

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17390457

研究課題名（和文） ヒトと実験動物モデルの難聴における CDH23 遺伝子の関与

研究課題名（英文） CDH23 mutation in deaf patients and experimental animals

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

研究成果の概要：

500 家系の遺伝性難聴症例の中で、遺伝子 *CDH23* の解析で、難聴発症の原因となる遺伝子変異ならびに有意な多型は同定されなかった。新たな遺伝子変異としては、若年者は中音領域の難聴、加齢により低音域の難聴が進行する常染色体優性遺伝家系で新規の *WFS1* 変異を同定し、対象者の蝸電図検査では、内リンパ水腫の成績が得られ、*WFS1* 変異との関連が推測された。

高度難聴を示すマウスから、*Vlgr1* (very large G-protein coupled receptor) が、コルチ器感覚細胞の感覚毛の発生の際に、感覚毛の基部に発現し、変異があると感覚毛の正常な発生が障害される点を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,700,000	0	1,700,000
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	6,500,000	960,000	7,460,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：

キーワード：遺伝子 脳・神経 ゲノム 細胞・組織 神経科学 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の平成 17 年の人口構成では、65 歳以上の老年人口は 2500 万人強である。一方、65 歳以上の 40% は難聴に罹患しており (Ann NY Acad Sci 1991)、我が国でも老健施設入所者 591 名の 46% が難聴によるコミュニケーション障害を自覚している (Audiology Japan 1997)。従って、日本では約 1100 万人の難聴者が、加齢性難聴によるコミュニケーション障害を有していると想定される。

(2) 難聴の原因遺伝子の同定は、ヒトゲノム研究において、最も進展した分野のひとつである。2001 年 2 月のヒトゲノムのドラフトが報告された際に、30 の疾患遺伝子が新たに同定されたが、そのうち 4 個が非症候群性遺伝性難聴の原因遺伝子であった。現時点では、非症候群性遺伝性難聴の原因遺伝子として 40 個以上の難聴遺伝子が同定されている。一方、加齢性難聴に関連する遺伝子検索は、加齢性難聴モデルマウスでの研究が先行

している。マウスにおける加齢性難聴は多因子疾患と考えられ、現在同定されているのは、染色体 10 番上の *ahl* (age-related hearing loss) と *mdfw* (modifier of deaf waddler) で、加齢による難聴に深く関わっている (Hear Res 1997, Hear Res 2001)。そして、これらの遺伝子の本体は、*cadherin 23* と想定されている (Nat Genet 2003)。一方、*CDH23* 遺伝子は、ヒトにおいては、Usher 症候群 1D ならびに非症候群性劣性遺伝で進行性の難聴を呈する *DFNB12* の原因遺伝子でもある (Am J Hum Genet 2001)。これらの研究成果より、ヒトの加齢性難聴においても、*cadherin 23* が深く関与している可能性が示唆されている。

- (3) 以上の背景から、ヒトと実験動物モデルの両面から加齢性難聴の病態をゲノム解析から解明するのが研究を計画した。加齢による難聴発症の病態の一部が明らかになると、難聴進行の予防、加齢性難聴を発症しやすいヒトに対しての生活指導も可能となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、加齢性難聴の病態をゲノム解析から解明して、加齢による難聴発症の病態の一部を明らかにし、難聴進行を予防し、加齢性難聴を発症しやすいヒトに対しての生活指導を可能とするものである。ヒト非症候群性遺伝性感音難聴 500 家系からすでに取得済みのゲノム DNA を用いて、加齢性難聴と関連している *CDH23* 遺伝子変異の有無を検討する。また、*CDH23* 遺伝子機能を解析するために、*CDH23* 変異による難聴を修飾し、加齢性難聴にも関与する遺伝子である *ATP2B2* 変異モデル動物である *Atp2b2* 変異マウスの *Wriggle Mouse Sagami(Wri)* の内耳形態を解析し、*Atp2b2* の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 申請者の施設でゲノム DNA を抽出した 500 家系の非症候群性遺伝性難聴症例を対象に *CDH23* 変異の有無を、*CDH23* の各エクソンに設置したプライマーを用いて PCR により各 DNA 断片を増幅し、SSCP 法、並びに DNA 直接シーケンスにより検索する。
- (2) 加齢性難聴症例からは、詳細な聴覚検

査を施行し、病変の程度と部位の診断を行い、インフォームドコンセントを書面で得た後に末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出し、*CDH23* 変異の有無を検討する。

- (3) 平成 19 年度の研究で同定された *WFS1* をはじめとする難聴遺伝子の変異についても、*CDH23* 変異と同様に解析する。
- (4) 難聴遺伝子解析では、解析に時間を要する PCR-RFLP 法あるいは直接シーケンス法でなく、蛍光ビーズアレイ法 PCR-Luminex 法を用いて、ミトコンドリア遺伝子変異の代表的な hot spot である 28 変異の網羅的解析を施行した。
- (5) 実験動物モデルを用いた研究では、加齢性難聴近交系マウスとの交配で確立したヘテロ接合体の *Wriggle Mouse Sagami(Wri)* の蝸牛外有毛細胞機能の機能と形態を、耳音響放射ならびに共焦点顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡にて解析する。
- (6) 上記マウスの生後の各時期において、蝸牛から mRNA を抽出し、RT-PCR により cDNA を合成する。この cDNA を用いて、*Cdh23* の mRNA の発現を定量する。

4. 研究成果

- (1) 500 家系の遺伝性難聴症例の中で、遺伝子 *CDH23* の両端のイントロンが、最低でも 150bp のシーケンスが判明可能となるように、プライマーを設計し、SNP を検索したが、難聴発症の原因となる遺伝子変異ならびに有意な多型は同定されなかった。
- (2) 若年者は中音領域の難聴、加齢により低音域の難聴が進行する常染色体優性遺伝家系で以下の新規の *WFS1* 変異を同定した。*WFS1* エキソン 8 の 836 コドンの 2507A>C ヘテロ変異で、リシンからトレオニン (K836T) のミスセンス変異が同定された。家系の難聴者は全て K836T を有し、212 例の健常者ではこの変異は同定されず、難聴の原因変異と推測された。対象者の蝸電図検査では、内リンパ水腫の成績が得られ、*WFS1* 変異との関連が推測された。
- (3) 網羅的ミトコンドリア遺伝子解析を

施行し、対象 373 名中 3243A>G を 10 例、1555A>G を 11 例認めた。3243A>G は、糖尿病等の疾患がなく非症候群性難聴と診断される症例であった。また、母系遺伝と診断してない家系で 1555A>G が同定された。さらに、8348 A>G、11778 G>A、15498 G>A 等の新規変異が同定され、PCR-Luminex 法を用いたミトコンドリア遺伝子変異網羅的解析法の有用性が認められた。

- (4) 高度難聴を示すマウスで、*Vlgr1*(very large G-protein coupled receptor)が、コルチ器感覚細胞の感覚毛の発生の際に、感覚毛の基部に発現し、変異があると感覚毛の正常な発生が障害される点を同定した。さらに、*Vlgr1* がマウスの加齢性難聴の原因遺伝子である *CDH23* と同様に加齢性変化による難聴発症への関与が示唆された。

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 20 件)

- ① Ishige T, Okamura H, Kitamura K, Immunohistochemical localization of phospholipase A2 in the guinea pig nasal mucosa. *J Med Dent Sci*, 55, 29-32, 2008, 有
- ② Hatanaka A, Ariizumi Y, Kitamura K, Pros and cons of tinnitus retraining therapy, *Acta Otolaryngol*, 128, 365-368, 2008, 有,
- ③ Koda H, Kimura Y, Iino Y, Eishi Y, Murakami Y, Kitamura K, Bilateral sudden deafness caused by diffuse metastatic leptomeningeal carcinomatosis, *Otol Neurotol*, 29, 727-729, 2008, 有
- ④ 津久井 慶、堤 剛、角 卓郎、喜多村 健、VOG による矢状断面での静的頭部傾斜時の Listing 平面の計測、*Equilibrium Res*, 67, 311-315, 2008, 有
- ⑤ 川島慶之、佐藤宏昭、岡本牧人、福田 諭、小川 郁、宇佐美 真一、岩崎 聡、中島 務、暁 清文、福島邦博、野口佳裕、喜多村 健、平成 12・13 年度登録の急性低音障害型感音難聴症例の平成 19 年時点での経過調査 (厚生労働科学研究難治性疾患克服研究事業による急性高度難聴に関する調査研究)、*Audiology Japan*, 51, 200-207, 2008, 有
- ⑥ 堤 剛、津久井 慶、喜多村 健、市販 3DVOG データの Fick 座標系から主軸解析への変換とその信頼性、*Equilibrium Res*, 67, 522-527, 2008
- ⑦ Kimura Y, Kubo S, Koda H, Noguchi Y, Sawabe M, Maruyama N, Kitamura K, Quantitative analysis of mRNA in human temporal bone, *Acta Otolaryngol*, 127, 1024-1031, 2007, 有,
- ⑧ Yagi H, Tokano H, Maeda M, Takabayashi T, Nagano T, Kiyama H, Fujieda S, Kitamura K, Sato M, *Vlgr1* is required for proper stereocilia maturation of cochlear hair cells. *Genes Cells*, 12, 235-250, 2007, 有
- ⑨ Tsutsumi T, Inaoka H, Fukuoka Y, Masuda T, Kitamura K, Cross-coupling in a body-translating reaction, interaural optokinetic stimulation reflects a gravitational cue, *Acta Otolaryngol*, 127, 273-279, 2007, 有
- ⑩ Ito T, *SIX1* mutation associated with enlargement of the vestibular aqueduct in a patient with Branchio-Oto syndrome, *Laryngoscope*, 116, 796-799, 2006, 有
- ⑪ Ishida T, Acute sensorineural hearing loss and vertigo in a young adult with congenital plasminogen disorder. *Auris Nasus Larynx*, 33, 187-190, 2006, 有
- ⑫ Noguchi Y, Multiple quantitative trait loci modify cochlear hair cell degeneration in the Beethoven (*Tmc1Bth*) mouse model of progressive hearing loss *DFNA36*, *Genetics*, 173, 2111-2119, 2006, 有
- ⑬ Tsutsumi T, Cross-coupling in a body-translating reaction, interaural optokinetic stimulation

reflects a gravitational cue, *Acta Oto-Laryngologica*, 127, 273-279, 2007, 有

- ⑭ Yagi H, *Vlgr1* is required for proper stereocilia maturation of cochlear hair cells. *Genes Cells*, 12, 235-250, 2007, 有
- ⑮ 喜多村 健、総論 遺伝子解析の現状と展望、*JOHNS*、22, 1677-1680、2006、有
- ⑯ Kimura Y, Kouda H, Eishi Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Ishige I, Iino Y, Kitamura K, Detection of mitochondrial DNA from human inner ear using real-time polymerase chain reaction and laser microdissection. *Acta, Oto-laryngol*, 125, 697-701, 2005, 有
- ⑰ Noguchi Y, Yashima T, Hatanaka A, Uzawa M, Yasunami M, Kimura A, Kitamura K, A mutation in Wolfram syndrome type 1 gene in a Japanese family with autosomal dominant low-frequency sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol*, 125, 1189-1194, 2005, 有
- ⑱ 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*, 2005, 有
- ⑲ Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, et al, An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5 untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains, *Am J Hum Genet*, 77, 280-296, 2005, 有
- ⑳ Owada K, Ishikawa K, Toru S, Ishida G, Gomyoda M, Tao O, Noguchi Y, Kitamura K, Kondo I, Noguchi E, Arinami T, Mizusawa H, A clinical, genetic, and neuropathologic study in a family with 16q-linked ADCA type III, *Neurology*, 65, 629-632, 2005, 有

[学会発表] (計 31 件)

- ① Sumi T, Tsunoda A, Nishio A, Kitamura

K, Watanabe I : Long-term Clinical Outcome of Patients with Meniere's Disease (10 to 43-year-follow-up). XX V Barany Society Meeting, Apr 1, 2008, Kyoto

- ② Kitamura K : Podium 10 : Animal Models and Molecular Research. Chairpersons, XX V Barany Society Meeting, Apr 2, 2008, Kyoto
- ③ Tsunoda A, Sumi T, Shirakura S, Kitamura K : The anatomy of the middle cranial fossa : ontogenic aspect and relationship to the dysequilibrium. XX V Barany Society Meeting, Apr 2, 2008, Kyoto
- ④ Fujikawa T, Takago H, Takago T, Ariizumi Y, Murakoshi T, Kitamura K : A new insight of central mechanism of salicylate-induced tinnitus by patch clamp technique. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum, August 27, 2008, Berlin
- ⑤ 山本容子, 野口佳裕, 古宇田 寛子, 喜多村 健 : 顔面外傷の長期経過後に発症した眼窩気腫の1例. 第109回日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会, 2008年5月15日, 大阪
- ⑥ 大野 十央, 川島慶之, 野口佳裕, 喜多村 健 : 既存の高音障害合併症例にも適応できる急性低音障害型感音難聴の診断基準の検討. 第109回日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会, 2008年5月15日, 大阪
- ⑦ 戸叶尚史, 喜多村 健, EdgeAS : 胎生幹細胞移植後における後迷路性難聴動物モデルの電気生理学的評価. 第109回日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会, 2008年5月15日, 大阪
- ⑧ 高橋正時, 木村 百合香, 加藤智史, 沢辺元司, 野本幸男, 大森孝一, 喜多村 健 : ヒト側頭骨分子病理学的研究におけるパラフィン包埋法の再検討. 第109回日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会, 2008年5月16日, 大阪
- ⑨ 岩崎朱見, 戸叶尚史, 神山亮介, 喜多村 健 : 通年性アレルギー性鼻炎に対する下鼻甲介焼灼療法の長期予後. 第109回日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会, 2008年5月16日, 大阪

- ⑩ 角田篤信, 神山亮介, 角卓郎, 岸本誠司, 喜多村 健, 角田晃一: 耳鼻咽喉科内視鏡観察におけるデジタル画像処理の可能性について. 第109回日本耳鼻咽喉科学総会・学術講演会, 2008年5月16日, 大阪
- ⑪ 野口佳裕, 石川弥生, 伊藤 卓, 西尾綾子, 喜多村 健, 枝松秀雄: 後期高齢者における人工内耳手術. 第14回御茶の水耳鼻咽喉科・頭頸部外科研究会, 2008年6月7日, 東京
- ⑫ 吉本亮一, 角田篤信, 白倉 聡, 岩崎朱見, 玉置正史, 青柳 傑, 喜多村 健: 中耳腔へ進展した髄膜腫の一例. 第14回御茶の水耳鼻咽喉科・頭頸部外科研究会, 2008年6月7日, 東京
- ⑬ 川崎夏子, 伊藤 卓, 野口佳裕, 喜多村 健: ステロイド鼓室内注入の使用経験. 第14回御茶の水耳鼻咽喉科・頭頸部外科研究会, 2008年6月7日, 東京
- ⑭ 古宇田寛子, 木村百合香, 堤 剛, 喜多村 健: びまん性髄膜癌腫症(DMLC)症例の側頭骨病理所見. 第14回御茶の水耳鼻咽喉科・頭頸部外科研究会, 2008年6月7日, 東京
- ⑮ 角田篤信, 神山亮介, 角卓郎, 喜多村 健, 岸本誠司, 角田晃一: デジタル画像処理機能付きの内視鏡観察機器の耳鼻科診療における可能性について. 第70回耳鼻咽喉科臨床学会, 2008年6月27日, 長崎
- ⑯ 田崎彰久, 伊藤 卓, 喜多村 健: 肥厚性硬膜炎による嗄声と嚥下障害を伴ったWegener肉芽腫症の1例. 第70回耳鼻咽喉科臨床学会, 2008年6月28日, 長崎
- ⑰ 藤川太郎, 野口佳裕, 君塚幸喜, 伊藤 卓, 川島慶之, 野村文敬, 西尾綾子, 喜多村 健: 難聴の家族歴のある先天性アブミ骨上部構造固着症の1例. 第70回耳鼻咽喉科臨床学会 2008年6月28日, 長崎
- ⑱ 川崎夏子, 伊藤 卓, 野口佳裕, 喜多村 健: ステロイド鼓室内注入の使用経験. 日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会 第181回学術講演会, 2008年7月26日, 東京
- ⑲ 藤川太郎, 前原浩史, 石原明子, 小野恵美, 喜多村 健: 急性副鼻腔炎および慢性副鼻腔炎急性憎悪症に対するガレノキサシンの有効性 - エオジノステインを用いた早期治療効果判定. 第38回日本耳鼻咽喉科感染症研究会, 2008年9月5日, 島根
- ⑳ 有泉陽介, 大野十央, 中村裕之, 伊藤 卓, 野口佳裕, 喜多村 健: TCI 試用開始時アンケートによる TRT における予後因子の検討. 第53回日本聴覚医学会, 2008年10月2日, 東京
- 21 高田慶子, 角田篤信, 岩崎朱見, 喜多村 健: 頸部捻転でめまい・眼振を生じた椎骨動脈低形成の1例. 第67回日本めまい平衡医学会総会, 2008年10月30日, 秋田
- 22 高橋直人, 角田篤信, 喜多村 健: 胎生期における中頭蓋窩の形態について - 3次元CT画像による検討. 第67回日本めまい平衡医学会総会, 2008年10月30日, 秋田
- 23 野口佳裕, 川島慶之, 伊藤 卓, 喜多村 健: 平衡障害を示したミトコンドリアDNA1555点変異の1例. 第67回日本めまい平衡医学会総会, 2008年10月30日, 秋田
- 24 圓 梨代, 角田篤信, 津久井 慶, 萩野幸治, 喜多村 健: ENGによる急速眼球運動の簡易計測. 第67回日本めまい平衡医学会総会, 2008年10月30日, 秋田
- 25 堤 剛, 津久井 慶, 喜多村 健, 徳丸晶子: 市販赤外線ビデオ眼振計データのオイラー角座標系から主軸解析への変換とその信頼性. 第67回日本めまい平衡医学会総会, 2008年10月31日, 秋田
- 26 渡邊 嶺, 岩崎朱見, 杉本太郎, 古宇田寛子, 喜多村 健: 多発性喉頭乳頭腫の2例. 日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会例会 第182回学術講演会, 2008年11月22日, 東京
- 27 加藤智史, 野口佳裕, 木村 百合香, 西垣 裕, 田中雅嗣, 上野仁美, 伊藤 卓, 喜多村 健: 遺伝性難聴例を対象としたミトコンドリア遺伝子変異網羅的検出法による遺伝子解析. 平成20年度第2回厚生労働省急性感音難聴調査研究班会議, 2009年2月7日, 東京

- 28 高橋正時, 木村 百合香, 沢辺元司, 久保幸穂, 和田 仁, 喜多村 健 : パラフィン包埋ヒト側頭骨標本の免疫組織学的研究. 平成 20 年度 第 2 回 厚生労働省急性感音難聴調査研究班会議, 2009 年 2 月 7 日, 東京
- 29 藤川太郎, 有泉陽介, 鷹合秀輝, 村越隆之, 喜多村 健 : ラット台形体におけるサリチル酸の効果 - パッチクランプ法による検討. 平成 20 年度 第 2 回 厚生労働省急性感音難聴調査研究班会議, 2009 年 2 月 7 日, 東京
- 30 杉本太郎, 渡邊 嶺, 岩崎朱見, 神山亮介, 喜多村 健, 岸本誠司 : NBI 硬性内視鏡を利用した直達鏡下喉頭腫瘍手術. 第 21 回日本喉頭科学会総会・学術講演会, 2009 年 3 月 26 日, 前橋
- 31 Fujikawa T, Noguchi Y, Ito T, Takahashi M, Kitamura K : A novel mutation in WFS1 in a Japanese family shows U-shaped audiogram in childhood, 6th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference, July 11-14, 2007, Hinxton, UK

[図書] (計 7 件)

- ①. 喜多村 健 : 中山書店, 看護のための最新医学講座 第 2 版 第 21 巻 耳鼻咽喉科疾患. 2008, 177
- ②. 喜多村 健 : 21 世紀 COE プログラム 脳の機能統合とその失調 5 年間の歩みと今後への飛躍. 2008, 20
- ③. 木村百合香, 高橋正時, 喜多村 健 : 株式会社ワールドプランニング, めまい. 老年医学の基礎と臨床 I, 2008, pp175-9
- ④. 喜多村 健 : 医学書院, 全身性疾患と難聴. 今日の耳鼻咽喉科・頭頸部外科治療指針, 2008, pp215
- ⑤. 喜多村 健 : 金原出版, 小児急性中耳炎診療ガイドライン 2009 年版. 2009, 75
- ⑥. 堤 剛, 喜多村 健 : 医歯薬出版株式会社, 第 IV 章 感覚機能検査 1. 平衡機能検査 3. その他の検査 (聴覚・味覚・嗅覚) 臨床検査学講座 第 2 版 生理機能検査学 2009, 295-319, 338-352

- ⑦. 喜多村 健, 森山 寛 : 南江堂, NEW 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学, 2007, 304

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

角田 篤信 (TUNODA ATUNOBU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号 : 00280983

杉本 太郎 (SUGIMOTO TARO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 60262177

戸叶 尚史 (TOKANO HISASHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教授

研究者番号 : 70334422

八島隆敏 (YASHIMA TAKATOSHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 50372438

角 卓郎 (SUMI TAKURO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 20361701

伊藤 卓 (ITO TAKU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 40401400

有泉陽介 (ARIIZUMI YOSUKE)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 : 30444110

吉川 欣亮 (KIKKAWA YOSHIAKI)

東京農業大学 生物生産学部・准教授

研究者番号 : 20280787

(3) 連携研究者

角田 篤信 (TUNODA ATUNOBU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号 : 00280983

杉本 太郎 (SUGIMOTO TARO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 60262177

伊藤 卓 (ITO TAKU)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 40401400

吉川 欣亮 (KIKKAWA YOSHIAKI)

東京農業大学 生物生産学部・准教授

研究者番号 : 20280787