

厚生省特定疾患

急性高度難聴調査研究班
平成12年度研究業績報告書

平成13年3月

分科会長 星野 知之

急性高度難聴調査研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
分 科 会 長	星 野 知 之	浜松医科大学耳鼻咽喉科	教 授
分 科 会 員	福 田 諭	北海道大学耳鼻咽喉科	助 教 授
	宇佐美 真 一	信州大学耳鼻咽喉科	教 授
	喜多村 健	東京医科歯科大学耳鼻咽喉科	教 授
	神 崎 仁	慶應大学耳鼻咽喉科	教 授
	中 島 務	名古屋大学耳鼻咽喉科	教 授
	東 野 哲 也	宮崎医科大学耳鼻咽喉科	助 教 授
	福 島 邦 博	岡山大学耳鼻咽喉科	助 手
	村 井 和 夫	岩手医科大学耳鼻咽喉科	教 授
	岡 本 牧 人	北里大学耳鼻咽喉科	教 授
	阪 上 雅 史	兵庫医科大学耳鼻咽喉科	教 授
	暁 清 文	愛媛大学耳鼻咽喉科	教 授
(事 務 局)	星 野 知 之	浜松医科大学耳鼻咽喉科 〒431-3192 静岡県浜松市半田山 1丁目20番1号 電話 (053) 435-2252 FAX (053) 435-2253	

目 次

I 総括研究報告	分科会長 星野 知之 (浜松医大)	1
II 分担研究報告		
1. コネキシン 26 遺伝子異常による難聴に対する人工内耳埋め込み術	福島 邦博 (岡山 大)	3
2. コネキシン 26 遺伝子(GJB2)異常の迅速診断法	福島 邦博 (岡山 大)	7
3. DFNA16 候補遺伝子としての SCN2A 及び SCN3A に関する検討	福島 邦博 (岡山 大)	11
4. 発達過程のマウス内耳における Dfna5 遺伝子発現の量的変化	福島 邦博 (岡山 大)	13
5. 難聴の原因遺伝子に関する研究	宇佐美真一 (信州 大)	15
6. EYA-1 遺伝子 mutation と Branchio-Oto syndrome についての検討	福田 諭 (北海道大)	17
7. 遺伝子診断のためのインフォームドコンセント —ミレニアムプロジェクト等の答申を受けて—	喜多村 健 (東京医科歯科大)	19
8. Zfc-02 の行動異常と難聴について	喜多村 健 (東京医科歯科大)	23
9. 内耳発育過程における水チャンネル —Aquaporin の発現と消退について—	喜多村 健 (東京医科歯科大)	25
10. 前庭水管拡大症患者の PDS 遺伝子型と表現型の関係	中島 務 (名古屋大)	27
11. シスプラチンの聴器毒性に対する抗酸化剤の効果	中島 務 (名古屋大)	29
12. 人工内耳手術時における蝸牛血流の測定	中島 務 (名古屋大)	33
13. 急性低音障害型感音難聴 —初回発作例の検討—	村井 和夫 (岩手医大)	37
14. 急性低音障害型感音難聴再発例の検討	岡本 牧人 (北里 大)	41
15. 聴力型の変化した低音障害型突発難聴	岡本 牧人 (北里 大)	43
16. 突発性難聴全国疫学調査における急性低音障害型感音難聴の臨床疫学的検討	中島 務 (名古屋大)	47
17. 急性低音障害型感音難聴の重症度分類の試み	神崎 仁 (慶應 大)	51
18. 当科における小児突発性難聴の検討	阪上 雅史 (兵庫医大)	53
19. 当科における聾・聾型突発性難聴の検討	阪上 雅史 (兵庫医大)	55
20. 突発性難聴における高気圧酸素療法について	岡本 牧人 (北里 大)	57
21. 突発性難聴に対する単剤療法の効果 —中間報告—	神崎 仁 (慶應 大)	61

22. マウス内耳におけるアドレノメデュリンの発現	東野 哲也 (宮崎医大) ……	63
23. マウス蝸牛における Basigin の発現	東野 哲也 (宮崎医大) ……	65
24. カイニン酸局所投与による一過性聴力障害ラットモデル	東野 哲也 (宮崎医大) ……	67
25. 蝸牛内有毛細胞感覚毛と蓋膜との接着状態の検討	福田 諭 (北海道大) ……	69
26. 急性音響外傷における内耳組織転写因子活性の変化 (第二報)	神崎 仁 (慶應大) ……	73
27. グルタミン酸トランスポーター(GLAST)欠損マウスにおける音響障害	暁 清文 (愛媛大) ……	77
28. 低体温による虚血性内耳傷害の保護効果	暁 清文 (愛媛大) ……	79
29. Ws/Ws rat の血管条の発達における変化 (透過型、走査型電顕による観察)	星野 知之 (浜松医大) ……	83
30. 蝸牛限局性障害 多発性障害の検討	星野 知之 (浜松医大) ……	85
Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表	……………	87

I 總括研究報告

総括研究報告

分科会長 星野知之
(浜松医科大学耳鼻咽喉科)

A. 研究目的

急性に高度難聴をきたす原因不明の疾患、とくに突発性難聴、特発性両側性感音難聴について、その疫学、発症機構、原因、診断、治療について研究を行なう。得られた結果は一般に公表する。今年度は特に(A)前年度に作成した診断基準案にそって低音障害型感音難聴症例の調査(B)突発性難聴の単剤治験の取りまとめ(C)原因不明の感音難聴者の遺伝子異常検索(D)感音難聴の発症機構の解明の4つを大きな目標とした。

B. 研究方法

(A)低音障害型感音難聴の調査:班員の2名が中心となって平成12年度に作成した診断基準案に合致する症例を班員の施設であつめ調査票を集計、この疾患の臨床病態像を確立し基準案、調査票が妥当なものであるかどうかを検討(B)突発性難聴の単剤治験:発症後数日以内の20歳以上の成人、発症より14日以内、未治療例600例を対象とし、封筒法で6種の薬剤を班員及び旧班員に割り振りその効果を検討した。(C)感音難聴の遺伝子異常の検索:3名の班員の施設で遺伝子解析が可能であり、班員ならびにすでに趣旨を連絡済みの国内の主な病院から難聴家系の者の血液を採取してそこに送り、解析を行なう。(D)感音難聴発症機構の解明:動物のモデルを利用し突発性難聴の原因と目される蝸牛の血行障害、各種障害と活性酸素、グルタミン酸の変動、蝸牛内電位の変化などを検討する。突発性難聴例からのウイルスの検出をすすめるほか、ムンプス難聴の発現について検討を続ける。

C. 研究結果

低音障害型感音難聴の診断基準が平成11年度の総会で決定した。この案に合致する症例を班員の所属する施設において調査票に記入、平成12年度の1年間集め、11月まで199例を検討した。単剤治験については、検討の遅れている施設の分担分を他施設に再配分し検討をすすめているが、脱落例があつたりして、まだ最終の結果の集計にまでは至っていない。452例が集計されたが、今期中に結論をだすべく作業を急いでいる。遺伝子異常と難聴の関連については研究は確実にすすんでいる。非症候群性の難聴でもっとも多い異常はコネキシン26の異常で、一塩基欠失および一塩基置換を迅速かつ簡便に検出する方法の開発が進められた。この異常の人工内耳の効果は良いことが判明した。DFNA16の候補遺伝子の解析、EYA遺伝子、PDS遺伝子の異常例が調べられ、また遺伝子診断のためのインフォームドコンセントの改定案が作られた。発達途上の内耳の各種遺伝子の発現も検討された。難聴発症機構の解明は種々の面での検討が行われた。突発性難聴の原因として重要と考えられる蝸牛血行障害については、スナネズミの椎骨動脈閉塞による一過性虚血のさいの機能と形態の変化、低体温による障害の保護効果、また光増感反応によるモルモットの側壁限局障害の複数障害の効果が検討された。両者ともグルタミン酸の興奮毒性や活性酸素種で変化がおこると考えられるが、さらに検討をすすめれば難聴発現機構に新たな知見を加えるものと期待される。ウイルス感染については予防接種の任意化の影響がムンプス難聴発症頻度については引き続き監視している。

D. 考察

突発性難聴については永年の研究にかかわらず、その原因が突き止められていない。2つの有力な説は内耳循環障害とウイルス感染があげられる。内耳循環障害については限局障害、虚血の実験をとおして、難聴発症への関与がかなり明らかになってきた。低音域のみが障害される感音難聴が近年注目され、突発性難聴との関係、鑑別などが問題になっている。症例の検討から、再発するもの、聴力が変化する例など非典型例の存在が

明瞭となり、診断基準作成の良い資料が得られつつある。特発性両側性感音難聴の原因として、遺伝子変異のある率が高いことが明らかになりつつあるが、本年の検討でもコネキシン 26、ミトコンドリア遺伝子の変異、EYA その他の遺伝子異常がかなりの頻度で見つかっており、特発性両側性難聴との関連もさらに明らかになりつつある。

E. 結 論

循環障害については蝸牛に作成した限局障害で見られる蝸牛内電位の変化から臨床病態に近いモデルが作られた。今年度はさらに椎骨動脈の一過性の虚血が検討され、蝸牛全体の短時間の虚血では内耳はどんな変化をきたすかが解明されはじめた。循環障害にはその広がりや違い、さまざまな程度があると考えられるので、病態解明に一步近づくといえる。低音域障害感音難聴については昨年度に作成した診断基準案にそって、班員内での症例調査をおこなった。遺伝子変異の検討はどの領域でも驚く程の進歩があるが、当研究班でも確実な成果が上がりつつある。感音難聴を高率にきたすコネキシン 26 異常を迅速に見いだす方法の開発も行われた。

II 分担研究報告

コネキシン 26 遺伝子異常による難聴に対する 人工内耳埋め込み術

分担研究者 福 島 邦 博 (岡山大学医学部耳鼻咽喉科)

共同研究者 西 崎 和 則・菅 田 研 一
益 田 明 美・笠 井 紀 夫
長 安 吏 江 (岡山大学医学部耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

言語習得期前難聴児に対して人工内耳埋め込み術を行った例について、レトロスペクティブにコネキシン 26 遺伝子異常の検索を行い、7 例中 3 例に同遺伝子の変異を認めた。コネキシン 26 遺伝子異常群では、非コネキシン 26 遺伝子異常群に比べて、より優れた術後の言語発達が認められた。コネキシン 26 遺伝子異常群では、より優れた認知機能を有している症例が多く、コネキシン 26 遺伝子異常の検索が非症候群性難聴の診断に有用で、従って人工内耳の術前言語機能評価に有用であると考えられた。

【研究目的】

最近の人工内耳埋め込み術の手術適応の拡大により、最近急速に言語習得期前難聴に対する手術例数が増加してきた。成人でも人工内耳埋め込み術後の言語機能には大きなばらつきがあることが知られているが¹⁾、ことに言語習得期前難聴例の場合には言語発達自体を人工内耳による音声刺激に頼らなければならないため、より大きな個人差があることが経験されている²⁻⁶⁾。この場合、一般的には、低年齢で手術を行うほど術後の言語機能の発達が期待できるが⁵⁾、その一方で低年齢では術後成績を予測することは困難である。従って、他覚的な検査法を用いて人工内耳術後の音声言語機能を推測することができれば、この方法は人工内耳の術後機能予測のためには有用であることが推定される。

一方で近年の分子生物学的な研究の進展は、難聴を遺伝子によって診断・分類することの可能性を示し始めている。今回我々は、言語習得期前難聴の中でも最も頻度の高い原因⁷⁾の一つであるコネキシン 26 遺伝子異常を検索し、その人工内耳術後の成績について検討したので報告する。

【研究方法】

1. 対象

1995 年から 1998 年までに人工内耳埋め込み術を行い、その後の研究に対して協力が得られた 7 例について今回の検討を行った。人工内耳埋め込み術時の年齢は、2 才 11 ヶ月から 6 才 1 ヶ月までであった。

2. 遺伝子解析

書面によるインフォームドコンセントの上で、患者の末梢血ないしは頬部粘膜から DNA を抽出した。GJB2 のエクソン 2 全域を含む 772bp の領域を PCR 反応で増幅し⁸⁾、この PCR 産物を applied biosystems 社製自動シーケンス機 (ABI310) により直接塩基配列決定を行った。

3. 聴覚医学・発達心理学的な検査

それぞれの児は、57 式語表による語音聴力検査、WPPSI による発達検査を行った。さらに家族によるチェックを元に語彙数の検査を行った。これらの評価は、発達によるばらつきをさけるために、人工内耳埋め込み術が終わって 1 年以上経過した時点で、4 才から 6 才までの間に行われた。6 才 1 ヶ月で人工内耳埋め込み術が行われた一例に関しては、リハビリ後 1 年目の 7 才の時点でを行った。

【倫理面への配慮】

本研究への参加は書面によるインフォームドコンセントの上で行われた。

【研究結果】

7 例中 3 例にコネキシン 26 の遺伝子異常が同定された。2 例は 235delC のホモ接合体であり、1 例は 235delC と R143W のコンパウンドヘテロ接合体であった。残りの 4 例からはコネキシン 26 の異常は検出されなかったが、このうち 2 例は超低出生体重児であり、周産期に難聴発生のリスクを有していた。

残りの2例は、今回検討した範囲内では難聴原因は明らかではなかった。

音声による母音認知は、低出生体重の2例を除いて、全例で100%であり、有効な語音弁別能を有していた。子音の認知もこれらの症例では60%を越えていた。

その一方で、WPPSIテストでは、コネクシン関連難聴群では40から77の比較的優れたVIQを示すことに対して、非コネクシン関連難聴群では停止項目による終了のためほとんどVIQ測定不能であった。一方でPIQはコネクシン関連難聴群では100を超えていたことに対し、非コネクシン関連難聴群では、言語性の発達と関係ないはずのこの分野でも100以下を示していた。コネクシン関連難聴群では全例で400語を超える語彙があり、一部の例ではすでに2500語以上の語彙が認められたが、非コネクシン関連難聴群では、術後3年が経過しても乏しい語彙数にとどまる症例も少なくなかった。

[考 察]

Junら⁹⁾は、コネクシン26関連難聴の側頭骨病理を検討し、神経節細胞が乏しい変性のみで高度に保たれていることを報告し、人工内耳埋め込み術による良好な言語成績につながることを予言していた。今回の我々の検討においてもこの予言に矛盾することなく、コネクシン関連難聴において優れた言語成績が得られていた。しかし、今回検討した群では、もう一つの因子としてより優れた全体発達の傾向が認められた。すなわち、難聴児には時に付随する様々な重複障害が認められるが、コネクシン26関連難聴群ではこうした重複障害が認めらず、より優れた認知能力が、よりよい言語機能に結びついていることが推測された。今後コネクシン26だけでなく、様々な難聴遺伝子が同定され、それらの臨床的特徴が明らかにされていく過程で、真の意味での「非症候群性」難聴が診断可能になれば、こうした技術による臨床的な術後言語機能予測が可能になるかもしれない。

一方で、今一度強調しておく必要があるのは、本報告の目的は、コネクシン関連難聴群での良好な言語機能を示すことであり、これは発達や認知機能に遅れのある難聴児に対する人工内耳の適応を否定するものではない。様々な全体発達の遅れの伴う症例に対して人工内耳埋め込み術を行う場合、その児なりの進歩やメリットが実感できることが少なくない。このように手術適応自体はその児あるいはその家族

のニーズに基づいて決定されるべきであり、術後言語機能だけがそのニーズの対象とされるところのものではないことを認識する必要がある。

[結 論]

コネクシン関連難聴群では人工内耳埋め込み術後により高い言語機能の獲得が可能であった。

[参考文献]

- 1) Blamey P, Arndt P, Bergeron F: Factors affecting auditory performance of postlingually deaf adults using cochlear implants. *Audiol Neurootol* 1: 293-306, 1996
- 2) Miyamoto RT, Osberger MJ, Todd SL.: Variables affecting implant performance in children. *Laryngoscope* 104: 1120-1124, 1994
- 3) van Dijk JE, van Olphen AF, Langereis MC, Mens LH, Brokx JP, Smoorenburg GF: Predictors of cochlear implant performance. *Audiology* 38: 109-116, 1999
- 4) Gordon KA, Daya H, Harrison RV, Papsin BC: Factors contributing to limited open-set speech perception in children who use a cochlear implant. *Int J ped Otorhinolaryngol* 56: 101-111, 2000.
- 5) Tyler RS, Fryauf-Bertschy H, Kelsay DMR, Gantz BJ, Woodworth GP, Parkinson A: Speech perception by prelingually deaf children using cochlear implants. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 180-187, 1997
- 6) Fryauf-Bertschy H, Tyler RS, Kekesay DMR, Gantz BJ, Woodworth GG: Cochlear implant used by prelingually deafened children: the influence of age at implantat and length of device use. *J Speech Lang Hear Res* 40: 183-199, 1997
- 7) Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Scheffield VC, Smith RJH: Carrier rates in the Midwestern United States for GJB2 mutation causing inherited deafness. *JAMA* 281: 2211-2216, 1999
- 8) Fukushima K, Kasai N, Ueki Y, Nishizaki K, Sugata K, Hirakawa S, Masuda A, Gunduz M, Ninomiya Y, Masuda Y, Sato M, McGuirt WT, Coucke P, Van Camp G, Smith RJH: A Gene for Fluctuating, Progressive Autosomal Dominant Non-Syndromic Hearing Loss, DFNA16, Maps to Chromosome 2q23-24.3. *Am J Hum Genet* 65: 141-150, 1999
- 9) Jun AI, McGuirt WT, Hinojosa R, Green GE, Fischel-Ghodsian N, Smith RJH: Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope* 110: 269-275, 2000

[研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

なし

[知的所有権の取得状況]

なし

コネキシン 26 遺伝子(GJB2)異常の迅速診断法

分担研究者 福島 邦博 (岡山大学医学部耳鼻咽喉科)

共同研究者 菅田 研一・益田 明美
笠井 紀夫・Mehmet Gunduz
西崎 和則 (岡山大学医学部耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

コネキシン 26 (gap junction $\beta 2$: *GJB2*) の遺伝子異常の一塩基欠失および一塩基置換について、多検体を同時に短時間で検出するシステムを開発し、その有用性について検討した。

【研究目的】

コネキシン 26 遺伝子異常は言語習得期前難聴の最も頻度の高い原因と考えられており、一般人口中における頻度は約 2%、先天性高度難聴の約 30% をしめると考えられている¹⁾。特に、この遺伝子変異にはすでに特定の変化が多数確認されることが報告されている。例えば地中海を中心とした欧米では 35delG が広く報告されていることに対して^{2,6)}、ユダヤ系の家系では 167delT^{7,9)} が、また日本の難聴者を対象に行った報告では、235delC(10, 11) の頻度が高いことが報告されている。こうした頻度の高い一塩基欠失の報告がある一方で非常に多種類の一塩基置換の報告も知られている。この中で比較的頻度の高い報告は 136 番目のチロシンがストップコドンに変わる、Y136X や、143 番目のアルギニンがトリプトファンに変わる、R143W である^{10,11)}。コネキシン 26 異常は、先天性原因不明高度難聴の中での出現頻度が高いこと、さらにその遺伝的因子が一つのものでかなりの割合を占めているため、診断が比較的容易であることから、その臨床的意義と需要が高まることが予想される。これまで *GJB2* 異常を調べる方法としては直接塩基配列決定法がゴールドスタンダードとして行われてきたが、今回我々は直接塩基配列決定法と同等の精度と感度を持ちながら、より迅速、簡易、経済的な遺伝子診断法についての研究を行ったので報告する。

【研究方法】

1. 対象
遺伝子解析についてのインフォームドコンセントの

得られた、先天性高度難聴患者 52 人を対象にした。迅速診断の対象としたのは、235delC、30delG、Y136X、R143W、G45E の 5 個所の *GJB2* 遺伝子異常だった。

2. DNA の抽出

患者の頬部粘膜からの検体の採取し、その洗浄液から DNA を抽出した。この抽出に要する時間は一サンプルあたり 10 分程度で極めて容易に抽出作業が行い得た。

3. PCR

GJB2 のエクソン 2 領域を含む 772bp の領域を PCR 反応で増幅し、さらにその PCR 産物のうち 35delG と 235delC の領域を含む 241bp の領域を増幅するために、蛍光標識したプライマーを用いて PCR 反応を行った。PCR 反応には基本的には既報にあるものと同じ条件¹²⁾ を用い、ピークの検出は applied biosystemns 社製自動シーケンス機 (ABI310) による自動検出を行った。

4. 一塩基プライマー伸長反応

GJB2 遺伝子異常のうち、一塩基置換である、Y136X、R143W、G45E を検出するために、一塩基プライマー伸長反応を行った。¹⁸⁾ それぞれの一塩基置換の起こる場所の一塩基前までのプライマーを設計し、蛍光ラベルされた ddNTP を用いた PCR 反応を行うと、変異ポイントに一塩基を付加したところで伸長が終了する。その反応物を applied biosystemns 社製自動シーケンス機 (ABI310) で検出を行うと、変異ポイントで付加した塩基の種類を知ることができ、一塩基置換の存在の有無を判定できる。

5. 直接塩基配列決定法

遺伝子迅速診断の結果を直接塩基配列決定法を用いて確認した。

【倫理面への配慮】

研究用のサンプルは難聴遺伝子診断についてのインフォームドコンセントの結果として得られた。

【研究結果】

235delC の homozygote 4 症例、heterozygote 10 症例が検出され、heterozygote の内、2 症例では R143W、1 症例では Y136X、1 症例では Y136X + G45E と、片方のアレルに頻度の高い一塩基置換を持つことが検出された。以上の結果は直接塩基配列決定にても正しいことが確認された。今回の迅速診断に要した時間と費用は直接塩基配列決定の約 3 分の 1 であった。

今回の遺伝子診断の結果と各症例の臨床データを併せて検討してみると、周産期異常や奇形など、難聴をきたす原因が疑われた症例からは、口蓋裂を持つ 1 症例を除き、*GJB2* の異常はみつからなかった。一方、明らかな難聴原因がない 27 症例のうち、約 48% にあたる 13 症例から *GJB2* の異常がみつかった。また、*GJB2* の異常を heterozygote で持ち、さらに均衡型染色体転座を持つ症例が見つかった。

【考 察】

本診断法によって、現在報告されている全ての *GJB2* の異常が検出可能であり、従来ゴールドスタンダードとして行われてきた直接塩基配列決定法に比べてより迅速、簡易、経済的遺伝子診断法であり、かつ原理的には直接塩基配列決定法と同様であるため、ほぼ同等の感度と特異度を有しているものと考えられた。

本方法を用いれば、検出自体の検討時間は数時間で終了するため、倫理的問題さえクリアできれば、*GJB2* 異常の大規模スクリーニングも理論的には可能であると考えられた。また、今回は特に頻度の高い遺伝子異常に対するプローブのみを準備したが、理論的には全ての変位部位に対して任意にプローブを設定することが可能で、現在 50 種類を超えと言われる *GJB2* 遺伝子異常の様々なタイプに対して対応することも可能である。

従来からしばしば指摘されていることだが、難聴人口を検討した場合にしばしば *GJB2* 異常の heterozygote が検出される。^{10,11)} 今回の検討でも 6 症例がみつかったが、このうちの 1 症例には第 7 番染色体と第 11 番染色体の間で均衡型転座がみつかった。この均衡型転座は難聴のない母親にも存在していることから、この染色体転座が単独で難聴の直接の原因になっているとは考えられない。一つの可能性として、break point に存在することによって、破壊される遺伝子が *GJB2* の heterozygote での難聴発症に何らかの関わりを持っていることが考えられる。

もし、これらの染色体領域に *GJB2* 異常関連遺伝子が存在していれば、*GJB2* 関連難聴の modifier gene¹³⁾ をみつけることができるかもしれない。今後この症例についてはさらに詳細な遺伝子解析を行っていく予定である。

【結 論】

GJB2 異常の迅速診断技術を確立し、実際に先天性高度難聴患者を対象にした調査を施行した。本法を用いることによって、現在の検査法と比較して迅速かつ経済的に検査を行うことができ、コネキシン 26 関連難聴の遺伝子診断を臨床応用することも可能であると考えられた。

【参考文献】

- 1) Green GE, Scott DA, McDonald JM, Woodworth GG, Scheffield VC, Smith RJH: Carrier rates in the Midwestern United States for *GJB2* mutation causing inherited deafness. JAMA 281: 2211-2216, 1999
- 2) Denoyelle F, Weil D, Maw MA, Wilcox SA, Lench NJ, Allen-Powell DR, Osborn AH, Dahl HH, Middleton A, Houseman MJ, Dode C, Marlin S, Boulila-ElGaed A, Grati M, Ayadi H, BenArab S, Bitoun P, Lina-Granade G, Godet J, Mustapha M, Loiselet J, El-Zir E, Audois A, Joannard A, Petit C, et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the connexin 26 gene. Human Molecular Genetics. 6: 2173-2177, 1997
- 3) Estivill X, Fortina P, Surrey S, Rabionet R, Melchionda S, D'Agruma L, Mansfield E, Rappaport E, Govea N, Mila M, Zelante L, Gasparini P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness [see comments]. Lancet. 351: 394-398, 1998
- 4) Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ, Sheffield VC: Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. Hum Mutat; 11: 387-394, 1998
- 5) Storm K, Wilcox S, Flothmann K, Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common *GJB2* (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. Human Mutation. 14: 263-266, 1999.
- 6) Antoniadis T, Rabionet R, Kroupis C, Aperis GA, Economides J, Petmezakis J, Economou-Petersen E.

- Estivill X, Petersen MB. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin 26 gene causing prelingual deafness [letter]. *Clinical Genetics*. 55 :381-382, 1999.
- 7) Morell RJ, Kim HJ, Hood LJ, Goforth L, Friderici K, Fisher R, Van Camp G, Berlin CI, Oddoux C, Ostrer H, Keats B, Friedman TB. Mutations in the connexin 26 gene (*GJB2*) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *New England Journal of Medicine*. 339 :1500-1505, 1998
- 8) Lench N, Houseman M, Newton V, Van Camp G, Mueller R. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness [letter] [see comments]. *Lancet*. 351: 415, 1998
- 9) Sobe T, Erlich P, Berry A, Korostichevsky M, Vreugde S, Avraham KB, Bonne-Tamir B, Shohat M. High frequency of the deafness-associated 167delT mutation in the connexin 26 (*GJB2*) gene in Israeli Ashkenazim [letter]. *American Journal of Medical Genetics*. 86:499-500, 1999
- 10) Abe S, Usami Si, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ: Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J Med Genet*; 37: 41-43 2000
- 11) Fuse Y, Doi K, Hasegawa T, Sugii A, Hibino H, Kubo T. Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport*. 10: 1853-1857, 1999
- 12) Fukushima K, Kasai N, Ueki Y, Nishizaki K, Sugata K, Hirakawa S, Masuda A, Gunduz M, Ninomiya Y, Masuda Y, Sato M, McGuirt WT, Coucke P, Van Camp G, Smith RJH: A Gene for Fluctuating, Progressive Autosomal Dominant Non-Syndromic Hearing Loss, DFNA16, Maps to Chromosome 2q23-24.3. *Am J Hum Genet* 65: 141-150, 1999
- 13) Friedman T, Battey J, Kachar B, Riazuddin S, Noben-Trauth K, Griffith A, Wilcox E: Modifier genes of hereditary hearing loss. *Curr Opin Neurobiol*. 10: 487-93, 2000

[研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

なし

[知的所有権の取得状況]

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

DFNA16 候補遺伝子としての SCN2A 及び SCN3A に関する検討

分担研究員 福島 邦博 (岡山大学医学部耳鼻咽喉科)

共同研究者 笠井 紀夫・菅田 研一

菅田 明美・Mehmet Gunduz

西崎 和則 (岡山大学医学部耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

常染色体優性難聴 DFNA16 の遺伝子領域内に、2 つの候補遺伝子 SCN2A (膜電位依存性ナトリウムチャンネル・タイプII・ α サブユニット) および SCN3A (同タイプIII・ α サブユニット) が存在することを明らかにした。両者のゲノム構造を決定し、DFNA16 における変異の有無を検索した。

【研究目的】

DFNA16 は 10 歳代後半より感音性難聴を発症し、急性増悪を繰り返しつつ聴力低下を来とし、聾に至る遺伝性難聴である。この候補遺伝子として SCN2A 及び SCN3A の構造と発現を解析し疾患特異的な異常を同定する。

【研究方法】

DFNA16 遺伝子領域に YAC&PAC contig を構成し、候補遺伝子のスクリーニングとマッピングを行った。ゲノム DNA を用いた PCR 産物を直接シーケンス法で解析することにより各遺伝子のイントロン-エクソン構造を解明した。PCR-SSCP 及び直接シーケンス法によって異常の検出を試みた。

【倫理面への配慮】

患者サンプルは実験計画の患者への説明と同意に基づいて採取された。

【研究結果】

DFNA16 遺伝子領域 D2S354-D2S124 間に SCN2A 及び SCN3A が存在し (図 1)、そのゲノム構造を解明した (表 1)。また Alternative splicing を認めた (図 2)。

両遺伝子は 5'側を向き合い約 40kb 離れて位置すると推定された。蝸牛では SCN2A の発現を認めたが、SCN3A は確認できなかった。両遺伝子の転写領域には DFNA16 特異的異常は認められなかった。

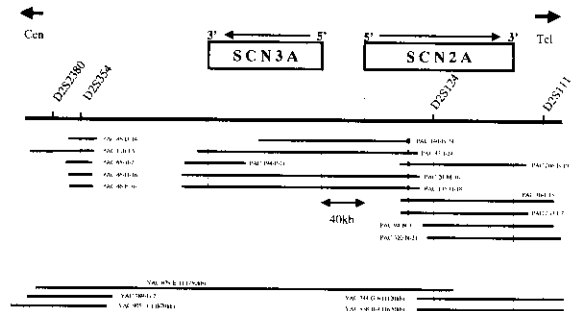


図 1 DFNA16 遺伝子領域のマップとコンティグ。D2S354 と D2S124 間に SCN2A と SCN3A が存在する。

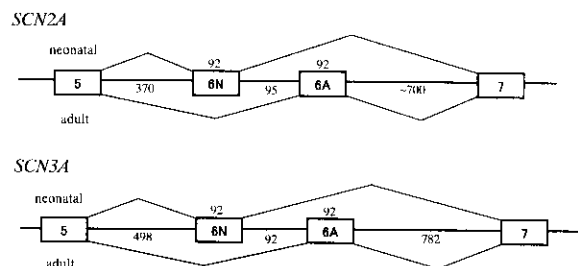


図 2 SCN2A・SCN3A alternative splicing とその構造の比較。ともに胎児と成人で転写が異なる。各部のサイズを数字で示す。

【考 察】

膜電位依存性ナトリウムチャンネル遺伝子の塩基配列及び構造は遺伝子ファミリー内で高く保存されている²⁾。SCN2A、SCN3A とともに類似した配列・構造を示した。このファミリー内では alternative splicing を持つものが報告されており^{3), 4)}、SCN2A/SCN3A におけるエクソン 6N と 6A は、発達段階での転写調節が示唆された。

SCN2A は機能と発現の点から依然 DFNA16 の候補遺伝子であり、その転写調節領域の解析が望まれる。

表1 SCN2A・SCN3Aのイントロン-エクソン領域の塩基配列。イントロン3、24切断部位ではコンセンサスと異なる塩基配列を持つ。

Acceptor site	Exon (bp)	Donor site
SCN2A		
TAAGCCAAAG...	1a (184)	...TTTATTTCAG gtaagccagc
GGGCGCTT...	1 (305)	...TTCTACAGGG gtaegttttl
gtttctgtg CACTTCTTA...	2 (318)	...CAATAAGAAA gtaegtcttt
tctttttcag ACGTTTATAG...	3 (1119)	...TGGTACATTC gtaecctttt
gatattctag TTTATTCAAT...	4 (90)	...AGAATGTGCA gtaegtataa
ttctctccag GTATACCTT...	5 (129)	...TTACTTTTGC gtaegtatet
aattctaacg GTATGTACA...	6N (92)	...GTAATTCAG gtaagaaaca
ccatttaacg ATATGTACA...	6A (92)	...GTACTTCCAG gtaagaaaca
ttgttttag GCCYGAAGC...	7 (273)	...GAGATAAAA gtaagtata
ctttaactag GTCACTTTTA...	8 (164)	...CAGATGCAGG gtaagtatg
ctaatttag CCAGTTCCTT...	9 (142)	...TTATCAACTG gtaagaaaca
oatttttag ACACTGACTG...	10 (207)	...AGAAGCTCAG gtaagtatg
goccttttag GGCGAGCTG...	11 (288)	...TCCACACCAG gtaaaatet
ttattctag TCCTTACTGA...	12 (343)	...CTTACTCAGG gtaagaaaca
ctacttttag GGCAGTCTTA...	13 (133)	...ACCATGTGAG gtaagtata
ttcttttag AACTGAAGA...	14 (239)	...TGGAACTCTG gtaagaaaca
tcttaactag GTCTTCAAG...	15 (174)	...ATTCGGCTG gtaaataac
ttatttttag CTCCGAGTTT...	16 (357)	...AAATCAAGT gtaagtatg
tgatttttag GTTCTGACTG...	17 (480)	...AAGCAAGAG gtaaaatet
tgatttttag AAGCTAAATG...	18 (121)	...TTTACAGAAG gtaagaaaca
caatttttag ACTGTGACTG...	19 (155)	...TGGGCTCTAG gtaagtatg
tgacttttag GCCTGTGAG...	20 (174)	...GACTTCCAG gtaagtata
ttcttttag GTCTCACTG...	21 (123)	...AGCAATGAGG gtaagaaaca
oatgttag GTTCTGTA...	22 (282)	...ACTTCAAGT gtaagtatg
ttcttttag GCCAGTTTA...	23 (54)	...TTCCAGAAAT gtaagtatg
tatttttag GTAGAATTAG...	24 (138)	...GAAAAGAAG gtaagtata
atttttttag TTGGAGGTC...	25 (165)	...TCGACTGCT gtaagaaaca
ttgttttag AACAATTC...	26 (271)	...TCCATTGTAG gtaagaaaca
ttttcttag GATGTTCT...	27 (3439)	
SCN3A		
GGGAAAAGCT...	1 (140)	...AAATAAGAAG gtaaaagact
ttatttttag GTAATTCCTA...	2 (314)	...CAATAAGAAA gtaagtattg
tcttttttag ACTTTATAG...	3 (119)	...TGGTACATTC gtaecctttt
tataatttag TTTATTGAGC...	4 (90)	...AGAATGTAGA gtaagtataa
tttttttag GTACACATTC...	5 (129)	...TTTGTATGCC gtaagtatg
aatttttag GTATGTACA...	6N (92)	...GTAATTCAG gtaagaaaca
ccatttttag ATATGTACA...	6A (92)	...GTACTTCCAG gtaagaaaca
ctcttttag GCTTAAAGAG...	7 (273)	...GAGATAAAA gtaagtata
gttttaacg GTCACTTTTA...	8 (164)	...CAGATGCAGG gtaagtatg
tctcttttag CCAGTTCCTT...	9 (142)	...TTATCAACTG gtaagaaaca
ttctcttag ACACTGACTG...	10 (207)	...AGAAGCTCAG gtaagtatg
ttatttttag GCAGTTGCGG...	11 (291)	...CCTCATCAG gtaagtattt
ttcttttag TCCTCTTGA...	12 (201)	...CAGAGTAAAG gtaagtata
ttcttttag TCCTCTTGA...	12+2b (297)	...GCTTCTCTG gtaagtata
tgatttttag GGCAGCAGG...	13 (133)	...ACCAATGAGG gtaagaaaca
gtctcttag AACTGAGGA...	14 (239)	...AGCAATGAGG gtaagtata
tatttttag GTTCTGACTG...	15 (174)	...ATTCGACTG gtaagtattt
ttgttttag GTTAGAGTTT...	16 (357)	...AAACTTGTG gtaagtattt
ttcttttag GTTCTGAACC...	17 (471)	...AAGCAAGAG gtaagaaaca
ttgttttag AAATTAATG...	18 (121)	...TTTACTGAGG gtaagaaaca
tgatttttag GAGTATTA...	19 (155)	...TGGTCTCTG gtaagtata
tgatttttag GCCPTGAGG...	20 (174)	...GATCTTGTAT gtaagtattt
oatttttag GTTCTTGG...	21 (123)	...AGCAATGAGG gtaagaaaca
tctcttttag GTGCTTGTGA...	22 (273)	...GCTTCAAGT gtaagtatg
ttatttttag GCCAGTTTA...	23 (54)	...TTCCAGAAAT gtaagtata
tatttttag GTTAAACTTC...	24 (138)	...GAAAAGAAG gtaagtata
atgttttag TTGGAGGTC...	25 (165)	...TCGACTGAGC gtaagaaaca
oatttttag AACAATTC...	26 (271)	...TCCATTGTAG gtaagaaaca
ttttcttag GATGTTCT...	27 (>2700)	

かった。

[参考文献]

- 1) Fukushima K et al: A Gene for Fluctuating, Progressive Autosomal Dominant Non-Syndromic Hearing Loss, DFNA16, Maps to Chromosome 2q23-24.3. *Am J Hum Genet.* 65: 141-150, 1999
- 2) Plummer NW et al: Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57, 323-331, 1999
- 3) Sarao R et al: Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nuc. acids res.* 19: 5673-5679, 1991
- 4) Gustafson TA et al: Mutually exclusive exon splicing of type III brain sodium channel α subunit RNA generates developmentally regulated isoforms in rat brain. *J. Biol. Chem.* 268, 18648-18653, 1993.

[研究発表]

<論文発表>

Kasai N, Fukushima K et al: Genomic structures for SCN2A and SCN3A - Candidate genes for deafness at the DFNA16 locus. *Gene* 2001 (in printing)

<学会発表>

なし

[知的所有権の取得状況]

<特許取得>

塩基配列はNCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)において AF327224-AF327246 (SCN2A) 及び AF330116-AF330135 (SCN3A) に登録された。

[結論]

DFNA16の遺伝子領域内には2つの膜電位依存性ナトリウムチャンネル、SCN2AとSCN3Aが存在する。SCN2Aは蝸牛での発現が確認されたが、その転写領域内にはDFNA16の原因となる異常は発見できな

発達過程のマウス内耳における *Dfna5* 遺伝子発現の量的変化

分担研究員 福島 邦博 (岡山大学医学部耳鼻咽喉科)

共同研究者 前田 幸英・菅田 研一
笠井 紀夫・西崎 和則

【研究要旨】

DFNA5、*Tectorin α* は常染色体性優性遺伝をしめす難聴家系において責任遺伝子として同定されたものである。今回そのマウスホモログの発現量が発達過程の蝸牛でどの様に变化するかを検討した。

【研究目的】

ヒトにおいて *DFNA5* 遺伝子の異常は、生後 5 歳以降に発症し進行する高音障害型感音難聴を引き起こす。一方 *Tectorin α* の異常による感音難聴は先天性、非進行性である。これらにコードされる蛋白質は内耳において重要な生理機能を持つと考えられるが、その発現、機能ともに不明点が多い。今回我々は発達過程のマウス蝸牛において、これらの遺伝子ホモログの発現量の変化を検討した。

【研究方法】

胎生 15 日、生後 3 日、生後 15 日、生後約 50 日の BALB/c マウス (各 5 腹) をペントバルビタール腹腔内注射で麻酔し、蝸牛を摘出して摩砕した。カラムを用いて total RNA を抽出した後サンプルを DNaseI で処理し、吸光度から RNA 濃度を計算した。

PCR 1 反応あたり 50ng の RNA を鋳型として *Dfna 5* (199bp)、*Tectorin α* (231bp) をターゲットとした RT-PCR を行った。ハウスキーピング遺伝子 *Gapdh* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) の増幅 (346bp) も同様に行った。3% アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色したバンドの画像を CCD カメラで取り込み、シグナル強度を数値化した。*Dfna 5* および *Tectorin α* のデータを *Gapdh* の発現を内部標準として補正した後、各発達日数間で比較した。統計的有意差は分散分析と多重比較検定 (Bonferroni 法、 $p < 0.01$) で検定した。また、PCR ではシグナル強度が鋳型 RNA 量を反映する増幅サイクル数を各遺伝子毎に選択した。

【倫理面への配慮】

動物からの組織摘出は十分な麻酔下で行い、苦痛を与えずに行った。

【研究結果】

Gapdh 発現を表すシグナルの強度には各発達日数間で有意な差を認めなかった ($p < 0.01$)。 *Dfna 5* 遺伝子は胎生 15 日 (0.787 ± 0.295 ; mean \pm S.D. $n=5$)、生後 3 日 (0.880 ± 0.181)、生後 15 日 (1.174 ± 0.431)、生後約 50 日 (1.049 ± 0.256) でともに発現しており、各発達日数での発現量に有意差を認めなかった。

Tectorin α 遺伝子の発現は胎生 15 日 (1.018 ± 0.204) から生後 3 日 (1.661 ± 0.180) に最大となり、生後 15 日 (0.345 ± 0.071) と生後約 50 日 (0.195 ± 0.062) では生後 3 日より有意に低く、1/4 以下となっていた。

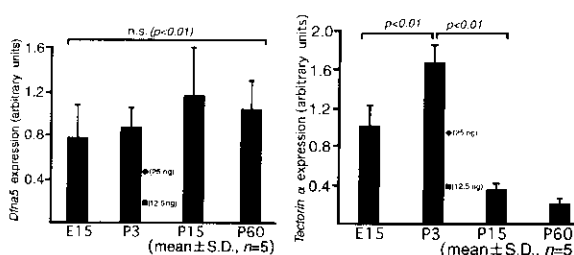


図 胎生 15 日 (E15)、生後 3 日 (P3)、15 日 (P15)、約 50 日 (P50) のマウス蝸牛における *Dfna5* (左) および *Tectorin α* (右) の発現レベル。
Dfna 5 発現量には E15 から P50 まで有意差を認めなかった。*Tectorin α* 発現量は E15 から P3 に増加して最大となり、P15 以降は P3 の 1/4 以下まで低下した。

◆: 生後 3 日の鋳型 RNA 量を 1/2 (25 ng) として RT-PCR を行った場合のシグナルレベル

■: 同様に 1/4 (12.5ng) とした場合

[考察]

以上の遺伝子発現パターンから、*Dfna 5*は胎生15日より生後約50日目を通じてマウス蝸牛でその生理機能を発揮すると推察された。以上の経時的变化は進行性難聴の責任遺伝子ホモログの発現パターンとして矛盾なかった。今後さらに *Dfna 5* の発現や機能につき検討すべきと考えられる。

一方 *Tectorin α* は蓋膜を構成する蛋白質をコードするため、生後3日頃形態学的に蓋膜が形成された後は遺伝子発現が大きく減少すると考えられた。ヒトでは胎生11-17週頃に蓋膜が形成されるので、先天性遺伝性難聴の発症時期とも矛盾はないと推察された。

[結論]

マウス蝸牛において *Dfna 5* の発現量は胎生15日より成体まで一定していた。一方 *Tectorin α* の発現量は蓋膜が構成される生後3日頃最大となり生後15日以降には有意に低下して、生後3日の1/4以下となっていた。

[参考文献]

- 1) Van Laer, L., Huizing, E.H., Verstreken, M., van Zuijlen, D. et al: Nonsyndromic hearing impairment is associated with a mutation in DFNA5. *Nat Genet.* 20:194-7,1998.
- 2) Verhoeven, K., Van Laer, L., Kirschhofer, K., Legan, P.K. et al: Mutations in the human alpha-tectorin gene cause autosomal dominant non-syndromic hearing impairment. *Nat. Genet.* 19:60-2,1998.
- 3) Legan, P.K., Rau, A., Keen, J.N., Richardson, G.P.: The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the

inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J. Biol. Chem.* 272; 8791-801, 1997.

- 4) Utsugisawa, K., Tohgi, H., Yoshimura, M., Nagane, Y. et al: Quantitation of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha 4 and beta 2 messenger RNA in postmortem human brain using a non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 4; 92-6, 1999.
- 5) Anniko, M.: Embryogenesis of the mammalian inner ear. III. Formation of the tectorial membrane of the CBA/CBA mouse in vivo and in vitro. *Anat. Embryol. (Berl)* 160; 301- 13, 1980.
- 6) Sanchez, Fernandez Jm., Rivera, J. M., Macias, J. A. : Early aspects of human cochlea development and tectorial membrane histogenesis. *Acta Otolaryngol.* 95 :460-9,1983

[研究発表]

- 〈論文発表〉
なし
- 〈学会発表〉
なし

[知的所有権の取得状況]

- 〈特許取得〉
なし
- 〈実用新案登録〉
なし
- 〈その他〉
なし

難聴の原因遺伝子に関する研究

分担研究員 宇佐美 真 一 (信州大学耳鼻咽喉科学)

共同研究者 阿 部 聡 子・秋 田 二 朗
南 場 淳 司 (弘前大学耳鼻咽喉科)
甲 田 英 子・塚 本 耕 二
浅 村 賢 二 (信州大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

外来を受診する難聴患者にどのような難聴遺伝子が関与しているかを検討すると共に、その臨床的特徴に関し検討した。その結果、PDS 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子 (1555 変異)、コネキシン 26 遺伝子の変異の頻度が多いことが確認された。また日本人家系で初めて KCNQ4 遺伝子、COCH 遺伝子、TECTA 遺伝子による難聴家系が見出された。

【研究目的】

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が特定され始めている。またこれらの難聴の原因遺伝子は日常診療で訪れる難聴患者にも深く関与していることが次第に明らかになってきた。今後、これらの遺伝子解析の成果を最終目的である日常臨床にフィードバックしていくために、¹⁾さらなる原因遺伝子の同定、²⁾遺伝子型と臨床型(表現型)との比較検討、³⁾簡便なスクリーニング検査の確立を行っていく必要がある。

【研究方法】

(1) 難聴の原因遺伝子の同定

ここ数年間に報告された難聴の原因遺伝子が外来を受診する難聴患者に見い出されるか否かに関して検討した。PDS 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子、コネキシン (Cx) 26 遺伝子、コネキシン (Cx) 31 遺伝子、ミオシン VIIa 遺伝子、KCNQ4 遺伝子、COCH 遺伝子、TECTA 遺伝子の変異を検討した。各遺伝子のエクソンの部分の特異的なプライマーにより増幅し、Heteroduplex 法または直接シーケンシングすることによって遺伝子変異を検索した。

(2) 遺伝子型と臨床型(表現型)との比較検討
同一遺伝子が異なる臨床型をとることが知られている。遺伝子解析によって明らかになった原因遺伝子

の変異とその結果によって現われる表現型との比較検討を行った。

(3) 簡便なスクリーニング検査の確立

新しい変異解析装置「WAVE」を用いた解析法や新しいテクノロジーである DAN チップを用いた変異解析を試みた。

【倫理面への配慮】

(1) 遺伝子診断、検査に際しては厚生省の指針にしたがった同意書を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。

(2) 当該研究課題に関しては学内(信州大学医学部)の倫理委員会で承認されている。

【研究結果】

(1) 難聴の原因遺伝子の同定

(i) PDS 遺伝子:

Pendred 症候群および「前庭水管拡大を伴った非症候性難聴」症例に対する遺伝子検索の結果、合計 15 種類の PDS 遺伝子変異が同定された。

(ii) ミトコンドリア遺伝子の変異:

ミトコンドリア遺伝子変異 (1555、3243、7445) のうち 1555A->G 点変異を持つ症例が最も多く、外来を受診する感音難聴患者の約 3% に変異が検出され前年度までの結果が再確認された。

(iii) コネキシン (Cx) 26 遺伝子:

常染色体劣性遺伝形式をとる難聴家系の約 1/3 に Cx26 遺伝子の変異が見い出された。

(iv) コネキシン (Cx) 31 遺伝子:

常染色体優性および劣性遺伝形式をとる難聴家系 50 家系を検索したが変異は見い出されなかった。

(v) ミオシン VIIa 遺伝子:

常染色体優性遺伝形式をとる日本人家系について検討したがミオシン VIIa 遺伝子変異は見い出されなかった。

(vi) KCNQ4 遺伝子:

常染色体優性遺伝形式をとる日本人家系について検討した結果、日本人家系で初めて KCNQ4 遺伝子変異が見い出された。

(vii) COCH 遺伝子:

常染色体優性遺伝形式をとる日本人家系について検討した結果、日本人家系で初めて COCH 遺伝子変異が見い出された。

(viii) TECTA 遺伝子:

常染色体優性遺伝形式をとる日本人家系について検討した結果、日本人家系で初めて TECTA 遺伝子変異が見い出された。

(2) 遺伝子型と臨床型(表現型)との比較検討

同一遺伝子が異なる臨床型をとることが知られている。今回の研究で PDS 遺伝子が非症候群性難聴と症候群性難聴の両者を取りうるということが明らかになった。また内耳奇形を伴う難聴には PDS 遺伝子や EYAI 遺伝子など種々の遺伝子が関与していることが明らかになった。内耳奇形の中でも前庭水管を伴うものに関しては PDS 遺伝子が、また耳瘻孔、頸部瘻孔を伴うものに関しては EYAI 遺伝子が高率に見出されることが明らかになった。

(3) 簡便なスクリーニング検査の確立

新しい変異解析装置「WAVE」を用いた PDS 遺伝子変異解析を確立した。また新しいテクノロジーである DNA チップを用いた変異解析の方法論が確立でき将来の臨床検査の基礎的データを構築することが出来た。

[考 察]

(1) 難聴の原因遺伝子の同定

PDS 遺伝子、コネキシン (Cx) 26 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子の変異 (1555A->G 点変異) が高頻度で見出されることが再確認された。PDS 遺伝子は前庭水管拡大を伴う症例に高頻度で見出され、Pendred 症候群から「前庭水管拡大を伴った非症候群性難聴」まで幅広い表現型をとることが明らかとなった。コネキシン (Cx) 26 遺伝子変異に関しては特に 235delC 変異が高頻度で見出されることが明らかになった。また日本人難聴家系に関与している新たな遺伝子として KCNQ4 遺伝子、COCH 遺伝子、TECTA 遺伝子が明らかになった。

(2) 遺伝子型と臨床型(表現型)との比較検討

PDS 遺伝子の例のように同一遺伝子が非症候群性難聴と症候群性難聴の両者を取りうるということが明らかに

なった。また内耳奇形では異なる遺伝子が関与しておりその遺伝子の特定のためには臨床型(内耳奇形)の特徴を詳細に検討することが有用だと考えられた。

(3) 簡便なスクリーニング検査の確立

新しい変異解析装置「WAVE」を用いた解析法が確立でき、とくにエクソン数の多い変異解析を行う際に有用であることが明らかになった。また新しいテクノロジーである DNA チップを用いた変異解析に成功し将来頻度の多い変異解析には DNA チップを用いた変異解析が有用であることが明らかとなった。

[結 論]

難聴患者には種々の原因遺伝子が関与していることが明らかとなった。これらの原因遺伝子の検索はすでに実用段階に来ており、今後の難聴の診断、治療、予防に大きく寄与することが期待される。

[参考文献]

- 1) Usami S, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H et al. :Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet* 2000;37:38-40.
- 2) Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. :Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000;37:41-3.
- 3) Usami S, Abe S, Akita J, Shinkawa H, Kimberling WJ. :Sensorineural hearing loss associated with the mitochondrial mutations. In "Genetics in Otorhinolaryngology" *Adv Otorhinolaryngol*, Vol. 56 (eds. Kitamura K & Steel KP) 221-9 (Karger, Basel, 2000) .
- 4) Namba A, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ, Usami S. : Genetic features of hearing loss associated with ear anomaly, submitted.
- 5) Akita J, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ, Usami S. : Clinical and genetic features of non-syndromic autosomal dominant sensorineural hearing loss: KCNQ4 is a responsible gene in Japanese, submitted.

[研究発表]

該当なし。

[付図説明]

添付なし。