

199900512A

---

# 遺伝性難聴の遺伝子解析に関する研究

---

研究期間 平成9年度－平成11年度

厚生科学研究費補助金  
感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業（感覚器障害研究分野）

平成12年3月

主任研究者 宇佐美 真一

（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

厚生大臣 丹羽 雄哉 殿

フリカナ ウサミ シンイチ  
 研究者 氏 名 宇佐美 真一  
 (所属施設 信州大学医学部)

感覚器障害及び免疫・アレルギー等

平成 11 年度厚生科学研究費補助金 ( 感覚器障害研究分野 ) 研究事業) に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 遺伝性難聴の遺伝子解析に関する研究 ( H10-感覚器-003 )

国庫補助金精算所要額 : 金 36,000,000 円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
(1) J Med Genet ;37:41-3. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese.	2000		Abe S, <u>Usami S</u> , Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ.
(2) J Med Genet ;37:38-40. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients.	2000		<u>Usami S</u> , Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, et al.
(3) 「Genetics in Otorhinolaryngology Adv Otorhinolaryngol. Vol. 56」 221-9. Sensorineural hearing loss associated with the mitochondrial mutations.	2000	Karger	<u>Usami S</u> , Abe S, Akita J, Shinkawa H, Kimberling WJ.
(4) Am J Hum Genet ;66:1199-210. Genomic Structure and Identification of Novel Mutations in Usherin, the Gene Responsible for Usher Syndrome Type IIa.	2000		Weston MD, Eudy JD, Fujita S, Yao S, <u>Usami S</u> , et al.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
(5) 日本医師会雑誌 ; 123 (6) : 773-8. 遺伝性難聴	2000		<u>宇佐美真一</u>
(6) 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 ; 72 (3) : 189-193. 結核治療と耳鼻咽喉科－聴覚・平衡機能障害を中心に－	2000		<u>宇佐美真一</u> 、 佐藤圭司
(7) JOHNS ; 16(2) : 199-204. 幼小児感音難聴の原因－特に遺伝子異常－	2000		<u>宇佐美真一</u>
(8) 「新 図説耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座 第一巻 内耳」 : 78-81. 遺伝子異常と難聴 (SM難聴, 前庭水管拡大症)	2000	メジカルビュー社	<u>宇佐美真一</u>
(9) 「Molecular medicine: novel findings of gene diagnosis, regulation of gene expression, and gene therapy」 : 31-7. Sensorineural hearing loss caused by the A1555G mutation in the mitochondrial DNA.	1999	Elsevier	Abe S, <u>Usami S</u> , Shinkawa H, Kimberling WJ.
(10) Genomics ; 62:172-6. Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12.	1999		Kelley PM, Abe S, Askew JW, Smith SD, <u>Usami S</u> , Kimberling WJ.
(11) J Hum Genet ; 44:261-5. EYA1 nonsense mutation in a Japanese branchio-oto-renal syndrome family.	1999		<u>Usami S</u> , Abe S, Shinkawa H, Deffenbacher K, Kumar S, Kimberling WJ.
(12) J Hum Genet ; 44:304-7. Rapid mass screening method and counseling for the 1555A→G mitochondrial mutation.	1999		<u>Usami S</u> , Abe S, Shinkawa H, Inoue Y, Yamaguchi T.
(13) 生体の科学 ; 50 (5) : 391-2. 先天性難聴	1999		<u>宇佐美真一</u>
(14) 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 ; 71 (6) ; 327-38. 難聴の遺伝子解析-update-	1999		<u>宇佐美真一</u>

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
(15)「内耳研究 最近の進歩」： 21-6. 難聴と遺伝子変異	1999	金原出版	<u>宇佐美真一</u>

5. 研究成果による特許権等の知的財産権の取得状況

該当なし

厚生科学研究費補助金  
(感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業 (感覚器障害研究分野))  
総括研究報告書

遺伝性難聴の遺伝子解析に関する研究

主任研究者 宇佐美 真一 信州大学医学部耳鼻咽喉科教授

研究要旨

日本人の遺伝性難聴家系を対象に難聴の原因遺伝子の関与を検討するために本研究を行った。その結果、難聴患者には種々の遺伝子が関与していることが明らかとなった。内耳奇形の一つである「前庭水管拡大を伴った難聴」は Pendred 症候群の原因遺伝子である PDS 遺伝子の変異が原因であることが明らかとなった。また難聴の原因遺伝子として世界的に注目を集めている Cx26 遺伝子の変異をスクリーニングした結果、Cx26 遺伝子の変異が日本人の難聴にも深く関与していることが明らかとなった。ミトコンドリア遺伝子の変異 (1555A → G 点変異) に関しては日本人の難聴患者の主要な原因の一つであることが明らかとなった。さらにこれらの遺伝子の診断法、治療、予防に関して検討した。

A. 研究目的

疫学統計によれば小児の難聴の約半数は遺伝性のもと考えられているが、ここ数年の分子遺伝学のめざましい発展により、すでにいくつかの遺伝性難聴の原因遺伝子、あるいは原因遺伝子の存在する染色体上のおおよその位置 (遺伝子座) が特定され始めている。今後はこれらの分子遺伝学的知見が増すにつれ難聴の正確な診断がなされるようになり、治療やカウンセリングに結び付いていくと思われる。今回、従来から経過を追っていた遺伝性難聴家系や外来を受診する難聴患者を対象に、難聴の原因遺伝子の解析をするために本研究を企図した。

B. 研究方法

今年度は連鎖解析により主として常染色体優性遺伝形式をとる家系に関して検討を行った。また既知の原因遺伝子の関与については MASA 法、RFLP 法、ヘテロデュプレックス法、直接シーケンス法などを用い

検討した。さらに今年度は今後の臨床面への応用を考え DNA マイクロアレイを用いた遺伝子変異スクリーニング法を完成させた。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断、検査に際しては日本人類遺伝学会およびアメリカ人類遺伝学会の倫理規定にしたがった同意書をすでに作成し研究対象者のインフォームドコンセントを得ている。また本研究実施に際しては施設の倫理委員会に申請を行い承認を受けている。

C. 研究結果

前年度までの研究の結果、難聴患者の中に種々の遺伝子変異が確認され難聴患者に遺伝子が関与していることが明らかとなった。今年度はさらに新しい遺伝子の関与を検討するとともに、特に高頻度で見出される PDS 遺伝子、Cx26 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子 1555 変異の 3 つの遺伝子に関して研究を行った。Pendred 症候群の原因遺伝子である PDS 遺伝子の変異は同時に

「前庭水管拡大を伴った非症候性難聴」の原因でもあることが明らかとなったが、今年度頻度調査を行ったところ Pendred 症候群の 89 %にまた「前庭水管拡大を伴った難聴」症例の 58 %に PDS 遺伝子の変異が同定された。これらの症例について遺伝子型／表現型（臨床型）の検討を行い Pendred 症候群と比較した。また日本人の難聴家系にも深く関与していることが明らかとなったコネキシン(Cx)26 遺伝子の変異に関しては今年度の研究で DNA マイクロアレイを用いた Cx26 遺伝子変異スクリーニング法を完成させた。またミトコンドリア遺伝子の変異（1555A → G 点変異）を持つ症例に関しては新しいマススクリーニング法を用い、この変異を持つ患者に対してはアミノ配糖体抗生物質に注意するよう「薬物カード」を渡し予防、啓蒙に努めた。また今年度新たに常染色体優性遺伝形式をとる DFNA2 の原因遺伝子 KCNQ4 や DFNA9 の原因遺伝子 COCH の遺伝子変異を日本人家系で初めて見出し、これらの遺伝子が日本人の難聴にも関与していることが明らかにした。

#### D. 考察

本研究により難聴患者の中に種々の遺伝子変異が確認され難聴患者に遺伝子が関与していることが明らかとなった。このうち特に PDS 遺伝子、Cx26 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子 1555 変異の3つの遺伝子は頻度が多く重要であり、臨床面へ応用するためにこの3つの遺伝子に関し以下のように特に重点的に研究を実施した。

##### PDS 遺伝子：

前年度までの研究により Pendred 症候群の原因遺伝子(PDS)が同時に「前庭水管拡大を伴った非症候性難聴」の原因でもあることが明らかとなった (Usami et al.,1999)。

「前庭水管拡大を伴った非症候性難聴」症

例は甲状腺腫を伴った Pendred 症候群とは臨床的に異なっていることより、同一の遺伝子 (PDS) が表現型の異なる2つの疾患の原因遺伝子である可能性が示唆された。平成11年度頻度調査を行ったところ Pendred 症候群の 89 %にまた「前庭水管拡大を伴った難聴」症例の 58 %に PDS 遺伝子の変異が同定された。これらの症例について遺伝子型／表現型（臨床型）の検討を行い Pendred 症候群と比較したが遺伝子変異部位と臨床型との直接的な相関は認められず他の因子（遺伝的／環境的）の関与が考えられた。

##### Cx26 遺伝子：

前年度までの研究により難聴との関連で世界的に注目を集めている Cx26 遺伝子の変異が日本人の難聴にも深く関与していることが明らかとなった (Abe et al.,2000)。興味あることに日本人では欧米人に多い 35delG と呼ばれる変異は見出されず、かわりに 235delC と呼ばれる変異が最も頻度が多いことが明らかになった (Abe et al.,2000)。本研究により日本人の難聴者の遺伝子解析にもとづくデータベースの重要性が明らかになった。我々の検討では常染色体劣性遺伝形式をとる難聴家系(孤発例を含む)のうち約 1 / 3 に Cx26 遺伝子変異が見出された。従って先天性難聴児を診察する際にまず最初に念頭に置かなければならない遺伝子の一つであると思われる。海外ではすでにこの Cx26 遺伝子スクリーニングを開始している施設もあり、今後先天性難聴児におけるスクリーニングとして注目されると思われる。この遺伝子変異を持つ難聴児の聴力像にはバリエーションがあることが報告されているが、一般的には中等度から高度難聴が多い。我々は今後の臨床面への応用を考え DNA マイクロアレイを用いた Cx26 遺伝子変異スクリーニング法を完成させた。

ミトコンドリア遺伝子 1555 変異：

前年度までの研究により ミトコンドリア遺伝子の変異 (1555A → G 点変異) が高頻度に見出されたが、この変異があるとアミノ配糖体抗生物質により容易に難聴を来たすことが知られている。しかし症例を詳細に検討したところ中にはアミノ配糖体投与歴が無く、いわゆる特発性難聴の形で難聴を来たした症例もあり、種々の外因により難聴が引き起こされる可能性があることが明かになった (Usami et al.,1997,1998)。すなわちこの遺伝子変異が内耳の易受傷性と関連している可能性が示唆された。またこの遺伝子変異の検出頻度はアミノ配糖体による難聴患者に限るとさらに高くなり私どもの症例で検討した結果、アミノ配糖体による難聴者の約 1 / 3 に変異が検出され、日本人の難聴患者の主要な原因の一つであることが明らかとなった。したがって対象の患者を絞り込めばかなりの頻度でこの変異が見い出される可能性が高いと思われる。本研究ではこの変異の検出に関して新しいマススクリーニング法を開発するとともに、この変異を持つ患者に対してはアミノ配糖体抗生物質に注意するよう「薬物カード」を渡し予防、啓蒙に努めた (Usami et al.,1999)。

#### E. 結論

今回の研究で難聴の原因遺伝子の変異が数多く発見されたことにより、難聴患者を診察する際には遺伝子が関与している可能性があることを常に念頭に入れる必要があると思われた。難聴の遺伝子解析によって得られたこれらの新事実は従来の疾患概念を変えてしまうばかりでなく、病態の解明につながっていくものと思われ、将来的に難聴の診断法、治療法、予防に大きく寄与するものと思われた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese.

Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ.

J Med Genet 2000;37:41-3.

(2) Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients.

Usami S, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, Ishii M, Iwasaki S, Hoshino T, Ito J, Doi K, Kubo T, Nakagawa T, Komiyama S, Tono T, Komune S.

J Med Genet 2000;37:38-40.

(3) Sensorineural hearing loss associated with the mitochondrial mutations.

Usami S, Abe S, Akita J, Shinkawa H, Kimberling WJ.

In Genetics in Otorhinolaryngology Adv Otorhinolaryngol, Vol. 56 (eds. Kitamura K & Steel KP) 221-9 (Karger, Basel, 2000).

(4) Genomic Structure and Identification of Novel Mutations in Usherin, the Gene Responsible for Usher Syndrome Type IIa.

Weston MD, Eudy JD, Fujita S, Yao S, Usami S, Cremers C, Greenburg J, Ramesar R, Martini A, Moller C, Smith RJ, Sumegi J, Kimberling WJ.

Am J Hum Genet 2000;66:1199-210.

(5) 遺伝性難聴

宇佐美真一

日本医師会雑誌；2000；123（6）；773-778

(6) 結核治療と耳鼻咽喉科—聴覚・平衡機能障害を中心に—

宇佐美真一、佐藤圭司

耳鼻咽喉科・頭頸部外科；2000；72（3）；  
189-193

(7) 幼小児感音難聴の原因－特に遺伝子異常－

宇佐美真一

JOHNS；2000；16（2）；199-204

(8) 遺伝子異常と難聴（SM 難聴，前庭水管  
拡大症）

宇佐美真一

「新 図説耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座  
第一巻 内耳」；P78-81；2000；メジカル  
ビュー社

(9) Sensorineural hearing loss caused by the  
A1555G mutation in the mitochondrial DNA.  
Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kimberling WJ.

In Molecular medicine: novel findings of  
gene diagnosis, regulation of gene expression,  
and gene therapy (eds. Hashimoto I & et al.)  
(Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1999).

(10) Human connexin 30 (GJB6), a candidate  
gene for nonsyndromic hearing loss: molecular  
cloning, tissue-specific expression, and  
assignment to chromosome 13q12.

Kelley PM, Abe S, Askew JW, Smith SD,  
Usami S, Kimberling WJ.  
Genomics 1999;62:172-6.

(11) EYA1 nonsense mutation in a Japanese  
branchio-oto-renal syndrome family.

Usami S, Abe S, Shinkawa H, Deffenbacher  
K, Kumar S, Kimberling WJ.  
J Hum Genet 1999;44:261-5.

(12) Rapid mass screening method and  
counseling for the 1555A → G mitochondrial  
mutation.

Usami S, Abe S, Shinkawa H, Inoue Y,  
Yamaguchi T.

J Hum Genet 1999;44:304-7.

(13) 先天性難聴

宇佐美真一

生体の科学；1999；50（5）；391-392

(14) 難聴の遺伝子解析-update-

宇佐美真一

耳鼻咽喉科・頭頸部外科；1999；71（6）；  
327-338

(15) 難聴と遺伝子変異

宇佐美真一

「内耳研究 最近の進歩」；1999；P21-26；  
金原出版

2. 学会発表

2000,2,5-6 厚生省特定疾患聴覚・平衡機  
能系疾患調査研究班 前庭機能異常・急性  
高度難聴平成11年度合同総会（東京）  
難聴患者における遺伝子変異のスクリーニ  
ング

宇佐美真一、塚本耕二、甲田英子、木村至  
信、高橋健太郎、浅村賢二、阿部聡子、秋  
田二郎、南場淳司、新川秀一、

1999,9,9-11 日本耳科学会総会（東京）  
難聴患者におけるコネキシン（Cx）26 遺伝  
子変異の頻度とその臨床像

宇佐美真一

1999,7,9 公開シンポジウム 感覚器障害  
－視覚、聴覚研究の現状－（東京）  
難聴と遺伝子変異

宇佐美真一

1999,5,20-22 日本耳鼻咽喉科学会総会（仙  
台）

コネクシン (Cx)26 遺伝子変異による難聴  
宇佐美真一

1999,3,5-7 European Workshop on Genetics  
of Hearing Impairment (Bibione, Italy)

Non-syndromic hearing loss associated with  
enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS  
mutations

Shin-ichi Usami, Satoko Abe, Mike D.  
Weston, Hideichi Shinkawa, Guy Van Camp,  
William J. Kimberling

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし