

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005～2008

課題番号：17390459

研究課題名（和文） 老人性難聴に対する分子遺伝学的アプローチ

研究課題名（英文） Molecular-genetic analysis of age related hearing impairment.

研究代表者

宇佐美 真一 (USAMI SHIN-ICHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：10184996

研究成果の概要：

高齢化社会の抱える問題の一つとして、老人性難聴によるコミュニケーション障害がある。老人性難聴は、従来から環境要因と遺伝的要因が関与していることが推測されているが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究では老人性難聴のメカニズムの推定を目的とし、健康な高齢者400名を対象に聴力測定と、候補遺伝子のSNPsの解析を行った。その結果、老人性難聴と有意に相関のある老人性難聴候補遺伝子を2種類見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,900,000	0	3,900,000
2006年度	3,600,000	0	3,600,000
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	14,700,000	2,160,000	16,860,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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、遺伝子、内耳、加齢、SNPs

## 1. 研究開始当初の背景

老人性難聴は80代では50%におよぶとされる頻度の高い疾患であるが、個人差が大きく、従来から環境要因とともにその個人の遺伝的要因が関与していることが推測されていた。また、ここ数年の分子遺伝学の目覚ましい進歩により先天性難聴の原因遺伝子が次々に明らかになってきたのに対して、老人性難聴の分子遺伝学的側面に関しては殆ど明らかになっていない状況であった。

今後、老人性難聴の病態を明らかにし治療、予防につなげていくためには遺伝子面から

老人性難聴を検討し分子レベルで解析する必要性がある。

従来から老人性難聴は Schknecht により i) sensory, ii) metabolic (strial), iii) neural, iv) mechanical の4タイプに分類されてきたが、現在それに対応するような難聴の原因遺伝子がコードする蛋白の局在が明らかになってきている。

また主任研究者である宇佐美らは、老化促進モデルマウス(SAM) (Higuchi, Meth Emzym 1999)の内耳を解析した結果、加齢に伴うアポトーシスが起ることを報告している

(Usami et al., 1997)。興味深いことに前述の Schknecht の提唱する部位に一致してアポトーシス陽性細胞が認められるため、本動物モデルを利用することにより老人性難聴の発症メカニズム解析が期待される。

## 2. 研究の目的

2010年には70歳以上の高齢者人口が国民全体の1/4を超える超高齢化社会になることが予想されている。高齢者の社会生活における Quality of Life (QOL) を高めるのは21世紀の医学の重要な課題である。耳鼻咽喉科領域において高齢者がかかえる大きな問題の一つとして、老人性難聴によるコミュニケーション障害がある。

老人性難聴は80代では50%におよぶとされており非常に普遍的な疾患であるが、反面、個人差が大きいことが知られており、従来から環境要因とともにその個人の身体的要因、遺伝的要因が関与していることが推測されている。

そこで、本研究では加齢に伴う難聴によるコミュニケーション障害を克服するために必要な基盤情報を得ることを目的に、老人性難聴の遺伝的要因に対して、分子遺伝学的手法によるアプローチを行い、老人性難聴の候補遺伝子を同定することを目的とした。

老人性難聴のメカニズムを推定するために、我々は、(1)健康な高齢者400名を対象に聴力測定を行なうとともに、候補遺伝子SNPsを解析し、その相関解析を行うことで候補遺伝子を推定する集団遺伝学的なアプローチと、(2)加齢促進モデルマウスを用いて、内耳に発現する遺伝子の変化を解析することにより、老人性難聴のメカニズムを推定するトランスクリプトーム解析の2つのアプローチにより研究を行う。

本研究により老人性難聴候補遺伝子が同定されることにより、将来的には老人性難聴の発症メカニズムが明らかになり、発症・進行に影響する環境因子、身体的因子、遺伝的因子などが明らかになることで、予防や治療につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

老人性難聴のメカニズムを推定するために、我々は2つのアプローチによる解析を行った。

### (1) 集団遺伝学的アプローチ

健康な高齢者400名を対象に耳鼻咽喉科医による鼓膜のチェックおよび聴力測定を行なった。鼓膜に異常が認められるもの、AB-gapが15dB以上認められるものは除外した。また15dB以上の左右差が認められる場合には、良聴耳の聴力をその後の解析に使用した。

また、研究協力に関する十分な説明の上、書面で同意を得てから、血液を採取し血液からDNAを抽出した。DNAの抽出に際しては、個人情報保護のために匿名化IDを割り付けた。DNA抽出後、内耳に高発現している遺伝子などの老人性難聴候補遺伝子15遺伝子30SNPs (*KCNQ4*, *COCH*, *CDH23*, *DFNA5*, *GJA4*, *GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *COL9A1*, *COL11A2*, *TECTA*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYH9*, *WFS1*) のタイピングを行い、聴力測定の結果との相関解析を行い、老人性難聴候補遺伝子の推定を行なった。

相関解析を行うために、老人性難聴の特徴である高音部の聴力低下を検討することを目的に、8,000Hzの平均聴力(以下Av8000)、低音部聴力に対する高音部聴力の比率(Ratio=Av8000/125Hzから2,000Hzの平均聴力)の2つの指標を定義した。

各SNPsの遺伝子型とAv8000とRatioそれぞれについての相関を多重比較法(Turkey HSD test)あるいはStudent T-testにより解析した。

### (2) 加齢促進モデルマウスを用いた検討

12週齢および20週齢の加齢促進モデルマウス(SAM)とコントロール系統のマウスの聴力をABR法で測定する。その後、内耳を摘出し、蝸牛と前庭に分離する。蝸牛よりtotal RNAを抽出し、Agilent 2100 bioanalyserにより、RNAの品質を確認後、発現する遺伝子の変化をスライドガラスマイクロアレイを用いて解析した。スライドガラスマイクロアレイで発現の変化が認められた遺伝子に関しては、semi-qRT-PCRを行なって定量化を行い、老化に伴う内耳の遺伝子発現変化の解析を行った。

## 4. 研究成果

本研究では、老人性難聴に対して分子遺伝学的手法を用いてアプローチすることで、従来加齢のためと考えられ、研究の進んでいなかった老人性難聴のメカニズムの解明の基盤整備を目的としている。本研究では、本学大学院スポーツ医学研究科が中心となって実施している、「熟年体育大学」参加者(40-75歳、平均年齢65歳)450名を対象に、十分な説明の上、書面で同意を得て、聴力検査と採血を行い、聴力と遺伝子の相関解析を実施した(図1)。

解析対象とした遺伝子は、1)内耳で高発現している、2)先天性難聴の原因遺伝子として報告がある、3)老化に関連することが報告されているの3つのカテゴリーに含ま

れる15遺伝子30SNPs (*KCNQ4*, *COCH*, *DFNA5*, *GJB2*, *GJB3*, *GJB6*, *COL11A2*, *TECTA*, *MYO6*, *MYO7A*, *MYH9*, *WFS1*など)を解析した。遺伝子型を決定した後、遺伝子型ごとに、Av8000およびRatioの2つの指標で、遺伝子型と聴力の相関解析を行った。解析には、平均値の有意差をTurkey HSD testと一般的なT検定を用いた。

その結果、2つの遺伝子のSNPsにおいて老人性難聴の典型的な特徴である高音域での聴力の低下と相関が認められ、老人性難聴と関連する遺伝子多型である可能性が高いことを明らかにした(図2)。

図1 研究協力者の平均聴力

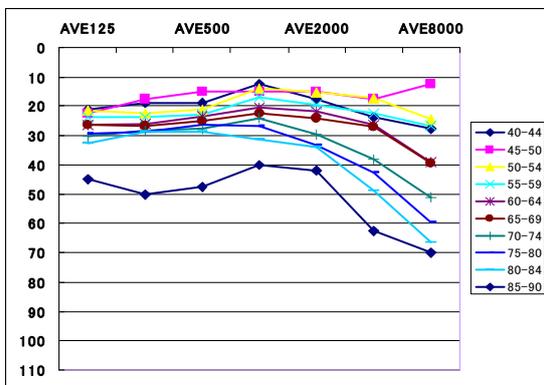
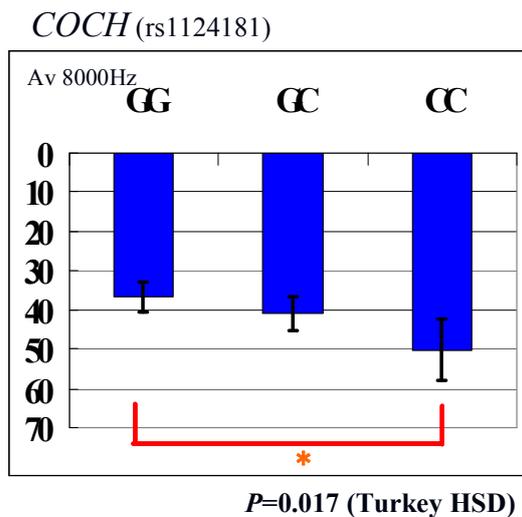
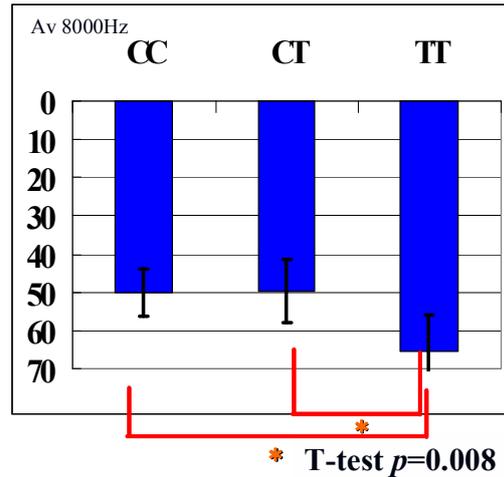


図2 老人性候補SNPsの遺伝子型と平均聴力(投稿準備中)



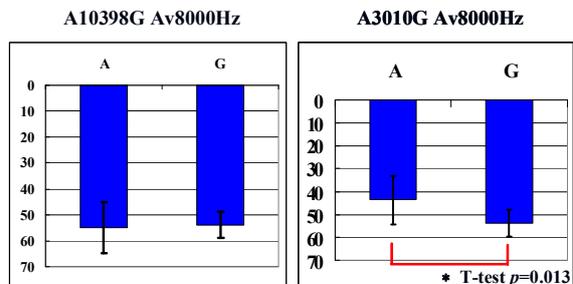
*MYO7A* (rs2276288)



興味深いことに、この候補遺伝子の多型はプロモーター領域に存在していたため、老人性難聴発症のメカニズムとしては、加齢に伴う転写因子の発現量の変化などに伴い、遺伝子発現が変化して老人性難聴が変化することが想定される。

また、加齢に關与する因子として、ミトコンドリア遺伝子多型が考えられる。ミトコンドリア遺伝子は酸化還元反応に關与しており、その遺伝子異常が細胞内の酸化ラジカルの増加を引き起こし、加齢を引き起こすと考えられている。本研究では日本人百寿者に高頻度で認められる遺伝子多型A10398Gと、その他日本人で高頻度で認められるミトコンドリアDNA多型14種類について遺伝子型を解析し、ゲノム遺伝子のSNPsと同様に、聴力との間で相関解析を行った。その結果、日本人百寿者に高頻度で認められる遺伝子多型A10398Gと聴力の間には相関は認められなかった。しかし、A3010G多型と聴力の間には有意な相関を認めた(図3)。

図3 ミトコンドリアDNA多型と聴力の相関(投稿準備中)



A3010Gはミトコンドリアの23Sリボゾー

ムRNAの多型であり、塩基置換は翻訳に影響を及ぼすことが示唆される。また、A3010G多型が、数種類の日本人ハプログループに認められる遺伝子多型であるため、実際の老人性難聴の原因はA3010Gと連鎖する別のミトコンドリアDNAの多型である可能性も考えられる。今後ハプログループごとに平均聴力を比較することで、A3010Gが直接老人性難聴に関わっているのか、それとも連鎖する別のミトコンドリアDNA多型が原因かを明らかにすることが出来ると考えられる。

また、12週齢および20週齢の加齢促進モデルマウスを用いて、ABR法により聴力測定を行うとともに、そのマウスから内耳(蝸牛)を摘出し、RNAを抽出して、スライドグラスマイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化を検討した。聴力に関しては12週齢のマウスと20週齢のマウスでは16kHzの聴力に差が認められ、このモデルマウスにおいても、加齢に伴う難聴は高音域から障害されることが確認された。また、スライドグラスマイクロアレイを用いた解析より、発現が2倍以上変化した遺伝子としてBF1、SIM2、Tmb4を見出した。また、リアルタイムPCRを用いて、BF1、SIM2、Tmb4遺伝子の発現量を測定した。

BF1およびSIM2は転写因子であると考えられており、加齢に伴う聴力の悪化に転写因子の発現変化が関わっていることを明らかにしたことは意義深いと考えられる。今後、これら転写因子によりどのような遺伝子が発現調節を受けているのかを明らかにすることにより、老人性難聴のメカニズムを明らかにすることが出来ると考えている。

また、我々が今回見出したCOCH、MYO7A遺伝子および海外で老人性難聴の候補遺伝子として報告されているKCNQ4遺伝子

(Van Camp et al., 2006)はいずれも進行性の先天性難聴の原因遺伝子である。従って、両側感音性難聴のうち進行性難聴の原因遺伝子は老人性難聴の原因遺伝子に変異の部位は異なるが遺伝子の種類はオーバーラップしていることが示唆される。そこで、本研究では、両側感音難聴患者における進行性および遺伝的背景について、両側感音難聴患者1343例を対象に検討を行った。

その結果、60歳以下の両側感音難聴患者のうち54%が難聴の進行を自覚しており、そのうち32%が常染色体優性遺伝または母系遺伝形式を示していた(図4)。また、常染色体劣性遺伝/孤発例、常染色体優性遺伝/母系遺伝で進行性の有無を検討した場合、前者では47%に難聴の進行を自覚したのに対して、後者では68%と高率に進行性を自覚して

おり常染色体優性遺伝形式または母系遺伝形式をとる難聴患者では進行する可能性が高い可能性が示唆された(図5)

図4 感音難聴患者における進行性の有無と遺伝形式

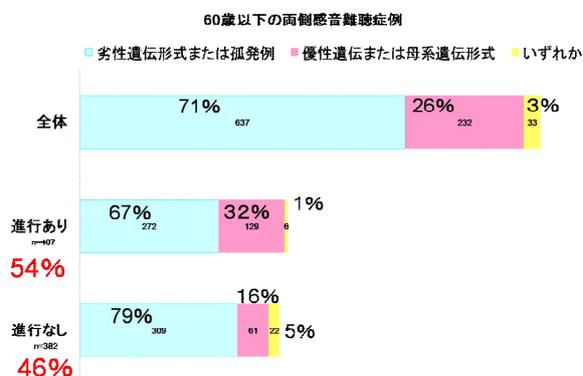
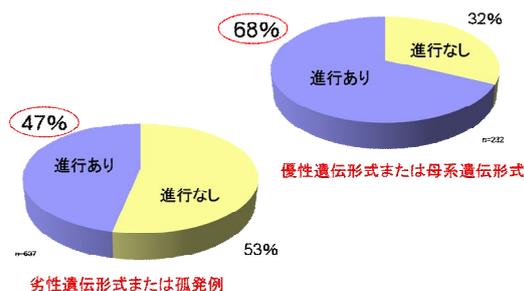


図5 遺伝形式による進行性の有無



進行性を示す難聴原因遺伝子として常染色体優性遺伝を取る難聴の原因遺伝子ではKCNQ4、TECTA、COCH、WFS1などが挙げられ、常染色体劣性遺伝を取る難聴の原因遺伝子ではCDH23やSLC26A4が挙げられた。KCNQ4の高音障害型難聴やTECTAの皿型中等度難聴、COCHのめまいの随伴症状などいずれの原因遺伝子にも聴力型や随伴症状に特徴があり、今後これら遺伝子が老人性難聴の原因候補遺伝子として解析していく必要があると考えられる。

## 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16件)

①Fukuoka H, Tsukada K, Miyagawa M, Oguchi T, Takumi Y, Sugiura M, Ueda H, Kadoya M, Usami S. Quantitative evaluation of endolymphatic hydrops by bilateral

intratympanic Gd-DTPA administration with MRI imaging for Meniere's disease. Acta Otolaryngol (in press, 査読有)

② Miyagawa M, Fukuoka H, Tsukada K, Oguchi T, **Takumi Y**, Sugiura M, Ueda H, Kadoya M, **Usami S**. Endolymphatic hydrops and therapeutic effects are visualized in "atypical" Meniere's disease Acta Otolaryngol (in press, 査読有)

③ Ro SY, Nishio S, Tsukada K, Oguchi T, Kobayashi K, Abe S, **Usami S**. Factors that affect hearing level in individuals with the mitochondrial 1555A>G mutation Clin. Genet. 2008 (in press, 査読有).

④ **Usami S**, Takumi Y, Suzuki N, Oguchi T, Oshima A, Suzuki H, Kitoh R, Abe S, Sasaki A, Matsubara A. The localization of proteins encoded by CRYM, KIAA1199, UBA52, COL9A3, and COL9A1, genes highly expressed in the cochlea. Neuroscience. 2008 Jun 12;154(1):22-8. (査読有)

⑤ Oshima A, Jaijo T, Aller E, Millan JM, Carney C, **Usami S**, Moller C, Kimberling WJ. Mutation profile of the CDH23 gene in 56 probands with Usher syndrome type I. Hum Mutat. 2008 Jun;29(6):E37-46. (査読有)

⑥ **Usami S**, Wagatsuma M, Fukuoka H, Suzuki H, Tsukada K, Nishio S, Takumi Y, Abe S. The responsible genes in Japanese deafness patients and clinical application using Invader assay. Acta Otolaryngol. 2008 Apr;128(4):446-54. (査読有)

⑦ Suzuki S, Suzuki N, Mori J, Oshima A, **Usami S**, Hashizume K. micro-Crystallin as an intracellular 3,5,3'-triiodothyronine holder in vivo. Mol Endocrinol 2007;21(4):885-94. Epub 2007 Jan 30. (査読有)

⑧ Matsunaga T, Okada M, **Usami S**, Okuyama T. Phenotypic consequences in a Japanese family having branchio-oto-renal syndrome with a novel frameshift mutation in the gene EYA1. Acta Otolaryngol 2007;127(1):98-104. (査読有)

⑨ Abe S, Yamaguchi T, **Usami S**. Application of Deafness Diagnostic Screening Panel Based on Deafness Mutation/Gene Database Using Invader Assay. Genetic Testing 2007;11(3):333-340. (査読有)

⑩ Fukuoka H, Kanda Y, Ohta S, **Usami S**. Mutations in the WFS1 gene are a frequent cause of autosomal dominant nonsyndromic low-frequency hearing loss in Japanese. J Hum Genet 2007;52(6):510-515. (査読有)

⑪ Kitoh R, Oshima A, Suzuki N, Hashimoto S, **Takumi Y**, **Usami S**. Immunocytochemical localization of ubiquitin A-52 protein in the mouse inner ear. Neuroreport 2007;18(9):869-873. (査読有)

⑫ Wagatsuma M, Kitoh R, Suzuki H, Fukuoka H, **Takumi Y**, **Usami S**. Distribution and frequencies of CDH23 mutations in Japanese patients with non-syndromic hearing loss. Clin Genet 2007;72(4):339-44. (査読有)

⑬ Matsunaga T, Hirota E, Bito S, Niimi S, **Usami S**. Clinical course of hearing and language development in GJB2 and non-GJB2 deafness following habilitation with hearing aids. Audiol Neurootol 2006;11(1):59-68. Epub 2005 Nov 9. (査読有)

⑭ Oshima A, Suzuki S, **Takumi Y**, Hashizume K, Abe S, **Usami S**. CRYM mutations cause deafness through thyroid hormone binding properties in the fibrocytes of the cochlea. J Med Genet 2006;43(6):e25. (査読有)

⑮ Iwasaki S, Tsukamoto K, **Usami S**, Misawa K, Mizuta K, Mineta H. Association of SLC26A4 mutations with clinical features and thyroid function in deaf infants with enlarged vestibular aqueduct. J Hum Genet 2006;51(9):805-10. Epub 2006 Aug 19. (査読有)

⑯ Van Camp G, Snoeckx RL, Hilgert N, van den Ende J, Fukuoka H, Wagatsuma M, Suzuki H, Smets RM, Vanhoenacker F, Declau F, Van de Heyning P, **Usami S**. A new autosomal recessive form of Stickler syndrome is caused by a mutation in the COL9A1 gene. Am J Hum Genet 2006;79(3):449-57. Epub 2006 Jun 26. (査読有)

[学会発表] (計8件)

① Hashimoto S, Shinshu University Gene Research Consortium, NPO JTR, Nishio S, **Takumi Y**, **Usami S**, SNP frequency in COCH is involved in Age-Related Hearing Impairment in aged Japanese, 第3回運動・遺伝子・予防医療国際シンポジウム, 2009. 3. 16, 松本

② Hashimoto S, Shinshu University Gene Research Consortium, NPO JTR, Nishio S,

Takumi Y, Usami S, SNP frequency in COCH is involved in Age-Related Hearing Impairment in aged Japanese, 第2回運動・遺伝子・予防医療国際シンポジウム, 2009. 3. 11, 松本

③橋本繁成, 鈴木伸嘉, 工 穰, 宇佐美真一, 老人性難聴における遺伝的素因の検討: セカンドコホートでの解析およびプロモーター領域の検討, 第18回日本耳科学会総会, 2008. 10. 18, 神戸

④橋本繁成, 鈴木伸嘉, 工 穰, 宇佐美真一, 老人性難聴における遺伝的因子の関与について -老人性難聴候補遺伝子の SNP 遺伝子型と聴力との相関解析-, 第17回日本耳科学会, 2007. 10. 19, 福岡

⑤鈴木伸嘉, 橋本繁成, 工 穰, 宇佐美真一, SAM の内耳における遺伝子発現について, 第17回日本耳科学会, 2007. 10. 18, 福岡

⑥鈴木伸嘉, 橋本繁成, 工 穰, 宇佐美真一, SAM の内耳における遺伝子発現について, 第22回老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会, 2007. 7. 26, 山形

⑦鈴木伸嘉, 橋本繁成, 工 穰, 宇佐美真一, Gene expression profiles in the cochlea of the senescence-accelerated mouse (SAM), 国際老人性難聴会議, 2007. 5. 25, ベルギー

⑧橋本繁成, 鈴木伸嘉, 工 穰, 宇佐美真一, SNP frequency in COCH is involved in Age-Related Hearing Impairment in aged Japanese, 国際老人性難聴会議, 2007. 5. 23, ベルギー

[その他]

○市民公開講座

宇佐美真一, 耳の日市民公開講座「老人性難聴研究の進歩」, 2008. 3. 1, 長野

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇佐美 真一 (USAMI SHIN-ICHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 10184996

### (2) 研究分担者

工 穰 (TAKUMI YUTAKA)

信州大学・医学部・講師

研究者番号: 70312501

樋口 京一 (HIGUCHI KYOUICHI)  
信州大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 20173156

### (3) 連携研究者

工 穰 (TAKUMI YUTAKA)

信州大学・医学部・講師

研究者番号: 70312501

樋口 京一 (HIGUCHI KYOUICHI)

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 20173156