

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462556

研究課題名(和文) KCNQ4遺伝子変異による高音障害・皿形難聴発症メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) High frequency and mid frequency hearing loss caused by KCNQ4 gene mutations

研究代表者

内藤 武彦 (NAITO, Takehiko)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50467164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：KCNQ4遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴の原因遺伝子の1つである。本研究では日本人難聴患者を対象にKCNQ4遺伝子解析を実施することで、日本人難聴患者におけるKCNQ4遺伝子変異症例の割合を明らかにするとともに、変異スペクトラム(変異の種類と割合)を明らかにすることを目的に検討を行った。その結果、候補となり得る遺伝子変異が認められた家系は、54家系21変異であることが明らかとなった。また、見出された家系の臨床情報より変異の部位により聴力像や進行性が異なることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study of KCNQ4 mutations was carried out to determine the prevalence by unbiased population-based genetic screening, clarify the mutation spectrum and genotype/phenotype correlations, and summarize clinical characteristics. The screening using 609 probands from unbiased Japanese autosomal dominant nonsyndromic hearing loss families identified 54 families with 21 different disease causing mutations. The present study adds a new typical audiogram configuration characterized by mid-frequency predominant hearing loss caused by the p.V230E mutation. A variant at the N-terminal site showed typical ski-slope type audiogram configuration. Concerning clinical features, onset age was from 3 to 40 years old, and mostly in the teens, and hearing loss was gradually progressive. Progressive nature is a common feature of patients with KCNQ4 mutations regardless of the mutation type. However, hearing loss progression pattern was quite differ among the mutation site.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 遺伝子 KCNQ4

## 1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1,000 名に 1 名に認められる比較的頻度の高い障害である。これまで我々は日本人の難聴患者の遺伝子解析を行い、*GJB2* 遺伝子、*SLC26A4* 遺伝子など多数の難聴遺伝子が日本人難聴患者にも関与していることを報告してきた。

*KCNQ4* 遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴の原因遺伝子の 1 つであるが、比較的稀な原因遺伝子であることより症例報告が少なく、*KCNQ4* 遺伝子変異による難聴患者の臨床的特徴の詳細は明らかではなかった。研究代表者は優性遺伝形式を取る非症候群性感音難聴家系を対象に、*KCNQ4* 遺伝子変異解析を行った結果、日本人における *KCNQ4* 遺伝子変異の頻度、スペクトラム、および臨床的特徴を検討してきた。

本邦における常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性難聴家系に占める *KCNQ4* 遺伝子変異症例の割合は 6.6% であり、難聴患者全体で見ても 2% 程度と比較的高く、*TECTA* 遺伝子 (2.9%) や *WFS1* 遺伝子 (1.1%) と比較しても高頻度であり、優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴の原因遺伝子としてまず考慮すべき最重要な遺伝子であることを明らかにしてきた。また、検出された変異は 19 家系より 7 種類であった。興味深い事に、N 末端位置にある c.211delC 変異は優性遺伝形式を取る難聴の原因としては珍しく複数家系に同一変異が認められており、創始者変異であると考えられる。また、見出された *KCNQ4* のうち 7 種類の変異は、N 末端、電位センサー部、P-LOOP 領域の 3 つに位置し、各位置で特徴的な聴力像を示した。c.211delC 変異では高音域が経時的に障害されるが低・中音域は保存される傾向があり、V230E 変異では中音域が経時的に障害される皿型の聴力像を示し、W276S 変異等では中・高音域が障害される高音漸傾型を示すことを明らかにしたが、症例数が乏しいことより、さらなる症例の追加が必要な状況であった。

変異の部位により聴力像が異なる一因としてスプライシング・バリエーションの関与が考えられる。マウスの内耳に発現する *KCNQ4* 遺伝子の発現解析より、蝸牛の周波数特性軸に沿って機能活性が異なる 4 つのスプライシング・バリエーションがあることが明らかにされている。これらスプライシング・バリエーションのうち細胞内のセンサーを欠くバリエーションは、高音領域にのみ発現しており、周波数が多く (すなわち振動数が多く) 流入量が多い K<sup>+</sup> イオンを効率よく輸送するメカニズムが考えられている。またヒトでも一部 exon が欠落したバリエーションが存在することが報告されており、マウスと同様に高音領域にのみ発現するバリエーションが存在する可能性が示唆される。この理論的背景をもとにすれば、変異の存在位置によって障害される周波数が異なることを合理的に説明できる可能性が

考えられる。そこで、本研究では、*KCNQ4* 遺伝子変異の大規模解析を行い、変異部位とスプライシング・バリエーションに注目した病態解明を進めることにした。

## 2. 研究の目的

*KCNQ4* 遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴の原因遺伝子の 1 つであるが、比較的稀な原因遺伝子であることより症例報告が少なく、*KCNQ4* 遺伝子変異による難聴患者の臨床的特徴の詳細は明らかではなかった。過去に見出された変異は、N 末端、電位センサー部、P-LOOP 領域の 3 つに位置し、各位置で特徴的な聴力像を示していた。

そこで、本研究ではこれまでの研究を進展させ、さらに大規模に日本人難聴患者を対象にした *KCNQ4* 遺伝子解析を実施することで、日本人難聴患者における *KCNQ4* 遺伝子変異症例の割合を明らかにするとともに、変異スペクトラム (変異の種類と割合) を明らかにすることを目的とした。

また、*KCNQ4* 遺伝子変異の見出された症例を対象に聴力像などの臨床情報を収集し、遺伝子型と臨床像の相関解析を行い、各変異を有する症例の臨床的特徴を明らかにすることも目的とした。特に、*KCNQ4* 遺伝子変異では難聴の進行、耳鳴、癩癩の合併の可能性があるため、これらの臨床症状に関してレトロスペクティブに情報収集を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) *KCNQ4* の遺伝子変異の解析および臨床像との相関解析

予備的な検討により *KCNQ4* 遺伝子変異による難聴では、変異の部位により、患者の臨床像 (発生年齢、聴力型、経時的变化) に大きなバリエーションがあることがある程度明らかとなっていた。特に、c.211delC 変異では高音域が経時的に障害されるが低・中音域は保存される傾向があり、V230E 変異では中音域が経時的に障害される皿型の聴力像を示すことが明らかとなった。中音域が障害される遺伝子として *TECTA* が報告されているが、同様にどのようなメカニズムで中音域だけが障害されるかについては明らかとなっていない。そこで、本研究では *KCNQ4* 遺伝子変異の種類毎に臨床型のバリエーションを把握するとともに、聴力型や進行性などの特徴を収集することにより遺伝子型と臨床像の相関について検討を行なった。

具体的には、当施設および共同研究施設を受診した常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者を対象に、書面で同意を得て DNA を採取し、*KCNQ4* 遺伝子の解析を直接シーケンス

法および次世代シーケンス法で行なった。解析結果を元に遺伝子変異の種類、頻度について検討を行った。また、*KCNQ4* 遺伝子変異の同定された家系を対象に、聴力像などの臨床情報を収集し、遺伝子型と臨床像の相関解析を行った。特に、*KCNQ4* 遺伝子変異では難聴の進行、耳鳴、癲癇の合併の可能性があるため、これらの臨床症状に関してレトロスペクティブに情報収集を実施した。

## (2) 頻度の高い *KCNQ4* 遺伝子変異の特徴の把握と治療法の検討

予備的に実施したスクリーニングにより見つけられた *KCNQ4* 遺伝子変異のうち c.211delC (N 末端側に位置する変異) は特に頻度の高く、優性遺伝形式をとる難聴家系に占める割合も高いことが明らかとなっていた。そこで、この変異の表現型と遺伝子型の特徴を把握するとともに、補聴器、人工内耳といった治療法の効果に関して検討を行った。

具体的には、*KCNQ4* 遺伝子変異の同定された症例を対象に、聴力像などの臨床情報を基に、周波数ごとの聴力、年齢、聴力像タイプ (周波数と難聴程度の関係)、進行度タイプ (年齢と難聴程度の関係) を調べ、c.211delC 変異以外の変異との差異について検討を行った。特に、高音域の閾値上昇と比較的保たれる低音域の閾値という特徴をとらえることができるように、変異を有する症例の聴力データを年代ごとに集計することで、自然経過 (難聴の進行速度) を明らかにすることを目的に検討を行った。また、低音域が保たれることは、高音域は内耳に埋め込んだ電極からの刺激により聴力を改善し、低音域は音響信号を増幅して残存聴力を活用する残存聴力活用型人工内耳の好適応になる可能性があるため、その有効性に関して検討を行った。

## 4. 研究成果

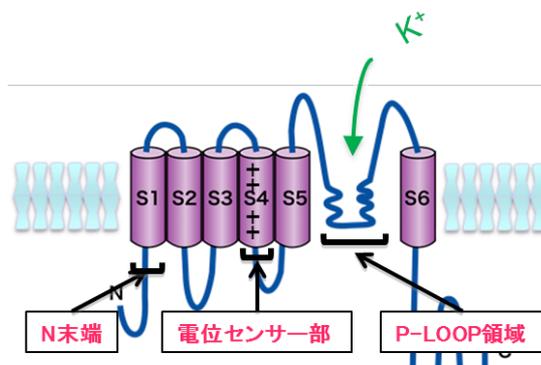
### (1) *KCNQ4* の遺伝子変異の解析および臨床像との相関解析

当施設および共同研究施設により収集された日本人難聴患者の聴力データと DNA のバンクである日本人難聴遺伝子データベースより選別された常染色体優性遺伝形式をとる難聴患者 (609 家系) を対象に *KCNQ4* 遺伝子の解析を直接シーケンス法および次世代シーケンス法で行なった。その結果、候補となり得る遺伝子変異が認められた家系は、54 家系 21 変異であることが明らかとなった。

見出された 21 種類の変異のうち 7 種類は過去に報告のある変異であり (c.211delC、

c.229\_230insGC、p.V230E、p.W276S、p.P291L、p.P291L、p.R297S)、14 種類は新規変異であった。過去に報告された遺伝子変異を含めて、変異の見出された症例に関しては家族サンプルの収集を行うとともに家系との整合性 (segregation) に関して確認を行った。

また、*KCNQ4* 遺伝子変異の同定された家系を対象に、聴力像などの臨床情報を収集し、遺伝子型と臨床像の相関解析を行った。その結果、N 末端付近に変異を有する c.211delC と c.229\_230insGC 変異症例では、高音急墜型の聴力像を呈するのに対し、電位センサー部に位置する p.V230E 変異例等は皿型の聴力像を呈することが多数症例の検討でも明らかとなった。また、カリウムイオンの通過するチャンネル部位である P-Loop 領域の変異では高音漸傾型の聴力像を呈することが明らかとなった (図 1、図 2)

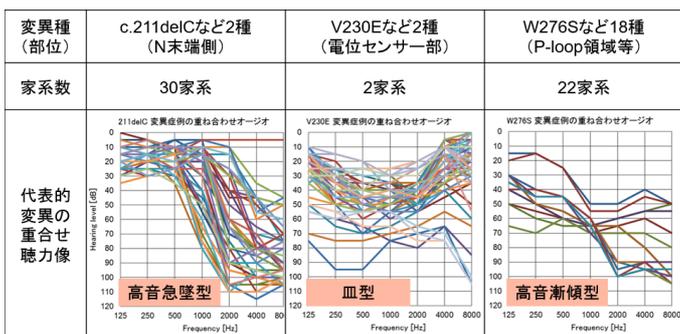


(図 1) *KCNQ4* 遺伝子の模式図

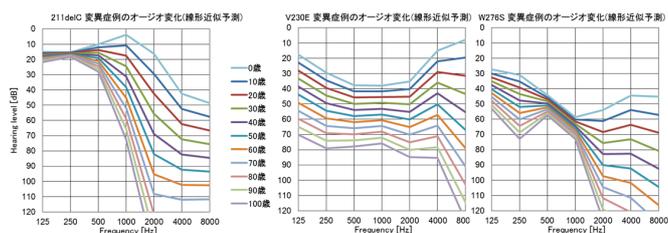
*KCNQ4* 遺伝子の模式図および日本人難聴患者に多く変異の認められた部位。*KCNQ4* 遺伝子は 6 回膜貫通型のカリウムイオンチャンネルであり、S4 領域に電位センサー、S5-S6 のリンカー領域にカリウムイオンのチャンネルが存在する。日本人難聴患者に多く認められる変異は、N 末端付近、電位センサー部、P-Loop 領域に集積しており、それぞれ特徴的な聴力像を呈することが明らかとなった。

### (2) 頻度の高い *KCNQ4* 遺伝子変異の特徴の把握と治療法の検討

*KCNQ4* 遺伝子変異の同定された症例を対象に、聴力像などの臨床情報を基に、周波数ごとの聴力、年齢、聴力像タイプ (周波数と難聴程度の関係)、進行度タイプ (年齢と難聴程度の関係) について検討を行った。その結果、N 末端の変異では高音域において年齢ごとに閾値上昇を認めるのに対し低音域は比較的保たれることが明らかとなった。同様に、電位センサー部および P-Loop 領域の変異に関しても年代ごとの聴力閾値の変化をとらえることができた。



(図2) *KCNQ4* 遺伝子症例の聴力像  
日本人難聴患者に多く変異の認められた *KCNQ4* 遺伝子変異部位と聴力像。  
N末端付近に変異を有する症例では、高音急墜型の聴力像を呈するのに対し、電位センサー部に位置する変異例等は皿型の聴力像を呈することが明らかとなった。また、P-Loop領域の変異では高音漸傾型の聴力像を呈することが明らかとなった



(図3) 代表的な遺伝子変異の難聴の進行性(線形予測)  
遺伝子変異毎に難聴の進行性の予測を行った結果、変異の種類により異なる経過をと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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nishio S, Hattori M, Moteki H, Tsukada K, Miyagawa M, Naito T, Yoshimura H, Iwasa Y, Mori K, Shima Y, Sakuma N, Usami S., Gene Expression Profiles of Cochlea and Vestibular Endorgans: Localization and Function of Genes Causing Deafness., *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 査読有、Vol.124, 2015, pp.6-48, doi: 10.1177/0003489415575549.
- ② Ishikawa K, Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Nakamura K, Usami S, Ichimura K., A Japanese family showing

high-frequency hearing loss with *KCNQ4* and *TECTA* mutations., *Acta Otolaryngol*, 査読有、Vol.134, 2014, pp.557-563.  
doi: 10.3109/00016489.2014.890740.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一、次世代シーケンサーを用いた日本人難聴患者 1120 例の網羅的遺伝子解析、第 60 回日本人類遺伝学会、2015. 10. 14-17、京王プラザホテル (東京都)
- ② 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一、次世代シーケンサーを用いた日本人難聴患者 1120 例の網羅的遺伝子解析、第 25 回日本耳科学会、2015. 10. 7-10、長崎ブリックホール(長崎市)
- ③ 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一、日本人難聴遺伝子変異データベースの構築と臨床応用、第 59 回日本聴覚医学会、2014. 11. 27-28、海峡メッセ下関 (下関市)
- ④ 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一、日本人難聴遺伝子変異データベースの構築と臨床応用、第 59 回日本人類遺伝学会、2014. 11. 19-22、タワーホール船堀 (東京都)
- ⑤ Nishio S, Miyagawa M, Naito T, Iwasa Y, Ichinose A, Usami S., Clinical Genetic Testing Based on Massively Parallel DNA Sequencing., *Inner Ear Biology Workshop*, 2014. 11. 1-4、京都国際会議場 (京都市)
- ⑥ 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、岩佐陽一郎、市瀬彩、宇佐美真一、次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子診断システムの開発と臨床応用、第 24 回日本耳科学会、2014. 10. 5-18、朱鷺メッセ (新潟市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内藤 武彦 (NAITO, Takehiko)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：5 0 4 6 7 1 6 4

### (2) 連携研究者

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：1 0 1 8 4 9 9 6

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