

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791577

研究課題名（和文）加齢性難聴における内耳のミトコンドリア DNA 変異の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of mitochondrial DNA mutations in inner ear cells of patients with presbycusis

研究代表者 加藤 智史 (KATO TOMOFUMI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：80469965

研究成果の概要（和文）：加齢性難聴患者と正常聴力の高齢者から採取した血液から抽出した DNA を用い、ミトコンドリア DNA の変異、多型の解析を施行し、その両群間や聴力との関係を解析した。これに平行して、遺伝性難聴疑いの患者血液から抽出した DNA を用いて同様にコントロール群と比較し、結果難聴群ではハプログループ D4b に属する頻度が有意に高いことを確認した。

研究成果の概要（英文）：We studied the association between the presbycusis and the mutations or the polymorphisms of mitochondrial DNA. Also we compared the patients with suspected hereditary hearing loss with controls. We demonstrated that haplogroup D4b is related to the phenotypic expression of hereditary hearing loss.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,730,000

研究分野：耳科学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学、老人性難聴、ミトコンドリア DNA、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

内耳の細胞はミトコンドリアを多く含有し、これまでに m. 1555A>G 変異や m. 3243A>G 変異に代表される多くのミトコンドリア DNA の変異が遺伝性難聴の原因として報告されて来た。

加齢性難聴においては、多臓器の加齢性変化と同様にミトコンドリア DNA の多型が病態に寄与していることが示唆されてきた。またミトコンドリア DNA の多型と運動能力の関連などが明らかになって来た。我々は、内耳にお

いても老化などの観点からミトコンドリア DNA の多型や変異が加齢性難聴に関与することを予測し、本研究を開始した。本研究に平行して、遺伝性難聴患者に対するミトコンドリア DNA の変異、多型解析をさらに継続して施行した。

2. 研究の目的

ミトコンドリア DNA の変異、多型が加齢性難聴の発現にどのように寄与するか解明す

ることを目指した。同時に、遺伝性難聴患者のDNAに対しても解析を施行し、ミトコンドリアDNAの変異や多型の関与をさらに明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

東京都健康長寿医療センター研究所健康長寿ゲノム探索チームとの共同研究であり、同チームの実験設備を用いて施行された。

(1) 加齢性難聴のミトコンドリア DNA 多型解析

東京都健康長寿医療センター耳鼻咽喉科を受診し純音聴力検査を施行し、中耳炎や他疾患による難聴を除外するため左右差を認めない65歳以上の高齢者を対象とした。純音調力検査上の500, 1k, 2k, 4kHzの平均を算出し、加齢性難聴患者と良聴力の高齢者に分類した。対象者から採取した血液から抽出したDNAを用い、QIAamp DNA Blood Mini Kitを用いてDNAを抽出した。これに対し、1プレート96検体を1単位として、蛍光ビーズ・アレイPCR-Luminex法によるミトコンドリアDNAの網羅的な多型解析を施行した。

(2) 遺伝性難聴におけるミトコンドリア DNA ハプログループ解析

平行して行われた遺伝性難聴患者は東京医科歯科大学耳鼻咽喉科を受診した患者から集めたサンプルを用いた。(1)と同様にLuminex法による多型解析を施行した。日本人に代表的な12のハプログループ(F, B, A, N9a, N9b, M7a, M7b, G1, G2, D4a, D4b, D5と、その他)に分類した。このハプログループの頻度をコントロール群と比較し、難聴の発現に対して有意と考えられるハプログループや多型を探索した。

(3) 遺伝性難聴におけるミトコンドリア変異解析

ミトコンドリア病の原因となる代表的な遺伝子変異の網羅的解析を以前から施行していたが、(2)と同じ対象患者に対し、当方のLuminex法における”Series B”の代表的な変異の網羅的解析を施行し、以前施行したSeries Aの結果とあわせて報告した。

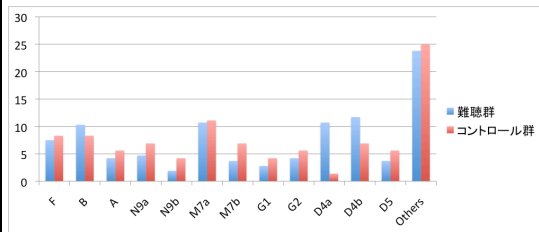
4. 研究成果

(1) 加齢性難聴のミトコンドリア DNA 多型解析

加齢性難聴においては明らかに関与する多型は現在のところ明らかではないが、今後も研究を継続し検体数を増やして行く予定である。検体数を増やすことで、有意なハプログループや多型が検出されることが予想

される。

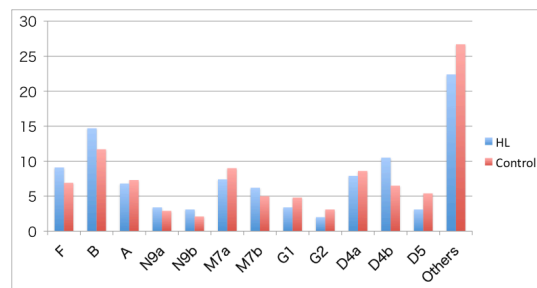
これまでに3プレートの解析を完了している。その結果を以下のグラフに示す。



ハプログループD4aについて有為差が認められているものの、個体数が少ないため結果を明らかにし論じるにはさらなる検体数の増加が必要と考えられる。今後も本研究を継続する予定である。

(2) 遺伝性難聴におけるミトコンドリア DNA ハプログループ解析

遺伝性難聴群とコントロール群のハプログループの頻度(%)を以下のグラフに示す。



患者群はコントロール群に比べて有意にハプログループD4bに属する者が多かった。

さらにハプログループD4bはサブハプログループD4b1とD4b2に分けられるが、これについてさらに検討をすると

Haplogroup	P	OR (95% CI)
D4b	0.036	1.70 (1.03-2.79)
D4b1	0.96	1.03 (0.32-3.27)
D4b2	0.021	1.89 (1.09-3.28)

この有意差はサブハプログループ D4b2 によるものであると考えられた。

(3) 遺伝性難聴におけるミトコンドリア変異解析

これまでの Series A に加えて、Series B の網羅的な変異解析を施行し、あわせて報告した。変異が検出されたのは、

シリーズ A	
m. 1555A>G	11 例 (2, 9%)
m. 3243A>G	9 例 (2, 4%)
m. 8348A>G	1 例 (0, 3%)
m. 11778G>A	1 例 (0, 3%)
m. 15498G>A	1 例 (0, 3%)

シリーズ B	
m. 7444G>A	1 例 (0, 3%)
m. 7472C>insC	1 例 (0, 3%)

以上より、改めてこの網羅的なミトコンドリア DNA の代表変異の網羅的なスクリーニングが、ホモプラスミー、ヘテロプラスミー変異のともに有用であることを確認した。また、当初は予想されなかった変異を見つけることもあり、当該患者の遺伝子カウンセリングや治療戦略を考える上で有用であると考えられた。

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 2 件)

① Extended Screening for Major Mitochondrial DNA Point Mutations in Patients with Hereditary Hearing Loss. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, et al. *J Hum Genet.* 2012; 57: 772-5.

② Mitochondrial DNA Haplogroup associated with Hereditary Hearing Loss in a Japanese Population.

Kato T, Fuku N, Noguchi Y, et al.

Acta Otolaryngol. 2012; 132: 1178-82.

[学会発表] (計 6 件)

① Mitochondrial DNA Haplogroup Analysis Associated with Presbycusis in a Japanese Population

The First Asian Otology Meeting & the 3rd East Asian Symposium on Otology

2012 年 6 月 2 日 Nagasaki

② Mitochondrial Haplogroup Analysis in Patients with Hereditary Hearing Loss
The 35th annual midwinter research meeting of the Association for Research in Otolaryngology

2012 年 2 月 San Diego, USA

③ 遺伝性難聴疑い症例のミトコンドリアハプログループ解析

第 21 回日本耳科学会総会・学術講演会

2011 年 11 月 沖縄市

④ Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss

The 7th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine

2010 年 12 月 Fukuoka

⑤ Extensive and rapid screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss

2nd East Asian Symposium on Otology

2010 年 11 月 Taipei, Taiwan

⑥ 遺伝性難聴症例に対する網羅的・迅速検出法を用いた主要ミトコンドリア DNA 点変異の解析<第 2 報>

第 20 回日本耳科学会総会・学術講演会

2010 年 10 月 松山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 智史 (KATO TOMOFUMI)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ

ンター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：80469965