

20020672

厚生労働省科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 泰地 秀信

平成15(2003)年4月

## 目次

I. 総括研究報告	
遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成	1
松永達雄、泰地秀信	
II. 分担研究報告	
1. A1555G ミトコンドリア DNA 変異による聴覚障害の臨床 遺伝学的、聴覚医学的特徴に関する研究	7
松永達雄、宇佐美真一、新美成二、廣田栄子、熊ノ御堂浩	
2. コネキシン 26 遺伝子変異による聴覚障害に関する研究	20
松永達雄、宇佐美真一、新美成二、廣田栄子、熊ノ御堂浩	
3. 遺伝子変異の疑われる進行性感音性難聴における難聴遺伝子 スクリーニング	26
鈴木隆史、松永達雄	
4. 内耳ミトコンドリア障害モデルの作成	32
保谷則之、岡本康秀、松永達雄	
5. ミトコンドリア障害難聴モデルにおける病態の解明	37
岡本康秀、保谷則之、松永達雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総括研究報告書

遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成

分担研究者 松永達雄 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科

主任研究者 泰地秀信 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科医長

研究要旨：遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成のため以下の点について解明あるいは開発をした。1) A1555G ミトコンドリア DNA 変異による聴覚障害の発症を修飾する遺伝因子および環境因子（予防とカウンセリングの指針に活用）、2) A1555G ミトコンドリア DNA 変異による聴覚障害の発症前、発症初期、中期、後期の各段階での特徴と病態生理（診断とリハビリテーションの指針に活用）、3) 原因不明の難聴におけるコネキシン 26 遺伝子変異の関与（診断の指針に活用）、4) コネキシン 26 遺伝子変異の各変異パターンと聴覚障害の特徴の関係（カウンセリングの指針に活用）、5) ミトコンドリア DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異の簡易スクリーニング法（診断、予防の指針に活用）、6) 内耳ミトコンドリア障害性難聴の動物モデル作成とその病態解析（治療の指針に活用）

A. 研究目的

ミトコンドリア DNA 変異とコネキシン 26 遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針として診断、予防、治療、リハビリテーション、カウンセリングの指針の作成が本研究課題の最終的目標である。本年度は診断の指針作成のためには聴覚障

害の発症初期から最終期に至る臨床像の解明、原因不明難聴における遺伝子変異の関与の解析、そして遺伝子変異スクリーニング法の開発を目的とした。予防とカウンセリングの指針作成のためには聴覚障害の種類、程度、発症時期を修飾する遺伝因子および環境因子の解明および遺伝子

変異パターンと聴覚障害の特徴の關係の解析を目的とした。リハビリテーションの指針作成のためには本遺伝子変異による聴覚障害の病態生理の解明も目的とした。治療の指針作成のためには、現時点で有効な治療法がないため、その病態メカニズムを解明して、実験的治療を試行するため疾患モデル動物を作成、解析することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する日本人大家系における臨床遺伝学的検討

家系内の母系メンバー（A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する人）に対して聴覚障害の病歴、家系内の発症パターン、発症に関連した遺伝因子と環境因子、A1555G ミトコンドリア DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異の解析を施行した。

### 2) A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する日本人大家系における聴覚医学的検討

家系内の母系メンバー（A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する人）

に対して各種聴力検査を施行した。

### 3) 原因不明の難聴者とその血縁者におけるコネキシン 26 遺伝子変異の検討

先天性および後天性の難聴者とその血縁者においてコネキシン 26 遺伝子の全エクソンシーケンシングによる解析を施行した。

### 4) コネキシン 26 遺伝子変異による難聴者とその血縁者における臨床遺伝学的、聴覚医学的検討

同定されたコネキシン 26 遺伝子変異による難聴者とその血縁者二対して、難聴の聴覚医学的特徴と遺伝子変異パターンとの關係を検討した。

### 5) ミトコンドリア DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異の簡易スクリーニング法の開発

日本人に対する効率的な A1555G ミトコンドリア DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異のスクリーニング法を開発を施行した。

### 6) 内耳ミトコンドリア障害性難聴の動物モデル作成

ラット内耳局所へのミトコンドリアトキシシン (3NPA) の投与による不可逆性難聴モデルの開発および 3NPA 投与濃度と難聴の発症の関係、投与後の時間的経過に伴う聴覚障害の経過を検討した。

#### 7) 内耳ミトコンドリア障害性難聴の動物モデルの病態解析

作成された動物モデルの蝸牛を組織学的に検討して、内耳傷害の部位、状態、経時的変化を検討した。

### C. 研究結果

#### 1) A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する日本人大家系における臨床遺伝学的検討

a. 同一の同胞内の発症者では表現型が類似しており、異なる同胞の発症者間ではその表現型に関連性を認めなかった。

b. 身体的、精神的ストレスにより聴覚障害発症する例を認めた。

c. 耳鳴のみで発症した場合にその半数は後に難聴を発症した。

d. コネキシン 26 遺伝子変異は本家系の聴覚障害発症の修飾因子でなかった。

#### 2) A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する日本人大家系における聴覚医学的検討

A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する人では難聴を自覚する以前に純音閾値低下が始まっている例が認められた。軽度難聴の時点で既に外有毛細胞機能は高度に障害されていた。難聴は高度障害に至るまではほぼ内耳障害のみにより進行した。

#### 3) 原因不明の難聴者とその血縁者におけるコネキシン 26 遺伝子変異の検討

コネキシン 26 遺伝子変異による日本人難聴者ではほぼ 100%の人が 4 種類の点変異 (235delC、G45E、Y136stop、V37I) のいずれか一つあるいは複数に伴った。

#### 4) コネキシン 26 遺伝子変異による難聴者とその血縁者における臨床遺伝学的、聴覚医学的検討

a. 先天性難聴者と後天性難聴者では、同定される変異パターンの頻度が異なった。

b. A1555G ミトコンドリア DNA 変異とヘテロ 235delG 変異を重複して

持つ人は、同じ家系内の A1555G ミトコンドリア DNA 変異のみあるいはヘテロ 235delG 変異のみを持つ人より高度の難聴をより早期に発症した。

#### 5) ミトコンドリア DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異の簡易スクリーニング法の開発

標的を選別した PCR-RFLP 法とその反応条件の調整により、感度と特異性が高く、迅速に大量の検体を解析できる方法を開発した。

#### 6) 内耳ミトコンドリア障害性難聴の動物モデル作成

a. ラット内耳局所へ蝸牛窓経由でミトコンドリアトキシシン (3NPA) を投与することにより不可逆性難聴モデルが作成できた。

b. 投与濃度が一定濃度を超えると聴覚障害が急速に起こり、ミトコンドリア病の特徴である閾値効果に相当すると考えられた。

#### 7) 内耳ミトコンドリア障害性難聴の動物モデルの病態解析

内耳ミトコンドリア障害により外側壁の線維細胞が高度に傷害され、

より軽度の障害がラセン神経節ニューロンに認められた。外有毛細胞にも変化が認められた。

#### D. 考察

A1555G ミトコンドリア DNA 変異による難聴の修飾因子としての核遺伝子および環境因子の関与が明らかになり、これは聴覚障害の予防とカウンセリングをより適確に行なうことに役立つ知見である。耳鳴が難聴発症の警告として重要であることが明らかになったことは、予防対策を取るために役立つ知見である。A1555G ミトコンドリア DNA 変異による難聴の各障害レベルでの病態生理が解明されたことは、それぞれの段階に応じた適正なりハビリテーション法の選択、実施に役立つ知見である。コネキシン 26 遺伝子の変異パターンに先天性難聴と後天性難聴で違いがあること、日本人では特定の 4 つの点変異の検討でほぼ 100% のコネキシン遺伝子変異のスクリーニングが可能であることが明らかになったことは、臨床の場でのスクリーニングをより効率的に行なうことが可能とする知見である。ミトコンドリア

DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異の簡易スクリーニング法の開発は臨床診断を容易とする知見である。

ミトコンドリアトキシンの内耳局所投与によりミトコンドリア障害難聴モデルの作成に成功し、このモデルの病態解析により内耳ミトコンドリア障害に対しては蝸牛外側壁が最も脆弱性が高く、外側壁の傷害が聴覚障害発症に最も関与していることが示された。これはミトコンドリア障害による難聴の治療法の開発は、蝸牛外側壁の保護あるいは再生を標的として開発を進めることが有効であることを示す知見である。

#### E. 結論

ミトコンドリア DNA およびコネキシン 26 遺伝子変異による難聴者およびその血縁者の臨床症状、病歴、家族歴、聴覚検査、遺伝子検査などから、実際の診断、予防、リハビリテーションに有用な知見を得た。また動物モデルの開発と解析により、今後の治療法開発への基盤となる知見を得た。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) I. Yuge, A Ohtsuka, T. Matsunaga, S. Usami. Identification of 605ins46, a novel GJB mutation in a Japanese family. *Auris Nasus Larynx* 29:379-382, 2002

##### 2. 学会発表

- 1) 松永達雄、熊野御堂浩、城間将江、廣田栄子、佐藤美奈子、泰地秀信、新美成二、宇佐美真一 ミトコンドリア DNA の A1555G 変異を伴う日本人大家系における聴覚障害の特徴とその修飾因子 第 2 回日本ミトコンドリア研究会、東京、2002 年 12 月 19-21 日
- 2) 松永達雄、鈴木隆史、保谷則之、増田圭奈子、岡本康秀、泰地秀信、熊野御堂浩、城間将江、廣田栄子、新美成二、佐藤美奈子、宇佐美真一 ミトコンドリア DNA の A1555G 変異に伴う聴覚障害の特徴とその修飾因子 第 154 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会学

術講演会、東京、2003 年 1 月 18  
日

- 3) T. Matsunaga, M. Shiroma, H.  
Kumanomido, E. Hirota, S. Niimi, M.  
Sato, H. Taiji, S. Usami. Delineation  
of the phenotypic expression in a  
large Japanese family with A1555G

mutation. 26th Midwinter Meeting on  
Hearing and Balance, Association for  
Research in Otolaryngology, Daytona  
Beach, 2003 年 2 月 23-27 日

- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

A1555G ミトコンドリア DNA 変異による聴覚障害の臨床遺伝学的、聴覚医学的  
特徴に関する研究

分担研究者 松永達雄 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科

研究協力者 宇佐美真一 信州大学医学部耳鼻咽喉科教授

新美成二 国際医療福祉大学言語聴覚センター教授

廣田栄子 国際医療福祉大学言語聴覚障害学科教授

熊ノ御堂浩 国際医療福祉病院耳鼻咽喉科講師

研究要旨：本研究では A1555G ミトコンドリア DNA 変異による聴覚障害の特徴について解析した。A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する日本人 1 家系の母系メンバー124 人を対象として、病歴聴取、難聴遺伝子検査、各種聴覚検査を施行した。これらの結果の解析により本遺伝子変異による聴覚障害の臨床的特徴、発症に関連する遺伝要因および環境要因、聴覚障害レベル別の病態生理を解明した。

A. 研究目的

A1555G ミトコンドリア DNA 変異による進行性難聴の診断と治療の向上のため、本遺伝子変異による難聴の聴力像の特徴、家系内での発症パターン、聴覚障害の病態生理、難聴発症を修飾する環境因子と遺伝因子を解明することを目的とした。

B. 研究方法

対象は A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有する日本人 1 家系の母系メンバー124 人（男性 57 人、女性 67 人）であり、いずれの母系メンバーもアミノグリコシド系抗生剤の使用歴を持たず、また難聴以外に医学

的問題を持たなかった。

対象者の聴覚障害の病歴を本人あるいはその身近な血縁者より聴取して解析するとともに、承諾を得られた対象者に対して純音聴力検査、語音聴力検査、SISI テスト、TEOAE、DPOAE、ABR の各聴覚検査および A1555G ミトコンドリア DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異の遺伝子検査を施行した。本研究は国立病院東京医療センター倫理審査委員会の承認および被験者からのインフォームドコンセントを得て施行された。

### C. 研究結果

聴覚障害としては、難聴と耳鳴が主たる症状であり、ごく少数で耳閉感が認められた。対象家系の家系図と家系内における難聴と耳鳴の発症を図 1 に示した。第 V 世代後半から第 VI 世代の新しい世代では聴覚障害者がほとんど認められず、それ以前の世代では聴覚障害者が高頻度に認められる。

各対象者における難聴の程度、難聴発症時期、耳鳴発症時期、耳鳴罹患期間を図 2 に示した。難聴は 26.8% (33/123)、耳鳴は 24.6% (28/114) に認

められ、両症状を呈する人は 19 人であった。全体の約 1/3 で何らかの聴覚障害が認められた。各同胞内では、聴覚障害発症者の難聴の程度、難聴発症時期、耳鳴発症時期、耳鳴罹患期間のいずれも類似した。一方、異なる同胞内の聴覚障害発症者においては、これらの聴覚障害の特徴に関連性を認めなかった。また同一の同胞内での聴覚障害発症は約 50% であった。

各対象者における難聴と耳鳴の発症時期と継続期間の関係を図 3 に示した。耳鳴の認知可能となる 10 代以降に聴覚障害を発症した場合には、耳鳴が発症してから難聴を発症する 경우가多く認められた。本家系では耳鳴のみで発症した約 50% は後に難聴を呈した。

純音聴力検査を施行した各対象者における純音聴力閾値の結果を図 4 に示した。例外なく高音域の周波数ほど高度に障害されており、高音急墜型を呈するものが最も多く、次いで高音前傾型が多く認められた。難聴を自覚していない 41 人で、検査により純音聴力閾値の上昇を認めた人も 6 人(15%)存在した。

難聴発症時期と両耳平均純音聴力閾値の関係を図 5 に示した。10 才以前に発症した人は全員が高度の純音聴力閾値上昇を呈しており、10 才以後に発症した人では全員が軽度または中等度の純音聴力閾値上昇を呈していた。

耳鳴の有無と両耳平均純音聴力閾値の関係を図 6 に示した。純音聴力閾値正常の人では耳鳴なしの頻度が高かったが耳鳴ありの人でも 25.5%で認められた。純音聴力閾値上昇の認められる人では、62.5%で耳鳴が認められた。

最高語音明瞭度と純音聴力閾値の関係を図 7 に示した。内耳性感音難聴の場合の最高語音明瞭度と純音聴力閾値の関係と同様のパターンを呈した。純音聴力閾値に比べて著しく最高語音明瞭度の低下する後迷路性難聴あるいは中枢性難聴に特徴的なパターンは全例で認められなかった。

SISI score と純音聴力閾値の関係を図 8 に示した。1000、2000、4000 Hz の各周波数において純音聴力閾値が 20dB より良い場合は SISI score は大部分が 30%以下（正常内耳機能）であり、純音聴力閾値が 20dB から 40dB

では SISI score は大部分が 30%以上（内耳機能低下あるいは低下疑い）となり、純音聴力閾値が 40dB より悪い場合は SISI score は大部分が 70%以上（内耳機能低下）であった。

TEOAE の 2 種類のパラメーターである response と reproducibility と純音聴力閾値の関係を図 9 と図 10 に各々示した。純音聴力閾値が 20dB より良い場合は response と reproducibility とともに正常であった。しかし純音聴力閾値が 20dB 以上 40dB まで上昇している場合は response と reproducibility とともに低下していた。そして純音聴力閾値 40dB 以上では response が得られなかった。

DPOAE と純音聴力閾値の関係を図 11 に示した。1000、2000、4000 Hz のいずれの周波数においても DPOAE パラメーターである amplitude は純音聴力閾値が 15dB より良い場合は正常であり、純音聴力閾値が 15dB 以上 40dB 未満では低下あるいは消失、40dB 以上では消失していた。

ABR と純音聴力閾値の関係を表 1 に示した。V 波の閾値は純音聴力閾値とほぼ一致しており、I 波の閾値は V 波の閾値より高値であった。V 波

潜時は純音聴力閾値と比較して高度の延長例を認めなかった。

聴覚障害発症者で、7人に発症と関連した環境因子が認められた。6人は身体的あるいは精神的ストレスによるものであり、1人は数時間の強大音への暴露であった。

A1555G ミトコンドリア DNA 変異は検査した41人の全員に認められた。この中で1人だけに難聴と関連するコネキシン 26 遺伝子変異 (heterozybous 299-300 delAT)が同時に認められた。しかしこの A1555G ミトコンドリア DNA 変異とコネキシン 26 遺伝子変異の両方が認められた人の聴覚はほぼ正常であった。

#### D. 考察

本研究結果は A1555G ミトコンドリア DNA 変異家系では、アミノグリコシドの使用歴がない場合でも明らかに変異を持たない人に比べて聴覚障害発症の危険性が高いことを示している。

また同胞内での聴覚障害の程度および発症時期の類似は、発症に父母からの核遺伝子による修飾が存在することを示唆している。対象者にお

いてコネキシン 26 遺伝子変異が聴覚障害の程度および発症時期に関与していなかったことより、修飾核遺伝子はコネキシン 26 遺伝子以外に存在すると考えられる。

A1555G ミトコンドリア DNA 変異では聴力正常で耳鳴のみで発症する場合もある。その場合、約半数は後から難聴を呈するので、耳鳴は難聴発症の警告と考えられるので臨床上重要である。

純音聴力検査結果は、A1555G ミトコンドリア DNA 変異の特徴的パターンが高音急墜型であり、一部に高音漸傾型が認められるが、それ以外はないことを示している。さらに本人に難聴の自覚がなくても聴力検査で高周波数域の閾値上昇が検出されることも明らかになった。

最高語音明瞭度、SISI score、TEOAE、DPOAE、ABR による聴覚検査と純音聴力検査との比較より、A1555G ミトコンドリア DNA 変異による難聴の病態として 1) 純音聴力閾値が正常範囲であっても内耳機能の低下が起きている人が存在し、2) 純音聴力閾値が 40dB 以上では外有毛細胞機能は高度障害されていること、3) 純音聴

力閾値の上昇はそのほぼすべてが内耳機能障害によるものであることが明らかとなった。

#### E. 結論

- 1) 1555G ミトコンドリア DNA 変異による聴覚障害の臨床的、聴覚医学的、遺伝学的特徴を明らかにした。
- 2) 本変異による聴覚障害の発症に関する遺伝因子および環境因子を明らかにした。
- 3) 本変異による聴覚障害の病態生理を臨床的聴覚検査結果に基づいて解明した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 松永達雄、熊野御堂浩、城間将江、廣田栄子、佐藤美奈子、泰地秀信、新美成二、宇佐美真一 ミトコン

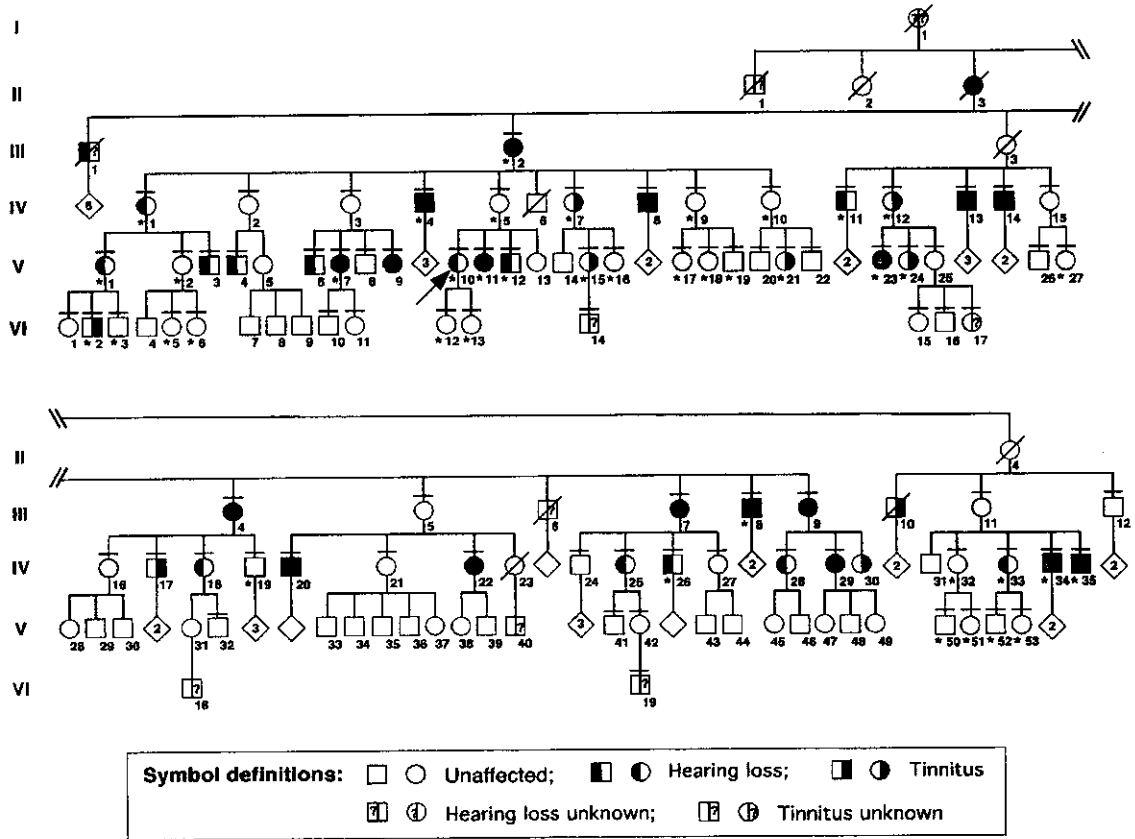
ドリア DNA の A1555G 変異を伴う日本人大家系における聴覚障害の特徴とその修飾因子 第 2 回日本ミトコンドリア研究会、東京、2002 年 12 月 19-21 日

- 2) 松永達雄、鈴木隆史、保谷則之、増田圭奈子、岡本康秀、泰地秀信、熊野御堂浩、城間将江、廣田栄子、新美成二、佐藤美奈子、宇佐美真一 ミトコンドリア DNA の A1555G 変異に伴う聴覚障害の特徴とその修飾因子 第 154 回日本耳鼻咽喉科学会東京都地方部会学術講演会、東京、2003 年 1 月 18 日

- 3) T. Matsunaga, M. Shiroma, H. Kumanomido, E. Hirota, S. Niimi, M. Sato, H. Taiji, S. Usami. Delineation of the phenotypic expression in a large Japanese family with A1555G mutation. 26th Midwinter Meeting on Hearing and Balance, Association for Research in Otolaryngology, Daytona Beach, 2003 年 2 月 23-27 日

- #### H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

图 1



ID	Hearing Loss					Tinnitus					
	Degree				Onset	Onset				Duration	
	I	II	III	IV	10 20 30 40 50 60 <	10 20 30 40 50 60 <	I	II	III	IV	
I-1	?				?	?	?	?	?	?	?
I-1											?
I-2											
I-3											P
I-4											
III-1											?
III-2											
III-3											
III-4											
III-5											
III-6											?
III-7											
III-8											
III-9											
III-10											
III-11											
III-12											
IV-1											
IV-2											
IV-3											
IV-4											
IV-5											
IV-6											
IV-7											
IV-8											
IV-9											
IV-10											
IV-11											
IV-12											
IV-13											
IV-14											
IV-15											
IV-16											
IV-17											
IV-18											
IV-19											
IV-20											
IV-21											
IV-22											
IV-23											
IV-24											
IV-25											
IV-26											
IV-27											
IV-28											
IV-29											
IV-30											P
IV-31											
IV-32											
IV-33											
IV-34											
IV-35											
V-1											
V-2											
V-3											
V-4											
V-5											
V-6											
V-7											
V-8											
V-9											
V-10											
V-11											P
V-12											
V-13											
V-14											
V-15											
V-16											
V-17											
V-18											
V-19											
V-20											
V-21											
V-22											
V-23											
V-24											
V-25											
V-26											
V-27											
V-28											
V-29											
V-30											
V-31											
V-32											
V-33											
V-34											
V-35											
V-36											
V-37											
V-38											
V-39											
V-40											?
V-41											
V-42											
V-43											
V-44											
V-45											
V-46											
V-47											
V-48											
V-49											
V-50											
V-51											
V-52											
V-53											
VI-1											
VI-2											
VI-3											
VI-4											
VI-5											
VI-6											
VI-7											
VI-8											
VI-9											
VI-10											
VI-11											
VI-12											
VI-13											
VI-14											?
VI-15											
VI-16											?
VI-17											?
VI-18											?
VI-19											?

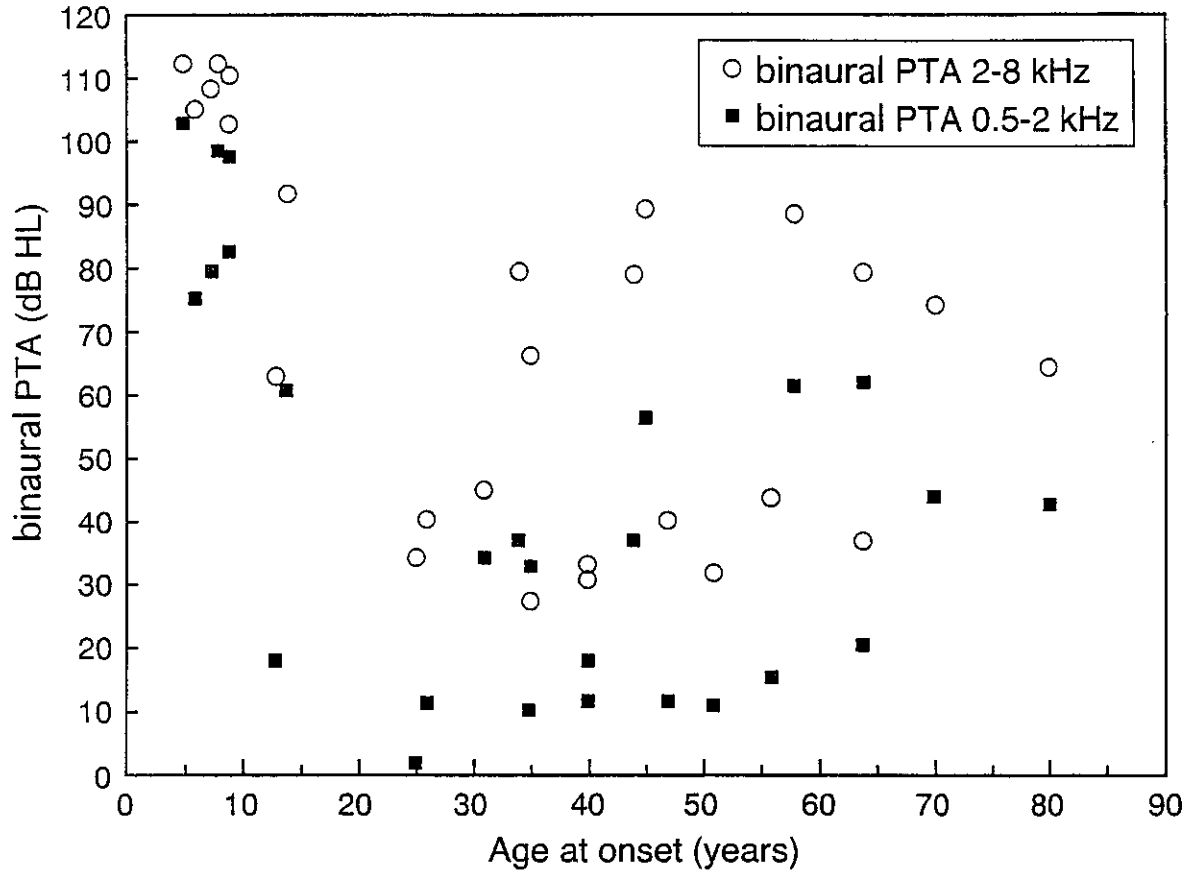
图 3



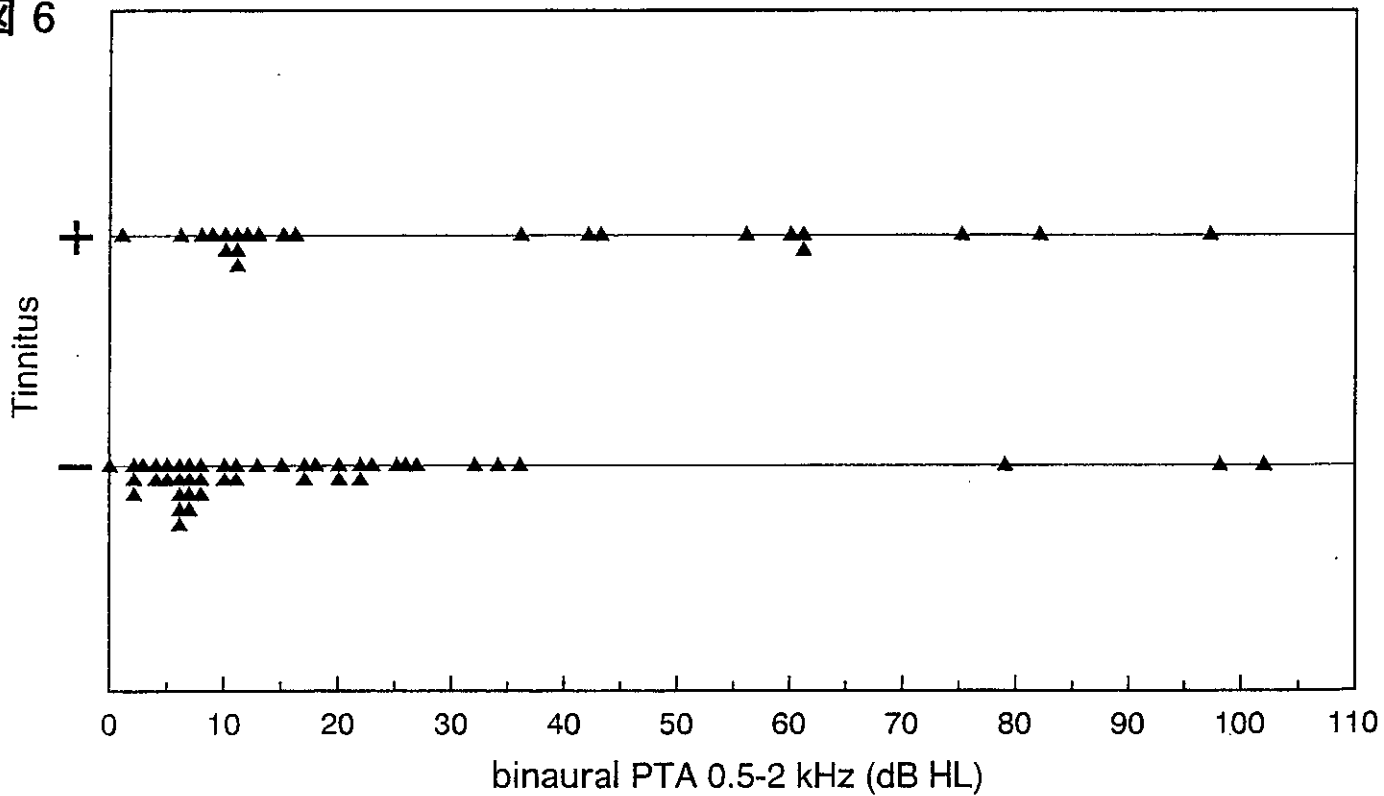




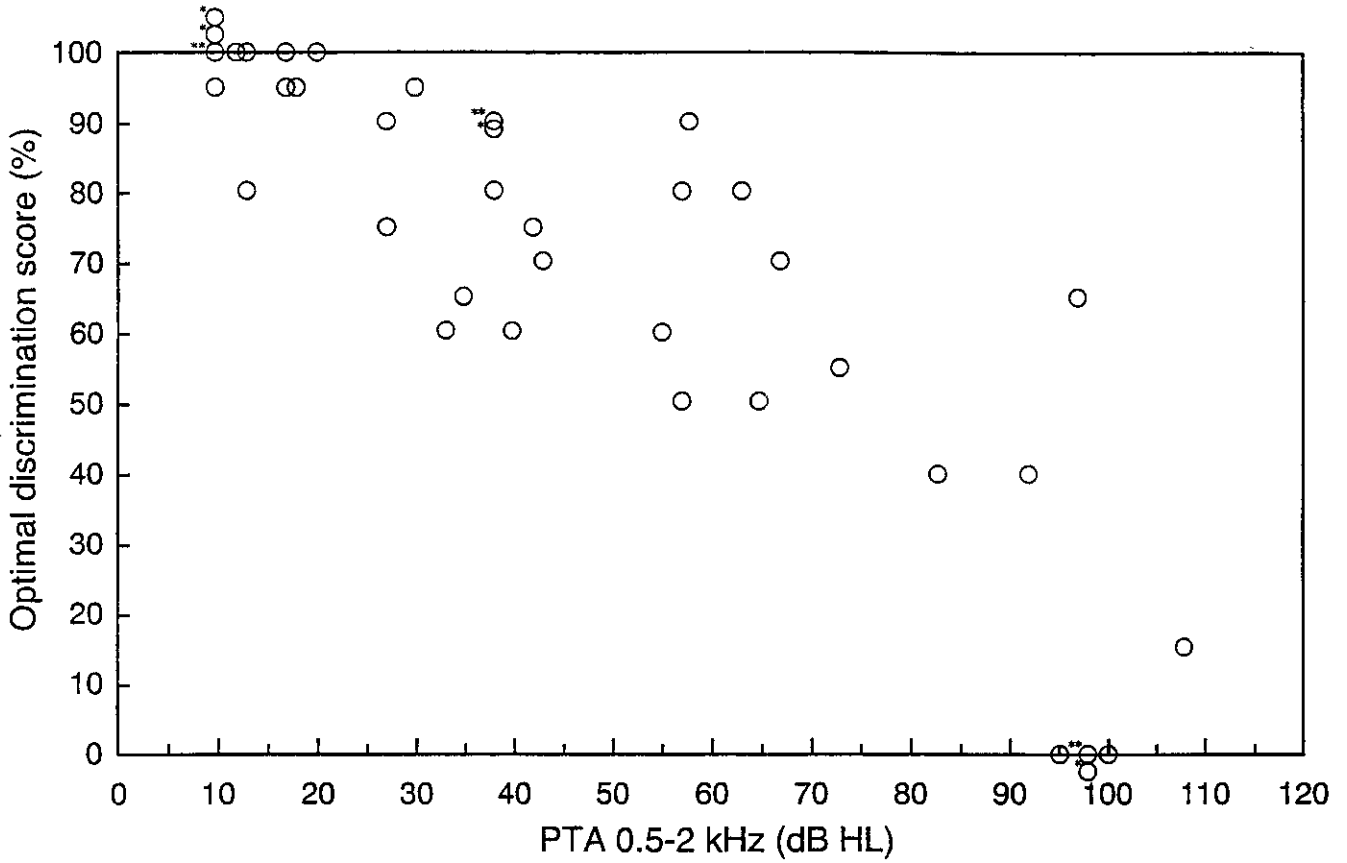
☒ 5



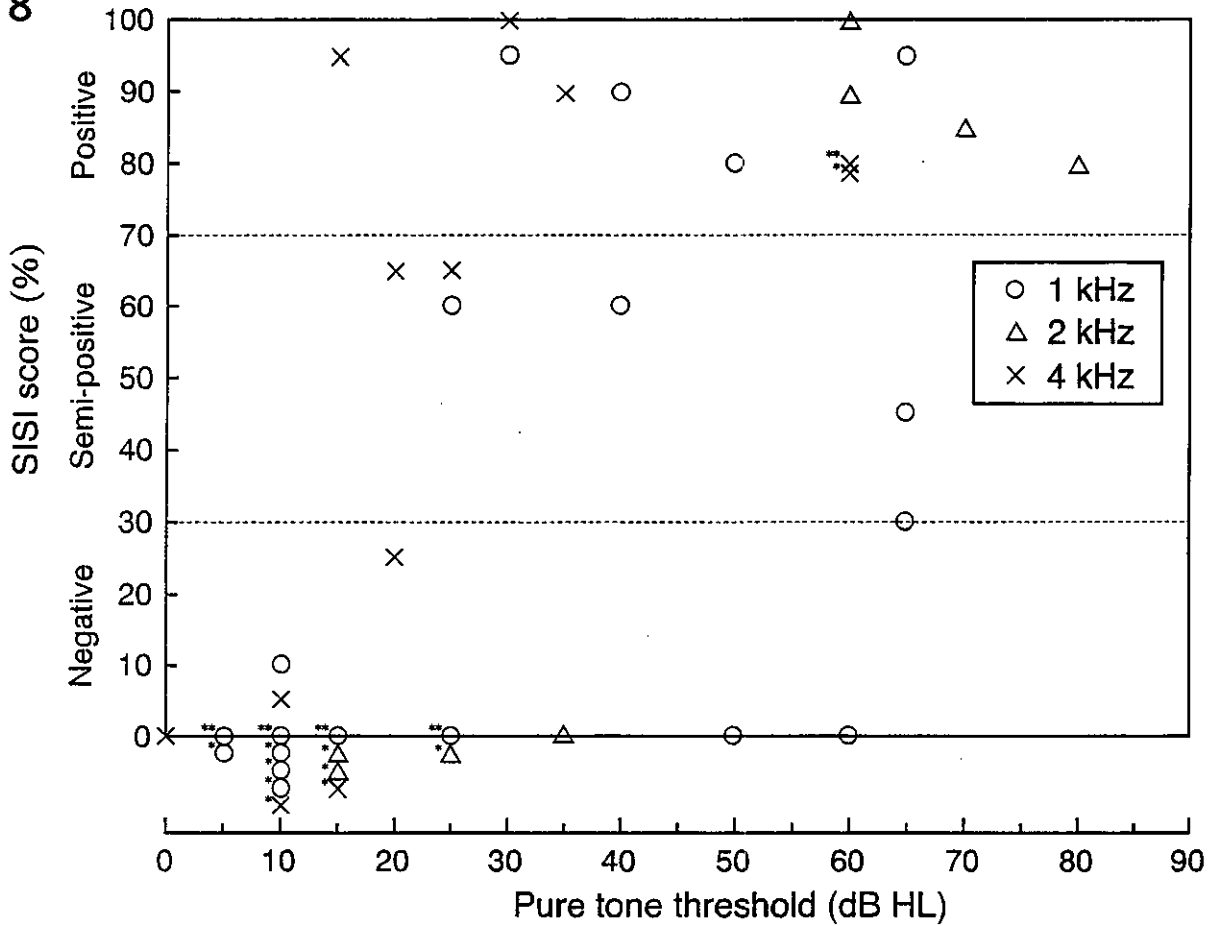
☒ 6



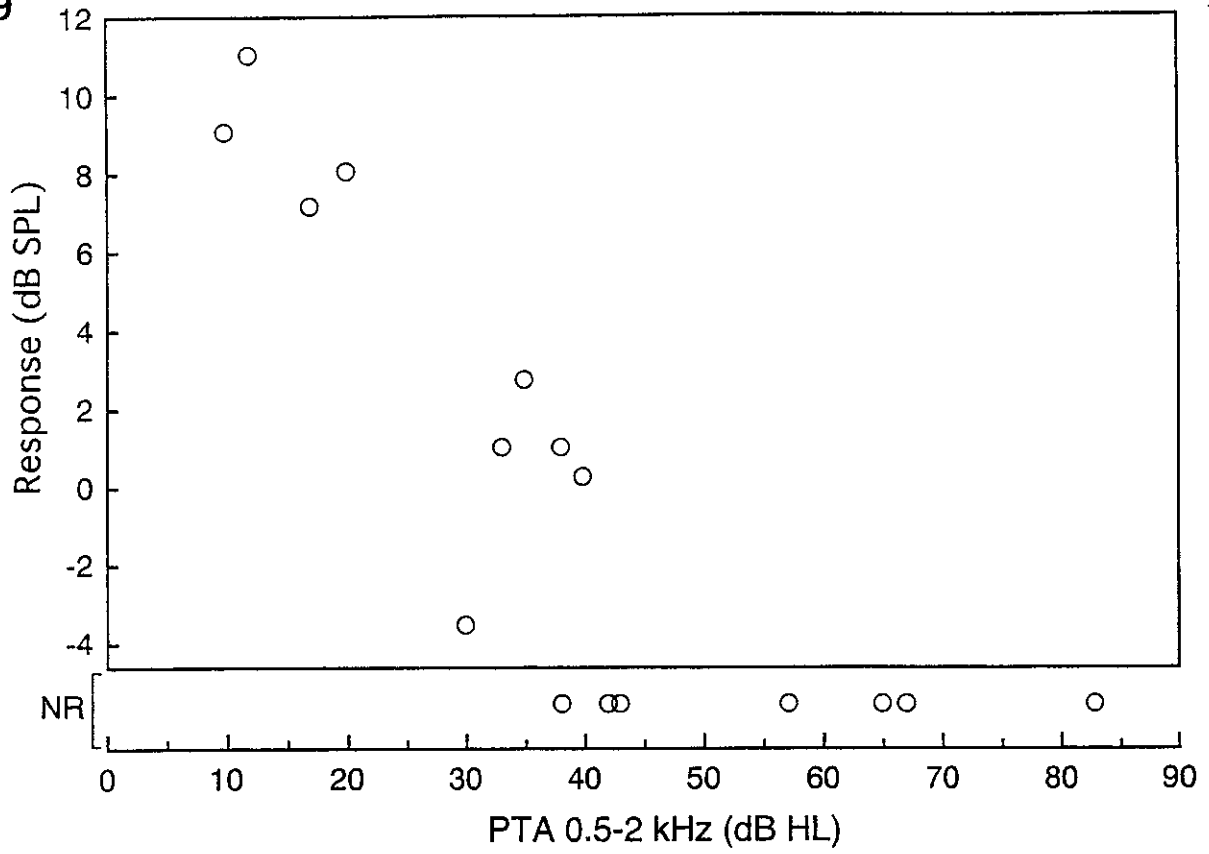
7



8



9



10

