

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861544

研究課題名(和文) OTOF遺伝子変異による難聴のデータベース構築とOAE消失メカニズムの解析

研究課題名(英文) OTOF mutation screening in Japanese sensorineural hearing loss patients

研究代表者

鈴木 宏明 (SUZUKI, Hiroaki)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：00419368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Auditory neuropathy spectrum disorder(以下ANSND)は、OAE(耳音響反射)が正常でABR(聴性脳幹反応)が無反応もしくは異常反応となる新しいタイプの難聴である。本研究では、日本人難聴患者におけるOTOF遺伝子変異の頻度とその種類を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果OTOF遺伝子の解析を実施した結果、160例中3例にホモ接合体変異、4例よりヘテロ接合体変異、9例よりヘテロ接合体変異を見出した。今回検索を行った160例中7例(4.4%)がOTOF遺伝子変異による難聴であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Auditory neuropathy spectrum disorder (ANSND) is a unique form of hearing loss that involves absence or severe abnormality of auditory brainstem response (ABR), but also the presence of otoacoustic emissions (OAEs). We screened 160 unrelated Japanese with severe to profound recessive nonsyndromic hearing loss (ARNSHL) without GJB2 or SLC26A4 mutations, and 192 controls with normal hearing, and identified five pathogenic OTOF mutations (p.D398E, p.Y474X, p.N727S, p.R1856Q and p.R1939Q). The present study showed that OTOF mutations accounted for 3.2-7.3% of severe to profound ARNSHL patients in Japan.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 遺伝子 OTOF

1. 研究開始当初の背景

Auditory neuropathy spectrum disorder (以下 ANSD) は、OAE (耳音響反射) が正常で ABR (聴性脳幹反応) が無反応もしくは異常反応となる新しいタイプの難聴として 1996 年に Kaga ら、Star らによりそれぞれ提唱された難聴である。

OAE (耳音響反射) が正常で ABR (聴性脳幹反応) が無反応もしくは異常反応となることより、正常な外有毛細胞の機能があるにもかかわらず、蝸牛神経から聴覚中枢路の機能障害を有する結果を示す点が通常の感音難聴と異なる特徴であり、ANSD の病態は、内耳障害により OAE を消失するこれまでの一般的な感音難聴とは大きく異なる病態であると考えられている。

小児感音難聴のうち ANSD の占める割合は 10-14% とされており、原因疾患は、遺伝性神経疾患が 42%、中毒、代謝、免疫、感染が 10%、特発性が 48% とされ (Starr et al. 2000)、特発性のうち非症候群性 ANSD が関与する割合が高いものと考えられている。

OTOF 遺伝子は先天性の高度難聴を呈する非症候群性 ANSD の原因遺伝子としてはじめて同定された遺伝子である。遺伝子産物 *otoferlin* は内毛細胞のリボンシナプスにおける膜融合をトリガーする Ca^{2+} センサーとして働き、シナプス小胞のエクソサイトーシスに重要な役割を持つ。*OTOF* 遺伝子変異による難聴では、初期には外有毛細胞の機能は保たれるために生後 1、2 年は ANSD の形をとるが、一部外有毛細胞にも発現しているため経過中に OAE を消失する (Smith et al. 2008)。各国の難聴患者における *OTOF* 変異の割合は 2.3-5.0% との報告があり、頻度の高い遺伝子変異となっているが、研究開始までに本邦における *OTOF* 遺伝子変異の頻度を大規模に示した報告はなかった。

また、*OTOF* 遺伝子変異においては、有毛細胞のシナプス小胞のエクソサイトーシス機能がされる病態であることが予測されるため、より中枢に近い領域の機能低下により引き起こされる他の ANSD と比較して人工内耳の効果が良好であり (Rouillon et al. 2006)、遺伝子診断により確定診断されれば治療効果予測も可能となる面で診断価値は高く、遺伝子変異の頻度の同定も患者にとって有益であると考えられていた。

2. 研究の目的

Auditory neuropathy は、OAE が正常で ABR が無反応もしくは異常反応となる新しいタイプの難聴である。Auditory neuropathy の原因遺伝子の中で最も頻度の高いのが *OTOF* 遺伝子変異であるが、研究開始までに本邦における *OTOF* 遺伝子変異の頻度は明らかとなっていなかった。

そこで、本研究では、1) 日本人難聴患者における *OTOF* 遺伝子変異の頻度とその種類

を明らかにするとともに、2) 進行により OAE が消失するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

特に、*OTOF* 遺伝子変異は初期には ANSD の病態を示すが経過中に OAE を消失する。よって ANSD の形態をとっていない難聴患者の中にも *OTOF* 遺伝子変異を有する例が存在すると考えられることより、本研究では、ANSD の患者のみならず、孤発例や常染色体劣性遺伝形式の多数の症例における *OTOF* 遺伝子変異を解析し日本人における遺伝子変異の種類、頻度を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 日本人先天性高度～重度感音難聴症例における *OTOF* 遺伝子変異の頻度に関する研究

研究開始時点において *OTOF* 遺伝子変異は初期には ANSD の病態を示すが経過中に OAE を消失すること、および先天性の高度～重度感音難聴を呈することが明らかとなっていたことより、当研究室において集積されている日本人難聴遺伝子データベースに登録されている日本人難聴患者のうち、先天性の高度～重度感音難聴を呈する劣性遺伝家系または孤発例 160 例を対象に *OTOF* 遺伝子の解析を実施した。

2) 日本人難聴症例における *OTOF* 遺伝子変異の頻度および臨床的特徴に関する研究

次に、*OTOF* 遺伝子変異が先天性の高度～重度感音難聴以外の臨床像を呈する可能性を考慮し、当研究室において集積されている日本人難聴遺伝子データベースに登録されている日本人難聴患者を用いた大規模症例を対象に *OTOF* 遺伝子の解析を実施した。

3) 人工内耳装用 *OTOF* 遺伝子変異症例における OAE の変化に関する研究

OTOF 遺伝子変異による ANSD は、初期には OAE (耳音響反射) が正常で ABR (聴性脳幹反応) が無反応となる典型的なオーディトリニューロパチーを示すが、難聴の進行とともに OAE を消失する。しかしながら、いったん成立した OAE が経過とともに消失するメカニズムに関しては未だ明らかとなっていない。我々は OAE が消失する原因として、長期にわたり求心性刺激がなされない事により、廃用性に外有毛細胞の機能が失われる事によると仮定した。そこで、内耳機能を温存する *OTOF* 遺伝子変異による難聴症例を対象に低侵襲人工内耳手術を施行し、電極刺激後の OAE の経時的変化をみることで上記の仮定の検討を試みた。

4. 研究成果

1) 日本人先天性高度～重度感音難聴症例における *OTOF* 遺伝子変異の頻度に関する研究

日本人難聴遺伝子データベースに登録されている日本人難聴患者のうち、先天性の高度～重度感音難聴を呈する劣性遺伝家系または孤発例 160 例を対象に *OTOF* 遺伝子の解析を実施した結果、160 例中 3 例にホモ接合体変異、4 例よりヘテロ接合体変異、9 例よりヘテロ接合体変異を見出した。今回検索を行った 160 例中 7 例 (4.4%) が *OTOF* 遺伝子変異による難聴であることが明らかとなった。7 例のうち 2 例は OAE も無反応であり、通常の感音難聴と区別のできない臨床像であることが明らかとなった。また、見出された遺伝子変異の大部分は海外での変異とは異なる変異であり、日本人独特の変異スペクトラムがあることが示唆された (表 1)。

表 1 日本人難聴患者より見出された *OTOF* 遺伝子変異

Exon	DNA level	Protein level	Occurrence in this work (chromosome)	Control (chromosome)	Functional prediction	PhysOf	SIFT (p-value)	P2 D.S.	LRT	Mutation taster	GERP ++	References
Possible pathogenic variants												
Exon 14	c.1422T>A	p.S474X	2/320	0/374	N (0.027941)	NA (0.029813)	NA (0.58309)	D (1)	A (1)		-3.78	[1]
Exon 18	c.2151G>A	p.W171X	1/320	0/344	C (0.99474)	NA (0.90343)	NA (0.73490)	D (0.99998)	A (1)		3.83	This study
Exon 38	c.4748G>A	p.S1368X	1/320	0/364	N (0.94413)	NA (0.915)	NA (0.55489)	NA (0.526679)	A (1)		0.571	This study
Exon 38	c.4748G>A	p.R1368H	1/320	0/366	C (0.99793)	D (1)	D (0.999)	D (1)	D (0.999661)		4.69	This study
Exon 44	c.5567G>A	p.R1850Q	1/320	0/380	C (0.99611)	T (0.91)	P (0.813)	D (1)	D (0.999517)		4.1	[1]
Exon 46	c.5816G>A	p.R1939Q	11/320	0/382	N (0.99658)	T (0.92)	NA (0.746872)	NA (1)	D (0.99988)		3.38	[2]
Uncertain pathogenic variants												
Exon 12	c.1194T>A	p.D398E*	1/320	1/380	N (0.23278)	T (0.77)	D (0.853)	D (1)	D (0.99165)		0.981	[2]
Exon 13	c.1350G>G	p.A450E*	1/320	1/380	C (0.986229)	T (0.74)	D (0.853)	D (1)	D (0.991594)		3.54	This study
Exon 18	c.2180A>G	p.N1727*	2/320	1/344	C (0.99286)	T (0.27)	P (0.388)	D (1)	D (0.95528)		3.98	[2]
Exon 43	c.5332G>A	p.V1778*	1/320	0/378	C (0.997116)	T (0.54)	P (0.289)	D (1)	D (0.994783)		4.38	This study
Exon 43	c.5350G>C	p.S1828*	1/320	0/378	C (0.99455)	D (1)	D (0.995)	D (1)	D (0.99916)		4.26	This study

*The variants found in controls.
 Exon number was named based on ENIGM00049394.
 A, disease causing automatic; C, conserved; D, damaging or disease causing; N, not conserved; NA, not applicable; P, possibly damaging; T, tolerated; P2 D.S., Polyphen-2 damaging score; Polyphen-2, PhysOf, LRT, Mutation Taster, and GERP++ are functional prediction scores that indicate a probable mutation with increasing value.

2) 日本人難聴症例における *OTOF* 遺伝子変異の頻度および臨床的特徴に関する研究

OTOF 遺伝子変異が先天性の高度～重度感音難聴以外の臨床像を呈する可能性を考慮し、当研究室において集積されている日本人難聴遺伝子データベースに登録されている日本人難聴患者 1,000 例を対象に、最初の研究により見出された変異の TaqMan Genotyping 法による *OTOF* 遺伝子の解析を実施した。

その結果解析を実施した 1000 例のうち、12 例に *OTOF*:p. R1939Q 変異が認められ、3 例に *OTOF*:p. Y474X 変異が認められた。見出された症例はいずれもヘテロ接合体であったため、15 例を対象に *OTOF* 遺伝子の直接シーケンス解析を実施したところ、6 例から新規の *OTOF* 遺伝子変異を見出し確定診断に至った。日本人難聴患者に高頻度で認められる変異をスクリーニングとして優先的に解析を行い、ヘテロ例に関して直接シーケンス解析を行うことで、効率的に *OTOF* 遺伝子変異による難聴を診断することが可能であると考えられる。

3) 人工内耳装用 *OTOF* 遺伝子変異症例における OAE の変化に関する研究

OTOF 遺伝子変異症例において、初期には ANSD 症状を呈するものの、その後、OAE が消失する原因として、長期にわたり求心性刺激

がなされない事により、廃用性に外有毛細胞の機能が失われる事によると仮定した。そこで、内耳機能を温存する *OTOF* 遺伝子変異による難聴症例を対象に低侵襲人工内耳手術を施行し、電極刺激後の OAE の経時的変化をみた。

OTOF 遺伝子変異の同定された症例 4 例 (8 耳) に人工内耳挿入術を実施し、術前、術後半年、術後 1 年、術後 2 年時の OAE を測定した。術前に OAE の反応が認められたものは、8 耳中 7 耳であったものが、術後半年の時点で 8 耳中 0 耳であり、前例で OAE が消失することが明らかとなった。したがって、人工内耳による電気刺激により求心性刺激を実施した場合でも、外有毛細胞の機能が失われることが明らかとなり、当初の仮説ではない別のメカニズムにより OAE の消失が引き起こされていることが明らかとなった。

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)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 鈴木宏明、工 穰、宇佐美真一. 真珠腫性中耳炎に伴う内耳瘻孔例の検討. 第 25 回日本耳科学会. 2015. 10. 7-10. 長崎ブリックホール
- ② 工 穰、森健太郎、鈴木宏明、塚田景大、宮川麻衣子、茂木英明、岩崎聡、宇佐美真一. 人工聴覚器の適応と個別化医療について. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2015. 5. 20-23. 東京国際フォーラム
- ③ 鈴木宏明、工 穰、宇佐美真一. 小児における先天性真珠腫手術症例の検討. 第 10 回 日本小児耳鼻咽喉科学会総会. 2015. 5. 8-9. 軽井沢プリンスホテル
- ④ 鈴木伸嘉、佐藤梨里子、鈴木宏明、塚田景大、岩佐陽一郎、工 穰、岩崎聡、宇佐美真一. 補聴器適合検査の指針 (2010) における検査結果の変化. 第 59 回日本聴覚医学会. 2014. 11. 27-28. 海峡メッセ下関.
- ⑤ 森健太郎、矢野卓也、宮川麻衣子、塚田景大、鈴木宏明、宇佐美真一. 複数遺伝子に変異が認められた遺伝性難聴症例の検討. 第 24 回日本耳科学会. 2014. 10. 5-18. 朱鷺メッセ、新潟市
- ⑥ 鈴木宏明、工 穰、宇佐美真一. 当科において外リンパ瘻が疑われ手術施行された症例における臨床像と術後成績. 第 24 回日本耳科学会. 2014. 10. 5-18.

朱鷺メッセ、新潟市

- ⑦ 森健太郎、志摩温、矢野卓也、宮川麻衣子、塚田景大、鈴木宏明、宇佐美真一. 複数の原因遺伝子が同定された遺伝性難聴症例の検討. 第76回耳鼻咽喉科臨床学会. 2014.6.26-27. 盛岡グランドホテル
- ⑧ 鈴木宏明、工 穰、宇佐美真一. 当科における外耳・中耳奇形症例の検討. 第9回日本小児耳鼻咽喉科学会. 2014.6.6-6.7. アクトシティ浜松
- ⑨ Iwasa Y, Yoshimura H, Suzuki H, Takumi Y, Usami S. *OTOF* mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients. 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck surgery 2013.12.5-7. Taiwan University Hospital
- ⑩ 岩佐陽一郎、吉村豪兼、鈴木宏明、工穰、宇佐美真一. *OTOF* 遺伝子変異による Auditory neuropathy 症例の臨床像と人工内耳の効果に関する検討. 第8回日本小児耳鼻咽喉科学会総会. 2013.6.20~21. 前橋テルサ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 宏明 (SUZUKI, Hiroaki)
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・助教
研究者番号：00419368

(2) 研究協力者

岩佐 陽一郎 (IWASA, Yohichirou)
信州大学・医学部・助教 (特定雇用)
研究者番号：10613002

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

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