

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24年 6月 8日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890077

研究課題名（和文） ミトコンドリア DNA 多型が老人性難聴に及ぼす影響に関する研究

研究課題名（英文） The effects of mitochondrial DNA SNPs for age related hearing impairment

研究代表者

塚田 景大 (TSUKADA KEITA)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90419375

研究成果の概要（和文）：

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に老化に関わるとされるミトコンドリア DNA 多型に着目した。今回われわれは、難聴とミトコンドリア遺伝子変異との関連について検討し、難聴患者 384 例に対してミトコンドリア DNA の全塩基配列を解析した結果、新たな病的変異を 2 種類同定した。

研究成果の概要（英文）：

The age related hearing impairment is one of the most important problems of the aging society. To investigate the age related hearing impairment, we paid attention to mitochondrial DNA SNPs that thought to be related to aging. We performed systemic mutational analysis of mtDNA in 384 Japanese patients with hearing loss, and detected 2 novel pathogenic mitochondrial variants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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，ミトコンドリア，内耳，多型

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 (1)sensory, (2) metabolic (strial), (3) neural, (4) 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。

また先行研究において宇佐美らは、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、ミトコンドリア遺伝子について着目した。ミトコンドリアはエネルギー産生、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。従来よりミトコンドリアDNAの多型(塩基置換)はさまざまな疾患の原因となる事が知られており、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、近年ではアルツハイマー病、乳がんの原因遺伝子であることが指摘されている (Mikkikan et al. 2005, Bamezai et al. 2006, Nicodemus et al. 2004)。

また、当研究室では従来より、精力的に難聴の遺伝子解析を行ってきた。現在までに難

聴の原因となるミトコンドリアDNAの変異として A1555G、A3243G、A7445G、A8296G の4つが知られており、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明らかになっているが、その詳細なメカニズムは未だ不明である。ミトコンドリアDNAの多型(塩基置換)は難聴の原因であるだけでなく、加齢現象の引き金でもあると考えられているため、加齢に伴う疾患の一つである老人性難聴の原因のひとつにミトコンドリアDNAの多型があることが予想される。

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

難聴とミトコンドリア遺伝子変異との関連を同定し、老人性難聴の候補遺伝子を推定するために、難聴患者に対してミトコンドリアDNAの全塩基配列を直接シーケンス法にて解析し、遺伝子変異解析および遺伝子変異と聴力との相関関係の有無について検討した。

当研究室が保有する難聴遺伝子バンクより、両側感音難聴患者384例(母系遺伝形式をとる難聴患者192例、孤発例192例)を対象とした。これらの患者に対しては、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。また、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。

対象とする患者のDNAに対しミトコンドリアDNAの全塩基配列をLA Taq DNA polymerase (TaKaRa BIO, Shiga, Japan)を用いたPCR法で増幅し、PCR産物を電気泳動で確認後、ABI 3130 autosequencer (Applied Biosystems)を用いて、直接シーケンス法により配列を決定した。

4. 研究成果

192例の母系遺伝形式をとる難聴患者および192例の孤発例の難聴患者のミトコンドリアDNAの全塩基配列を解析した結果、全384症例で総計634種類のSNPを同定した。そのうち7SNPは既知の難聴の原因遺伝子であり、21例で認めた。7SNPの内訳は827A>G, 961T>C, 1095T>C, 1494C>T, 1555A>G, 3243A>G, 7511T>Cであった。(表1) また、今回同定したSNPのうち10変異は過去に報告がない新規変異であった。

4変異は16S rRNA geneに存在し、

2069T>C, 2285T>G, 2285T>C, 2634T>C であり、それぞれの種の保存性は 31.4%~43.1%と低く、病的変異か否かについては確定できなかった。その他の 6 変異は NADH deshydrogenase 1 gene (MTND1 (MIM 516000)) に 3595A>G, cytochrome oxydase I gene (MTCO1 (MIM 516030)) に 6204A>G, ATPase 6 gene (MTATP6 (MIM 516060)) に 9124A>G, NADH deshydrogenase 4L gene (MTND4L (MIM 516004)) に 10680G>A, NADH deshydrogenase 5 gene (MTND5 (MIM 516005)) に 13153A>G, cytochrome b gene (MTCYB (MIM 516020)) に 15003G>C 変異を認めた。これらの 6 変異は 57.4%~100%と良好な種の保存性を示し病的変異である可能性が示唆されているが、9124A>G, 10680G>A, 13153A>G, 15003G>C は孤発例で発見された変異であり、明らかな病的変異と確定できなかった。

ND1 gene 内の変異である 3595A.>G および CO1 gene 内の変異の 6240A>G 変異は母系遺伝形式をとり病的変異であると考えられた。

3595A>G 変異および 6204A>G 変異の家系図および発端者の聴力像を図 1 および図 2 にそれぞれ示す。3595A>G 変異を持つ症例は、1 歳時より難聴が疑われ、3 歳時に高度難聴と診断され、母親も小児期より両側感音難聴および耳鳴とめまいを認めていた。

6204A>G 変異症例は、62 歳時に高音障害型の感音難聴を認め、母親も進行性の難聴を認めていた。

今回、我々はミトコンドリア DNA の全塩基配列の解析により新たに 2 種類の難聴の新規変異を認めた。ミトコンドリア遺伝子の SNP は老人性難聴に深く関与すると考えられ、今後これら難聴を引き起こすミトコンドリア遺伝子変異の SNP 情報をもとに、老人性難聴の SNP 解析を行う際のデータベースになると考えられる。

変異	症例数
827A>G	5
961insC	1
961T>C	1
1095T>C	1
1494C>T	1
1555A>G	3
3243A>G	2
7472insC	1
7511T>C	6

表 1. 全症例で同定した難聴の原因遺伝子

Location	Mutation	Mode of inheritance	Hearing level
16S rRNA	2069T>C	AD or Mit	high frequency
	2285T>C	AD or Mit	high frequency
	2285T>G	Sporadic	dish shaped
	2634T>C	Sporadic	profound
ND1	3595A>G	AD or Mit	high frequency
COI	6204A>G	AD or Mit	high frequency
ATPase6	9124A>G	Sporadic	unilateral
ND4L	10680G>A	Sporadic	unknown
ND5	13153A>G	Sporadic	high frequency
Cytb	15003G>C	Sporadic	profound

表 2. 本研究で見出された mitDNA の新規変異

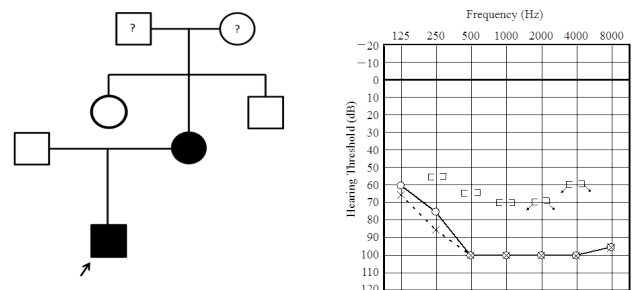


図 1. 3595A>G の家系図および聴力

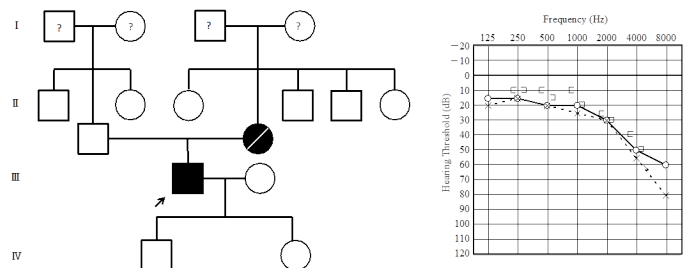


図 2. 6204A>G の家系図および聴力

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 3 件)

①塚田景大, 岩崎聡, 茂木英明, 工 穰, 宮川麻衣子, 西尾信哉, 宇佐美真一, 目でみる耳鼻咽喉科 乳突皮質形成による残存聴力活用型人工内耳の術後聴力への影響, 耳鼻咽喉科・頭頸部外科, 査読あり, 84 巻 2 号 2012, 91-95,

②Fukuoka H, Takumi Y, Tsukada K, Miyagawa M, Oguchi T, Ueda H, Kadoya M, Usami S. Comparison of the diagnostic value of 3 T MRI after intratympanic injection of GBCA, electrocochleography, and the glycerol test in patients with Meniere's disease. Acta Otolaryngol. 査読あり, 2012 132, 141-5.
DOI: 10.3109/00016489.2011.635383

③Tsukada K, Nishio S, Usami S; Deafness Gene Study Consortium. A large cohort study of GJB2 mutations in Japanese hearing loss patients. Clin Genet. 査読あり, 78(5), 2010, 464-70.
DOI:10.1111/j.1399-0004.2010.01407.x.

[学会発表] (計 8 件)

①塚田景大, 福岡久邦, 工 穰, 宇佐美真一, 残存聴力活用型人工内耳 (EAS) 症例の前庭機能評価について, 第 70 回日本めまい平衡医学会総会, 2011 年 11 月 17 日, 千葉

②福岡久邦, 工 穰, 宮川麻衣子, 塚田景大, 宇佐美真一, 画像により、イソソルビドの内リンパ水腫軽減効果を確認できた 1 例, 第 70 回日本めまい平衡医学会総会, 2011 年 11 月 17 日, 千葉

③塚田景大, 茂木英明, 工 穰, 宮川麻衣子, 西尾信哉, 岩崎 聡, 宇佐美真一, 残存聴力活用型人工内耳に対する骨パテを用いた乳突皮質形成による工夫, 第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会, 2011 年 6 月 23 日, 長野

④福岡久邦, 工 穰, 宮川麻衣子, 塚田景大, 小口智啓, 宇佐美真一, メニエール病の診断における 3 T-MRI の有用性, 第 73 回耳鼻咽喉科臨床学会, 2011 年 6 月 23 日, 長野

⑤鈴木宏明, 福岡久邦, 塚田景大, 宇佐美真一, SLC26A4 遺伝子変異における平衡機能評価, 第 69 回日本めまい平衡医学会, 2010 年

11 月 18 日, 京都

⑥塚田景大, 福岡久邦, 小口智啓, 宇佐美真一, 内耳神経低形成による一側性難聴症例における前庭機能の検討, 第 69 回日本めまい平衡医学会, 2010 年 11 月 18 日, 京都

⑦工 穰, 茂木英明, 塚田景大, 宮川麻衣子, 鬼頭良輔, 宇佐美真一, GJB2 遺伝子変異症例における ASSR での推定聴力閾値と成長後の純音聴力検査閾値比較, 第 55 回日本聴覚医学会総会・学術講演会, 2010 年 11 月 11 日, 奈良

⑧茂木英明, 塚田景大, 鬼頭良輔, 工 穰, 宇佐美真一, 蝸牛神経低形成による小児一側性難聴 15 例の検討, 第 55 回日本聴覚医学会総会・学術講演会, 2010 年 11 月 11 日, 奈良

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚田 景大 (TSUKADA KEITA)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90419375

(3) 連携研究者

矢野 卓也 (YANO TAKUYA)
信州大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 10511058

西尾 信哉 (NISHIO SHIN-YA)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 70467166