難聴発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Research on clinical feature and onset mechanism of deafness caused by mitochondrial DNA mutations

研究代表者

矢野 卓也 (Yano, Takuya)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：10511058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア遺伝子変異による難聴は、両側性感音難聴の2～3%に及ぶとされており、聴覚機能の維持にミトコンドリアが深く関与することは明らかになっているが、ミトコンドリア遺伝子変異により難聴を発症する詳細なメカニズムは未だ不明である。  
本研究では、難聴患者400名のミトコンドリア遺伝子解析を行うとともに、その臨床的特徴に関する詳細な分析を行った。その結果、日本人難聴患者における変異の種類と、頻度、また臨床的特徴を明らかにすることができた。また、ミトコンドリア遺伝子変異を持つ難聴患者由来の培養細胞を用いて、難聴発症のメカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：causative mitochondrial DNA (mtDNA) mutations have been found in 50% of patients with postlingual nonsyndromic hearing loss.  
In this study, we performed DNA sequencing analysis of whole mitochondrial genome for 400 unrelated Japanese hearing loss patients. As a result, we obtained the mutation spectrum and frequency of mitochondrial mutations in Japanese hearing loss patients and we also clarified clinical feature of each mitochondrial mutations. m.1555A>G mutation was preferentially observed in late onset mild to moderate hearing loss cases, whereas, m.3243A>G mutation was observed among wide range of clinical phenotype patients. In addition, we also established cell line from mitochondrial mutation patient and analyzed its function.

研究分野：耳鼻咽喉科学 耳科学

キーワード：難聴 遺伝子 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは呼吸代謝の役目を担う細胞内小器官であり、電子伝達系による ATP 産生は生命活動のエネルギー源となっている。ミトコンドリア DNA の塩基置換はさまざまな疾患の原因となることが知られており、ミトコンドリア脳筋症、糖尿病の原因であることが明らかになっている。

また、日本人の原因不明の両側性感音難聴の 2~3% に、ミトコンドリア遺伝子変異が認められるとされており、現在までに 93 種類の変異が報告されているが、このうち難聴の原因であることが証明されているのは、m. 1555A>G、m. 3243A>G、m. 7445A>G、m. 8296A>G など 9 種類であり、84 種類については未だ明らかになっていない。

このように、聴覚の機能維持にミトコンドリアの機能が深く関与することが知られているが、m. 1555A>G 変異のように難聴のみ出現する変異と、m. 3243A>G 変異のように難聴だけでなく糖尿病やミトコンドリア脳症といった症候群の原因となる変異があり、なぜ変異の種類により臨床像が異なるのかといった詳細な発症メカニズムは未だ不明な状況であった。

また、ミトコンドリア遺伝子変異に対する、効果的な治療法は確立されておらず治療法の開発が望まれている。近年、ミトコンドリア病に対する新しい治療法として水素水の有効性が報告されるようになってきた。水素は従来より潜函病の発症予防に使われており、人体には無害な不活性ガスである。体内に取り込まれた水素分子は、①高い拡散速度と透過性を持ち、②細胞毒性の高い活性酸素種/ラジカルとのみ反応するという特徴がある。

また、脳、眼、心臓等の虚血再還流障害、臓器移植、放射線障害等に対して、水素ガスの吸引、水素溶存生理食塩水の血中投与といった方法を用いてそれぞれの障害が抑制されることが報告されている。また、難聴においても騒音性難聴モデルマウスの難聴を軽減させたとの報告がある (Lin Y et al. 2010)。

本研究では、日本人難聴患者におけるミトコンドリア遺伝子変異の網羅的解析と、遺伝性難聴患者由来の培養細胞を利用し、難聴発症メカニズムの解明とその治療法の確立を目指す。特に治療法に関しては活性酸素種の増加が聴細胞に障害をもたらす、聴力低下をもたらすと考えられているため、抗酸化物質によりミトコンドリア難聴の軽減が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本人難聴患者におけるミトコンドリア遺伝子変異による難聴の全体像、特に見出される遺伝子変異の種類と頻度に

関して明らかにすることを目的に、日本人難聴患者 400 名のミトコンドリア遺伝子解析を行うとともに、その詳細な臨床情報の分析を行い、各遺伝子変異による難聴の臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

また、ミトコンドリア遺伝子変異を持つ難聴患者由来の培養細胞を用いて、その呼吸活性やタンパク質合成活性などを検討することにより、難聴発症のメカニズムを明らかにすることおよび治療法開発に向けた基盤を整えることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 日本人難聴患者に認められるミトコンドリア遺伝子変異の解析

当研究室が管理する日本人難聴患者 DNA バンク (約 6500 例) のうち、インバーダー法を用いた難聴スクリーニング検査で原因の明らかとならなかった難聴患者 400 名を対象に、ミトコンドリア DNA の解析を行い、ミトコンドリア DNA 全塩基配列を決定した。ミトコンドリア DNA の全塩基配列決定には、専用のプライマーを用いた Long PCR 法により、ミトコンドリア全長 16Kb を 8Kb ずつの 2 つの断片として増幅し、シークエンス用のプライマーを用いて直接シークエンス法により塩基配列決定を行った。ミトコンドリア配列決定用のプライマーは、Applied Biosystems 社の mitoSEQr Resequencing System の塩基配列と同等のオリゴヌクレオチドを用いた。

なお、ミトコンドリア DNA には多型が多く疾患と無関係な変異も多数存在することが明らかとなっていることより、財団法人岐阜国際バイオ研究所が管理するミトコンドリアゲノム多型データベースおよび国際的に疾患と関連するミトコンドリア遺伝子変異のデータベースである MitoMap を参考に、日本人健常者に認める多型を除いて解析を行った。

### (2) ミトコンドリア遺伝子変異による難聴発症メカニズム

また、ミトコンドリア遺伝子変異により難聴のみが生じるモデルとして、ミトコンドリア m. 1555A>G 遺伝子変異に着目し、共同研究により患者由来の培養細胞を作成し、遺伝子解析を行うとともに、呼吸活性等の測定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 日本人難聴患者に認められるミトコンドリア遺伝子変異の解析

研究初年度に、当教室の管理する難聴患者 DNA バンク (約 6500 名) のうち、717 例を対象に、インバーダー法+次世代シークエンス法

を用いた 19 遺伝子 154 変異の網羅的スクリーニング検査を行い原因遺伝子変異の種類と頻度を明らかにした (Mori et al., 2016)。

その結果、日本人難聴患者 717 例のうち、ミトコンドリア遺伝子 m. 1555A>G 変異による難聴は 11 例 (1.54%)、m. 3243A>G 変異による難聴は 14 例 (1.95%)、m. 7445A>G 変異による難聴は 1 例 (0.14%)、m. 8296A>G 変異による難聴は 1 例 (0.14%) に認められることが明らかとなった。

また、m. 3243A>G 変異の見出された 14 例のうち、9 例は糖尿病を合併しており、Maternal Inherited Diabetes and Deafness Syndrome (MIDD) であると考えられる症例であった。また、m. 8296A>G 変異の見出された 1 例も同様に MIDD であった。

また、これら原因遺伝子変異の見出された症例に関して聴力像を検討したところ、ミトコンドリア遺伝子変異による難聴症例は、m. 1555A>G 遺伝子変異では遅発性の中等度難聴に多く見出されるのに対し、m. 3243A>G 変異は軽度～重度難聴症例と幅広く、また発症時期も先天性～遅発性と臨床像の幅が広いことが明らかになった (図 1)。

これは、日本人難聴患者に認められるミトコンドリア m. 1555A>G 変異の大部分がホモプラスミー変異であるため、臨床的特徴が比較的一様であるのに対し、m. 3243A>G 変異に関しては、ヘテロプラスミーがあるため、変異ミトコンドリアの比率により臨床像が大きく異なることが原因だと考えられた。

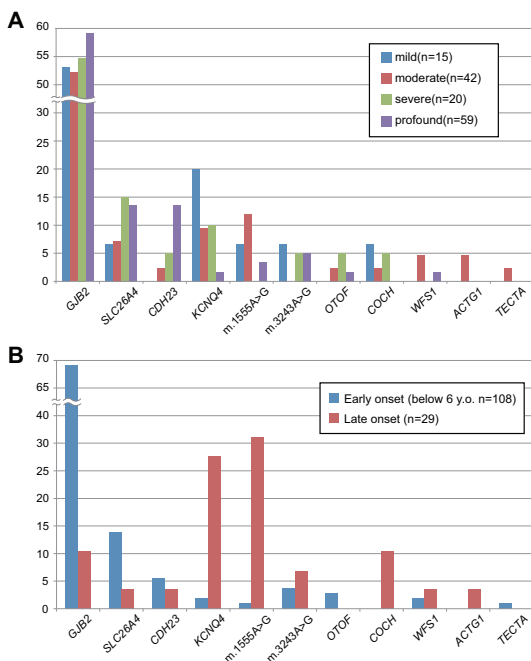


図 1 日本人難聴患者の遺伝子変異別に見た聴力像と難聴発症時期  
m. 1555A>G 遺伝子変異では遅発性の中等度難聴に多く見出されるのに対し、m. 3243A>G 変異は軽度～重度難聴症例と幅広く発症時期

も遅発性が多いものの先天性の症例も認められた。

また、前述のスクリーニング検査を実施しても難聴の原因特定に至らなかった日本人難聴患者 400 例を対象に、ミトコンドリア DNA を Long PCR 法により 2 断片で増幅し直接シーケンス解析を行い、新規ミトコンドリア遺伝子変異の解析を行った。また、見出された遺伝子変異の中には、稀な多型も混在していると考えられたことより、財団法人岐阜国際バイオ研究所が管理するヒトミトコンドリアゲノム多型データベース (GiIB-JST mtSNP, <http://mtsnp.tmig.or.jp/mtsnp/index.shtml>) および疾患と関連するミトコンドリア遺伝子変異の国際的なデータベースである MitoMap (<https://www.mitomap.org/MITOMAP>) の情報を参考に、ハプロタイプを決定する多型などの変異をフィルタリングして解析を行った。

その結果、2 家系に新規の原因遺伝子変異と考えられる候補変異を見出した (ただし、見出された新規の候補遺伝子変異は過去に疾患との関連が報告されていない変異であるので、その病原性の判断には追加の家族検体等が必要である)。また、見出されたミトコンドリア遺伝子の病的変異候補に関して、その臨床的特徴を明らかにすることを目的に、変異を有する発端者に加え、同一変異を有すると考えられる、母系親族および同胞の検体および臨床情報の収集を行い、遺伝子変異の種類と難聴の程度、進行の程度に関する相関解析を行った。現在、研究成果を論文として公表するための準備を行なっている。

## (2) ミトコンドリア遺伝子変異による難聴発症メカニズム

ミトコンドリア遺伝子変異により難聴のみが生じるモデルとして、ミトコンドリア m. 1555A>G 遺伝子変異に着目し、共同研究により患者由来の培養細胞を作成し、遺伝子解析を行うとともに、呼吸活性等の測定を行った。その結果、ミトコンドリア m. 1555A>G 変異を有する細胞の呼吸活性の低下が認められた。研究成果は現在論文として投稿準備を行っている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Moteki H, Isaka Y, Inaba Y, Motobayashi M, Nishio SY, Ohira S, Yano T, Iwasaki S, Shiozawa T, Koike K, Usamu SI. A rational approach to identifying newborns with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection by dried blood spot screening.、査読

有、Acta otolaryngol.、2018 in press.、  
doi: 10.1080/00016489.2018.1441545.

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① 茂木英明、西尾信哉、宮川麻衣子、矢野卓也、岩崎聡、宇佐美真一、先天性サイトメガロウイルス感染による難聴ー長野県新生児 9,000 名に対するスクリーニングプロジェクト、第 118 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会、2017.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢野 卓也 (YANO, Takuya)  
信州大学・医学部付属病院・特任研究員  
研究者番号：10511058

### (2) 研究協力者

宇佐美 真一 (USAMI, Shin-ichi)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：10184996

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号：70467166