

200400578A

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

難聴遺伝子データベース構築と 遺伝カウンセリングに関する研究

平成16年度 総括研究報告書

平成17(2005)年4月

主任研究者 宇佐美 真 一

I. 統括研究報告

難聴遺伝子データベース構築と遺伝カウンセリングに関する研究

主任研究者 宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

分担研究者 福嶋義光（信州大学医学部附属病院遺伝子診療部）

研究協力者 工 稔、大塚 明弘、浅村 賢二、鈴木 伸嘉、小口 智啓、小林 克彦、大島章、鬼頭 良輔、鈴木 宏明、福岡 久邦、我妻 道生（信州大学医学部耳鼻咽喉科）、山口敏和、阿部聡子（ビーエムエル総合研究所）、秋田二郎、南場淳司（弘前大学医学部耳鼻咽喉科）

[研究要旨]

ここ数年の分子遺伝学のめざましい発展により、すで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。我々は従来から日本人難聴患者の遺伝子解析を行ってきたが、その結果日常診療で耳鼻咽喉科の外来を訪れる難聴患者にも遺伝子が深く関与していることが明らかになった。難聴の原因遺伝子は数十から 100 個以上あると推測されているが、現状では原因遺伝子の特定できる難聴患者はまだ 10-20%程度であると考えられ、今後新しいアプローチによるさらなる原因遺伝子の特定が必要である。現在欧米を中心に難聴の遺伝子解析が盛んに行われており毎年次々と新しい遺伝子が報告されているが、現在報告されている難聴の遺伝子のほとんどは諸外国の家系から発見されたものである。日本民族の遺伝的背景を考え合わせると日本人特有の難聴遺伝子が多数存在する可能性が考えられる。また同じ原因遺伝子であっても日本人難聴患者に見出される遺伝子変異は欧米での報告とは異なることを報告してきた（Abe et al., 2000, Ohtsuka et al., 2003）。従って今後、難聴患者の診断、治療、カウンセリングを行なっていく上で日本人家系を用いた遺伝子解析のデータベースが必要となることから当該研究を企図した。日本人のデータベースの構築に関連して今後解決すべき課題として以下の課題が考えられる。

（1）日本人のデータベースの構築に関連して今後解決すべき課題：

- 1) 日本人難聴患者に見出される原因遺伝子の変異部位に関する検討
- 2) 新しい原因遺伝子の同定
- 3) 遺伝子型と臨床型（表現型）との比較検討
- 4) 簡便なスクリーニング検査による頻度調査

平成 14,15 年度 GJB2 遺伝子および SLC26A4(PDS)遺伝子について検討した結果、日本人の変異部位は欧米人に見出された変異部位と大きく異なっていることが明らかとなった（Ohtsuka et al.,

2003, Tsukamoto et al., 2003)。日本人家系を用いた遺伝子解析のデータベースは、今後、難聴患者の診断、治療、カウンセリングを行なっていく上で重要な基礎データとなると思われた。平成 16 年度は GJB2 遺伝子に関して遺伝子型と臨床型（表現型）との比較検討を行った。

新しい原因遺伝子の同定に関しては内耳に特異的に高発現する遺伝子を中心にスクリーニングした結果、日本人難聴家系から新たな難聴の原因遺伝子として mu-crystallin (Abe et al., 2003a), KIAA1199 (Abe et al., 2003b), COL9A3(Asamura et al., in press), ATP1A2(Ohtsuka et al, submitted)の各遺伝子が発見された。

遺伝子型と臨床型（表現型）に関して、高頻度で見いだされ臨床的に重要であると考えられる GJB2（コネキシン 26）遺伝子に関して遺伝子型と臨床型（表現型）との比較検討を行った。その結果、遺伝子型と難聴の程度に関連があることが明らかになった。従って GJB2 遺伝子に関しては遺伝子解析によって難聴の程度が推測できる可能性が示唆された。これらの結果から遺伝子検査は正確な診断ばかりでなく予後の予想や治療法の選択にも有用であることが実証された (Oguchi et al., 2005)。

難聴原因遺伝子の種類は数十から百種類程度と推測されているが、難聴の遺伝子検索のためには多数の遺伝子変異を同時に検出可能なスクリーニング法が必要である。最近開発されたインベーター法を用いた簡便なスクリーニング法を用いて各遺伝子変異の頻度調査を行った結果、また GJB2 遺伝子、SLC26A4(PDS)遺伝子、ミトコンドリア 1555 変異が高頻度で見いだされた。従ってこの 3 種類の遺伝子が日本人難聴患者の原因遺伝子として最も重要であることが明らかになった。

一方、遺伝子診断が日常診療で一般化されるにつれ、それに伴う遺伝カウンセリングの充実が求められている。現状では遺伝子検査が先行してしまっているために臨床現場で種々の問題が生じ始めている。信州大学医学部附属病院では全国に先駆け「遺伝子診療部」が設けられ、各臨床科と連携して遺伝子診療に取り組んでいる。しかし現状では生命にかかわる重篤な疾患が中心で難聴に関する遺伝子診療は十分確立できていないと言えない。そこで本研究では難聴に関連した最新の遺伝子情報を適切に医療の場で生かすために以下の課題に取り組んでいる。

(2) 遺伝カウンセリングに関して今後解決すべき課題：

- 1) 難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成
- 2) 遺伝相談のシステム、ネットワーク整備
- 3) 啓蒙活動

平成16年度は遺伝子診断の確定した家系に対して遺伝カウンセリングを行うとともに、種々の希望で遺伝子診療部あるいは耳鼻科外来を訪れた外来患者に対して遺伝カウンセリングを行い難聴の遺伝カウンセリングの症例を重ね、各難聴原因遺伝子ごとのカウンセリングの重要点をリストアップすることが出来た。また啓蒙活動として一般向け後援会「難聴と遺伝」を開催した。

A. 研究目的

1) 日本人のデータベースの構築

現在報告されている難聴遺伝子のほとんどは諸外国の家系から発見されたものであるが、日本民族の遺伝的背景を考え合わせると日本人特有の難聴遺伝子が多数存在する可能性が考えられる。また我々は同じ原因遺伝子であっても日本人難聴患者に見出される遺伝子変異は欧米での報告とは異なることを明らかにしてきた。近い将来、遺伝子診断は難聴の「正確な診断」「予後の推測」「治療法の選択」「カウンセリング」に必要不可欠なものとなっていくことが予測されるがそのためには日本人独自の難聴遺伝子のデータベースが必要である。

2) 遺伝カウンセリングの必要性

遺伝子診断が日常診療で一般化される一方で、それに伴う遺伝カウンセリングの充実が求められている。本研究では難聴に関連した最新の遺伝子情報を適切に医療の場で生かすために難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成、遺伝相談のシステム、ネットワーク整備、啓蒙活動、などを行う必要がある。

B. 研究方法

研究目的を達成するために以下の研究を行った。

- 1) 日本人と欧米人の難聴遺伝子変異の比較
- 2) 新しい難聴原因遺伝子の同定
- 3) 遺伝子型と臨床型(表現型)との比較検討
- 4) 簡便なスクリーニング検査による頻度調査
- 5) 難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成

[倫理面への配慮]

「難聴の遺伝子解析」に関しては3省(文部科学省、厚生労働省、経済産業省)合同「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」にもとづき、患者の文書による同意を得て実施している。また「難聴の遺伝子解析」に関しては信州大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

1) の変異部位に関する検討

今年度は頻度の高い遺伝子(GJB2 遺伝子、SLC26A4(PDS)遺伝子)に関して外来を受診した感音難聴患者を対象に検討を行った。インフォームドコンセントの後に採血を行いDNAを抽出した。GJB2 遺伝子、SLC26A4(PDS)遺伝子のエクソン部分の特異的なプライマーにより増幅し直接シークエン

ス法により遺伝子変異を検索した。

2) 新しい原因遺伝子の同定

新しい原因遺伝子の同定を目的として東京大学医科学研究所との共同研究を行い内耳に特異的に発現する遺伝子に関して直接シーケンス法により遺伝子変異を検索した。

3) 遺伝子型と臨床型（表現型）との比較検討

GJB2, SLC26A4(PDS)の各遺伝子に関し多施設の共同研究を行い、遺伝子型と臨床型（表現型）を比較検討した。GJB2 遺伝子に関しては日本人難聴家系に見出された変異を細胞に導入し細胞内局在を観察し臨床型（難聴の程度）と比較検討した。

C.D. 研究結果および考察

1) 日本人と欧米人の変異の比較

GJB2 遺伝子、SLC26A4(PDS)遺伝子における変異に関して検討を行った結果、日本人の変異部位は欧米人に見出された変異部位と大きく異なっていることが明らかとなった（図1、図2）（Ohtsuka et al., 2003, Tsukamoto et al., 2003）。最近の報告では各民族に異なる変異を持った共通先祖の存在が示唆されているが、今回の我々の解析でも日本人に高頻度で見出される GJB2 遺伝子の 235delC 変異や SLC26A4(PDS) 遺伝子の H723R 変異は founder effect である可能性が示唆された（Ohtsuka et al., 2003, Park et al., 2003）。このようなデータの蓄積は今後我が国で難聴患者の診断、治療、カウンセリングを行なっていく上で重要な基礎データとなると思われる。

2) 新しい原因遺伝子の同定

内耳に高発現する遺伝子（Abe et al., 2003a）を中心にスクリーニングした結果、日本人難聴家系から新たな難聴の原因遺伝子として mu-crystallin（Abe et al., 2003a）, KIAA1199（Abe et al., 2003b）, COL9A3（Asamura et al., in press）, ATP1A2（Ohtsuka et al, submitted）の各遺伝子が発見された。

3) 遺伝子型と臨床型（表現型）との比較検討

Pendred 症候群と前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴はともに SLC26A4(PDS)遺伝子が原因の一連の疾患群であることが確認された（Tsukamoto et al., 2003）。また GJB2（コネキシン 26）遺伝子に関して検討した結果、遺伝子型と難聴の程度に関連があることが明らかになった。従って GJB2 遺伝子に関しては遺伝子解析によって難聴の程度が推測できる可能性が示唆された。これらの結果から遺伝子検査は正確な診断ばかりでなく予後の予想や治療法の選択にも有用であることが実証された（Oguchi et al., 2005）。

またアミノ配糖体抗生物質による難聴との関連でミトコンドリア遺伝子変異の検討を行った。その結果、961delT 変異は関連がないものの、1555A>G 変異は高感受性に関連していることが再確認された（Kobayashi et al., in press）。

4) 簡便なスクリーニング検査法による頻度調査：

難聴原因遺伝子の種類は数十から百種類程度と推測されているが、難聴の遺伝子検索のためには多数の遺伝子変異を同時に検出可能な

スクリーニング法が必要である。最近開発されたインベーター法を用いた簡便なスクリーニング法を用いて各遺伝子変異の頻度調査を行った結果、また GJB2 遺伝子、SLC26A4(PDS)遺伝子、ミトコンドリア 1555 変異が高頻度で見いだされた。従ってこの3種類の遺伝子が日本人難聴患者の原因遺伝子として最も重要であることが明らかになった。

5) 難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成

遺伝子診断が日常診療で一般化されるにつれ、それに伴う遺伝カウンセリングの充実が求められている。現状では遺伝子検査が先行してしまっているために臨床現場で種々の問題が生じ始めている。信州大学医学部附属病院では全国に先駆け「遺伝子診療部」が設けられ、各臨床科と連携して遺伝子診療に取り組んでいる。本研究では難聴に関連した最新の遺伝子情報を適切に医療の場で生かすために、難聴の遺伝カウンセリングのガイドラインの作成、遺伝相談のシステム、ネットワーク整備、啓蒙活動などを行った。遺伝子診断の確定した家系に対して遺伝カウンセリングを行い症例を重ね、本研究での遺伝子解析および遺伝カウンセリングの実績をもとに難聴遺伝子ごとにカウンセリングに必要な事項をまとめた (宇佐美:「遺伝カウンセリングマニュアル; 各論3.耳鼻咽喉科疾患」福嶋義光編)。

E. 結論

本研究によって明らかになった日本人における難聴遺伝子データベースは今後我が国で効率的に遺伝子検索や遺伝子診断を行っていく

上で重要なデータになると思われた。また本研究によって確立された難聴の遺伝カウンセリングのマニュアル、遺伝相談システムのモデルは今後の難聴遺伝カウンセリングのモデルになると思われる。

F. 研究発表

論文発表

[1] Asamura K, Abe S, Imamura Y, Aszoli A, Suzuki N, Hashimoto S, Takumi Y, Hayashi T, Fässler R, Nakamura Y, Usami S, Type IX Collagen is crucial for normal hearing, *Neuroscience* (in press).

[2] Suzuki N, Asamura K, Kikuchi Y, Takumi Y, Abe S, Imamura Y, Hayashi T, Aszoli A, Fässler R, Usami S, Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss, *Neuroscience Research* (in press).

[3] Oguchi T, Ohtsuka A, Hashimoto S, Oshima A, Abe S, Kobayashi Y, Nagai K, Matsunaga T, Iwasaki S, Nakagawa T, Usami S, Clinical features of patients with GJB2 (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns *J Hum Genet* (in press).

[4] Asamura K, Abe S, Fukuoka H, Nakamura Y, Usami S, Mutation analysis of COL9A3, a gene highly expressed in the cochlea, in hearing loss patients, *ANL* (in press).

- [5] Kobayashi K, Oguchi T, Asamura K, Miyagawa M, Horai S, Abe S, Usami S, Genetic features, clinical phenotypes, and prevalence of sensorineural hearing loss associated with the 961delT mitochondrial mutation, ANL (in press).
- [6] Abe S, Katagiri T, Saito-Hisaminato A, Usami S, Inoue Y, Tsunoda T, Nakamura Y. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet* 2003;72(1):73-82.
- [7] Abe S, Usami S, Nakamura Y. Mutations in the gene encoding KIAA1199 protein, an inner-ear protein expressed in Deiters' cells and the fibrocytes, as the cause of nonsyndromic hearing loss. *J Hum Genet* 2003;48(11):564-70.
- [8] Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, Van Camp G, Usami S. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 2003;112(4):329-33.
- [9] Park HJ, Shaikat S, Liu XZ, Hahn SH, Naz S, Ghosh M, Kim HN, Moon SK, Abe S, Tsukamoto K, Riazuddin S, Kabra M, Erdenetungalag R, Radnaabazar J, Khan S, Pandya A, Usami SI, Nance WE, Wilcox ER, Griffith AJ. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet* 2003;40(4):242-8.
- [10] Usami S, Takahashi K, Yuge I, Ohtsuka A, Namba A, Abe S, Fransen E, Patthy L, Otting G, Van Camp G. Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet* 2003;11(10):744-8.
- [11] Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami S. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur J Hum Genet* 2003;11(12):916-22.
- [12] 宇佐美真一：「遺伝カウンセリングマニュアル；各論 3.耳鼻咽喉科疾患」福嶋義光編、南江堂、p112-120, 2003.
- [13] 宇佐美真一：アミノ配糖体抗生物質による難聴 update—遺伝子学的アプローチ、耳喉頭頸 2003;75:101-105.

2. 学会発表

- [1] Usami S, OhTsuka A, Tsukamoto K, Yuge I, The genetic epidemiology of deafness genes and clinical application, CORLAS meeting, Helsinki, Finland. August 24-27, 2003.

[2] Usami S, Ohshima A, Takumi Y, Abe S, Non-syndromic hearing loss caused by *CRYM* mutations, 5th Molecular Biology of Hearing and Deafness. Bethesda, USA. Sept 30- Oct 3, 2004.

[3] 日本人難聴家系に見出された COL9A3 遺伝子変異： 浅村賢二、工穰、福岡久邦、橋本繁成、阿部 聡子、宇佐美 真一（平成 15 年 10 月 日本耳科学会）

[4] 当科難聴外来における遺伝カウンセリングについて、工 穰、大塚明弘、浅村賢二、大島 章、原田大輔、鈴木宏明、宇佐美真一（平成 16 年 10 月 日本聴覚医学会）

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究（感覚器障害研究）
研究成果発表会（一般向け）

難聴と遺伝

日時：平成17年3月26日（土）
15:00~17:00 入場無料

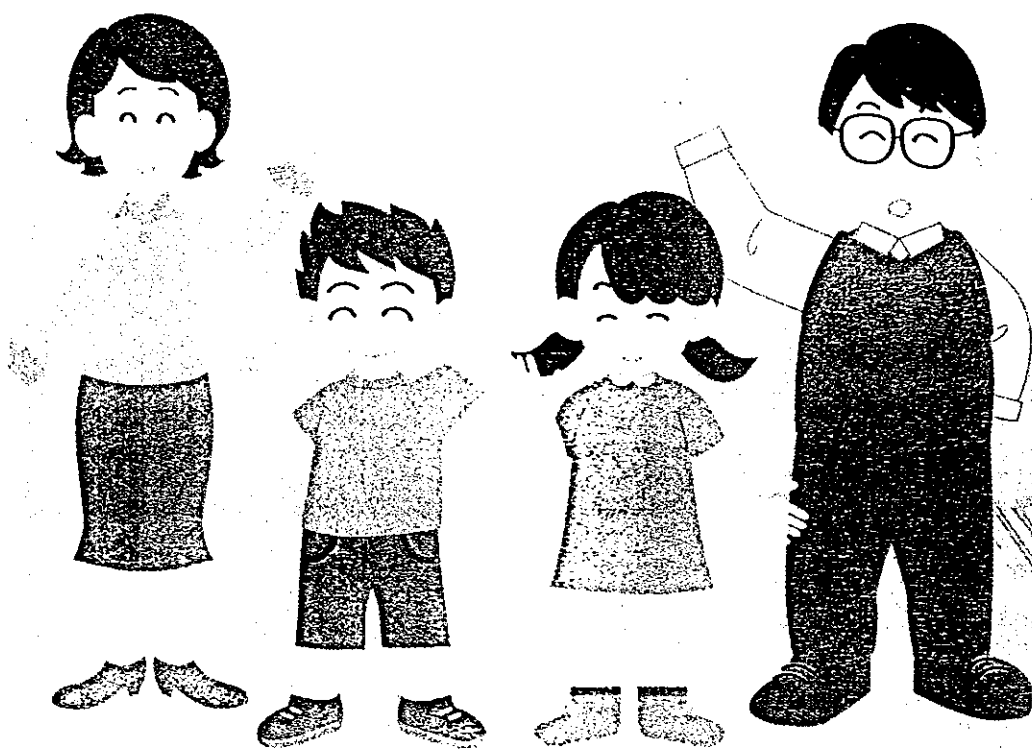
場所：信州大学医学部附属病院
東病棟9階会議室

講師：宇佐美 真一
(信州大学医学部耳鼻咽喉科学講座 教授)
福嶋 義光
(信州大学医学部社会予防医学講座 教授)
(信州大学医学部附属病院遺伝子診療部 部長)

主催：長寿科学振興財団

〈お問い合わせ〉 信州大学医学部耳鼻咽喉科学講座
TEL 0263-37-2666

難聴と遺伝



宇佐美 真一

(信州大学医学部耳鼻咽喉科学講座 教授)

福嶋 義光

(信州大学医学部社会予防医学講座 教授)

(信州大学医学部附属病院遺伝子診療部 部長)

難聴とは



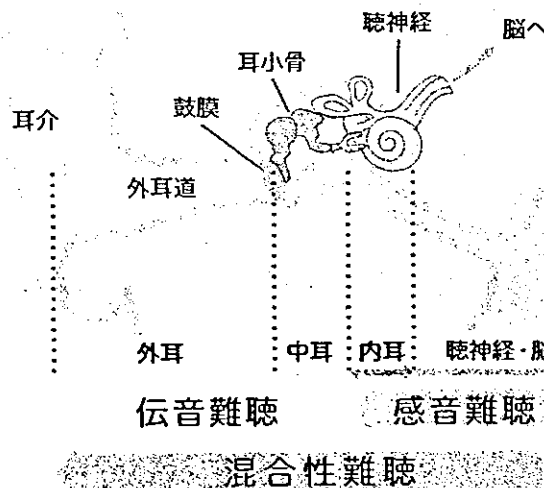
難聴とひとくちに言っても

耳から入った音は、外耳から中耳、内耳を経て、聴神経を通り、脳に伝えられます。この経路のどこに障害が起こっても、音や声がきこえにくくなる難聴が起ります。難聴には、大きく分けて、音を伝える部分に障害がある「伝音難聴」、音を感じる部分に障害がある「感音難聴」、ふたつが合わさった「混合性難聴」があります。またひとくちに難聴と言っても、程度には差がありますし、高い（あるいは低い）音から聞こえなくなるものなど多くの種類があります。また、きこえが悪くなるだけでなく、耳鳴りを伴うもの、めまいを伴うものなど、原因によって症状はさまざまです。

難聴の種類と主な原因

伝音難聴

- 耳あかや異物による外耳道閉塞
- 滲出性中耳炎
- 慢性中耳炎
- 真珠腫性中耳炎などによる鼓膜や耳小骨の障害など



感音難聴

- 遺伝性難聴
- 老人性難聴
- 突発性難聴
- メニエール病
- 薬物性難聴
- 聴神経腫瘍など

難聴の程度と聴力

正常 (~30dB)



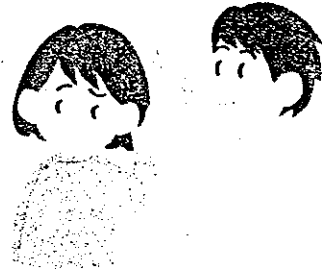
●小さな声でも聞こえる

軽度 (30~50dB未満)



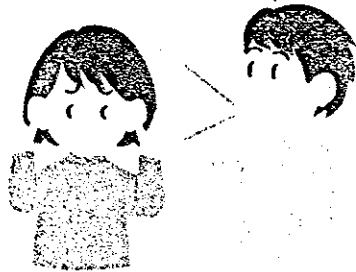
●小さな声やささやき声が聞こえにくい

中等度 (50~70dB未満)



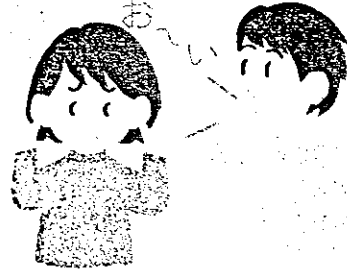
●普通の会話が聞こえにくい

高度 (70~90dB未満)



●大きな声でも聞こえにくい

重度 (聾) (90dB~)



●耳元での大きな声も聞こえにくい

●日常の音声はほとんど聞こえない

さまざまな難聴

- 耳がつまったような感じ
- 膜を通して聞いているような感じ



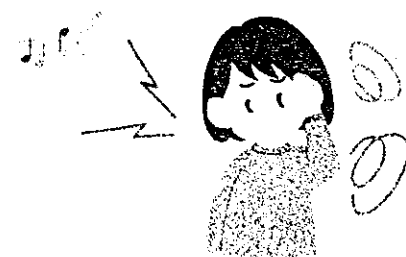
●耳鳴りがする



- 高い(低い)音から聞こえなくなる



- 目の痛み
- 耳漏(耳だれ)
- めまいなどを伴う



難聴の原因を調べるためにどんな検査をするんですか？

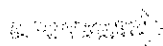
聴力を調べるさまざまな聴力検査のほか、CTやMRI撮影などが行われます。また最近の医学の進歩によって遺伝子の面からも難聴が分かってきましたので、原因を調べたり治療を選択する時の参考にするために遺伝子検査を勧める場合があります。

難聴って遺伝するの？

遺伝というと病気が遺伝するようなイメージを持つかも知れませんが、少し意味合いが異なります。現在では、高血圧、糖尿病、アレルギーといったほとんどの病気で遺伝子が関係していると言われてるように、遺伝子と関係する病気は決してめずらしいものではなく、むしろ一般的な病気のほとんどに遺伝子が関係していると考えられています。生まれつき難聴のお子さんは出生1000人あたり1人いると言われ、他の先天性の病気に比べても頻度が多いことが明らかになってきました。しかもそのうちの半分は遺伝子が関係すると言われていています。また老人性難聴など後天性の難聴でも個人差が大きく難聴になりやすい体質（遺伝子）が関係していると言われていています。したがって難聴の原因を明らかにし、その後の適切な治療法を考えるためには、遺伝子を調べるのが非常に重要になってきました。



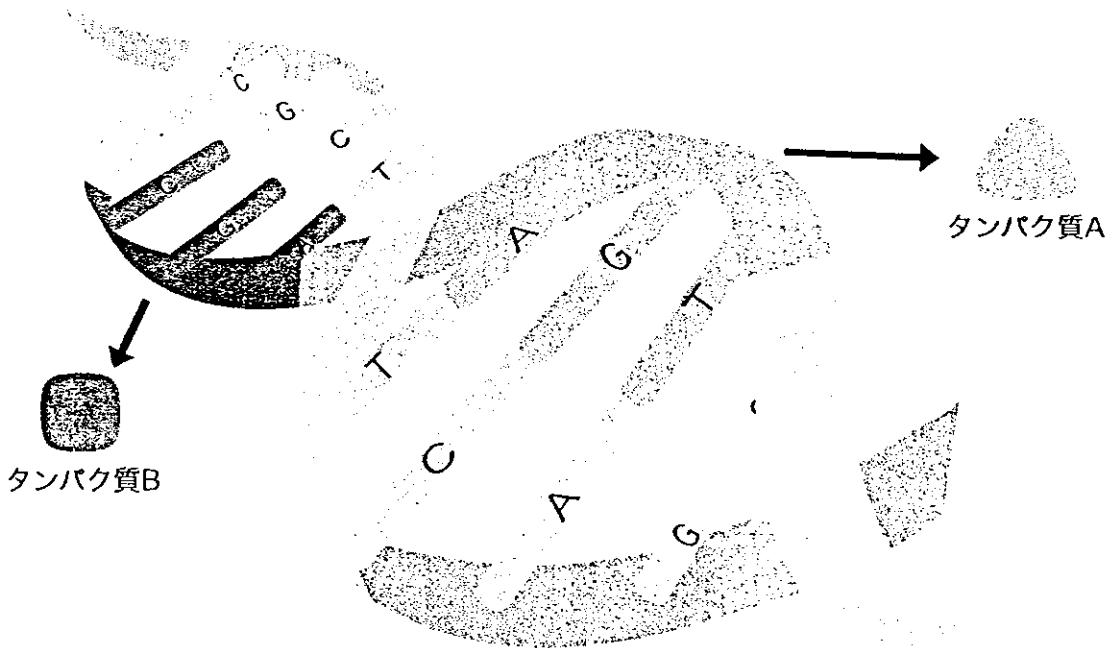
難聴の原因が科学的に解明される



予後や合併症の推測、治療法の選択、予防が可能になる

遺伝子って？

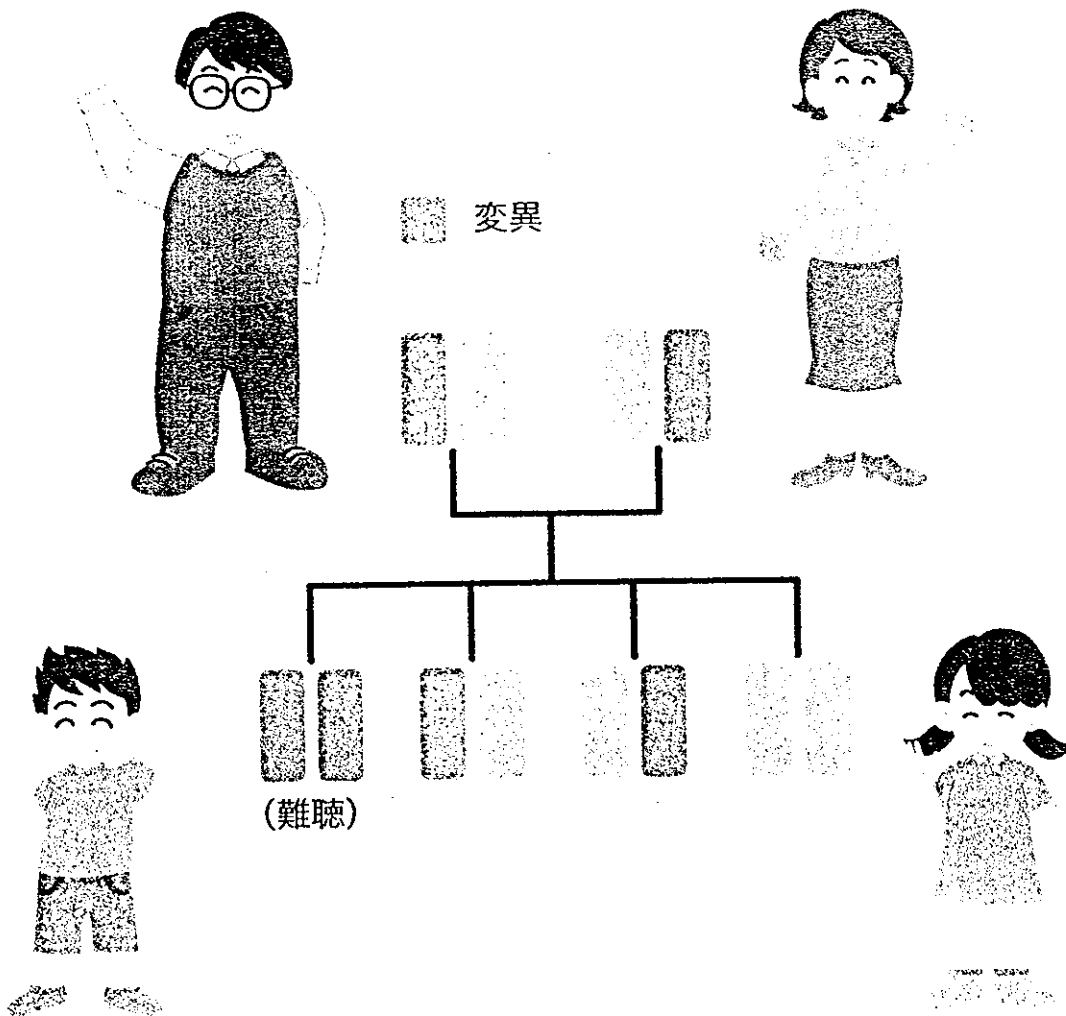
遺伝子というのは生物の体を作る「設計図」にたとえられています。父親と母親から受け継がれた遺伝子（設計図）にもとづいて体の細胞が作られます。遺伝子の種類は3万とも4万とも言われていますが、そのうちだれでも数個の遺伝子に違い（変異）を持っています。ですから、ある一定の割合で高血圧、糖尿病、アレルギーといった病気になったり、あるいはなりやすくなったりするのです。難聴に関連する遺伝子は100種類前後とされていますが、その遺伝子にたまたま変異があると難聴になったり、あるいはなりやすくなったりすることが分かってきました。



遺伝子の情報（設計図）により、いろいろなタンパク質がつくられる。

両親に難聴がなくても遺伝子に関係しているのですか？

遺伝子に関係している難聴の約70%は劣性遺伝形式で遺伝します。人間はだれでも一対（片方は父親由来、もう片方は母親由来）の遺伝子を持っています。劣性遺伝の場合、変異を持った遺伝子を2つ持ったときにはじめて難聴になりますが、1つの遺伝子に変異があってもその人は難聴にはなりません。例えば両親が1つずつ持っている場合には両親には難聴はありませんが、子供は父親と母親から1つずつ遺伝子を受け継ぐことになり、すから1/4の確率で変異を持った遺伝子を2つ持つ可能性があり、そのような場合は難聴になります。ですから、両親に難聴がなくても遺伝子に関係している難聴の子が生まれますし、むしろそのようなケースの方が多いということが分かっています。

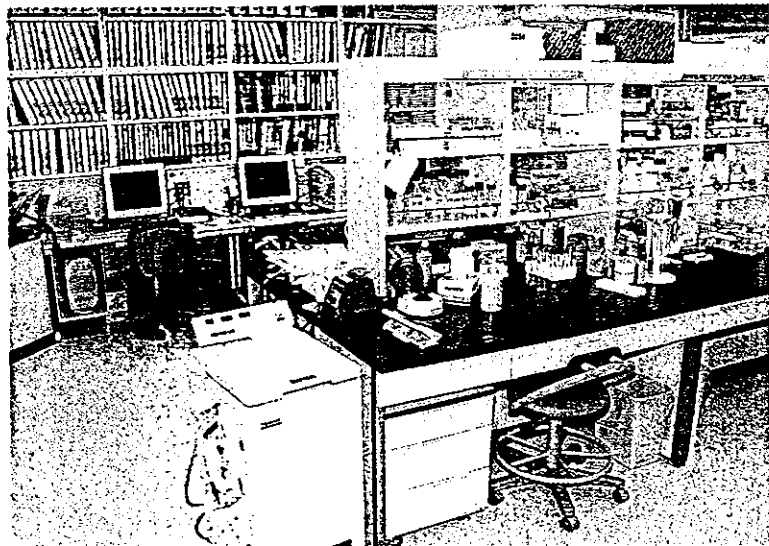


遺伝子検査って？

先天性の難聴のうち約半数は直接遺伝子に関係していると言われていいますので、難聴の正確な診断には遺伝子検査が欠かせないものになりつつあります。原因遺伝子の種類によって難聴の程度、進行するかどうか、めまいや他の体の症状が出て来るかどうか、などの予測がある程度可能になります。またこれらの情報にもとづいて適切な治療や予防について話し合うことも可能になります。またそれぞれの家族で正確な遺伝情報にもとづく遺伝カウンセリングも可能になります。ただし難聴をおこす遺伝子のすべてが明らかになった訳ではないので、検査をしても必ずしも現時点では原因が分からないこともあります。しかし医学は急速に進歩しているので、何年かして結果が明らかになることもあります。このようにメリットの多い検査ではありますが、もちろん検査をするかしないかはご本人に決定していただくことを原則としています。遺伝子は血液から採取するので、通常の採血のみで済みます。

遺伝子検査ってどこで受けられるの？

難聴の遺伝子検査は残念ながらまだ一般的な検査ではありません。信州大学医学部附属病院耳鼻咽喉科では希望する患者さんの相談にのっておりますのでご相談下さい。



遺伝子検査室

でも遺伝っていうと漠然とした不安があります

そうは言ってもまだ漠然とした不安や悩みがあるかもしれません。それに対して適切な助言を行うのが臨床遺伝の専門医です。信州大学医学部附属病院では、臨床遺伝の専門医が耳鼻咽喉科専門医といっしょに適切なアドバイスが出来るような体制を整えておりますのでご希望の方は遠慮なくご相談下さい。



ご相談ください。

守秘義務（プライバシー）を守ります
遺伝や遺伝病にまつわる不安や悩みの中には、他人に知られたくない事項が含まれていることがあります。ご本人・ご家族の相談内容やプライバシーは厳重に守りますので、安心してご相談ください。

問い合わせ先

信州大学医学部耳鼻咽喉科

390-8621 松本市旭3-1-1

Tel:0263-37-2666

Fax:0263-36-9164

e-mail: i-jibi@hsp.md.shinshu-u.ac.jp

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki N, Asamura K, Kikuchi Y, Takumi Y, Abe S, Imamura Y, Hayashi T, Aszodi A, Fassler R, Usami S	Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss	<i>Neurosci Res</i>	51(3)	293-8	2005
Asamura K, Abe S, Fukuoka H, Nakamura Y, Usami S	Mutation analysis of COL9A3, a gene highly expressed in the cochlea, in hearing loss patients	<i>Auris Nasus Larynx</i>	In press		2005
Kobayashi K, Oguchi T, Asamura K, Miyagawa M, Horai S, Abe S, Usami S	Genetic features, clinical phenotypes, and prevalence of sensorineural hearing loss associated with the 961delT mitochondrial mutation	<i>Auris Nasus Larynx</i>	In press		2005
Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Goto Y, Usami S	Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside	<i>Ann Otol Rhinol Laryngol</i>	114(2)	153-60	2005
Asamura K, Abe S, Imamura Y, Aszodi A, Suzuki N, Hashimoto S, Takumi Y, Hayashi T, Fassler R, Nakamura Y, Usami S	Type IX collagen is crucial for normal hearing	<i>Neuroscience</i>	132(2)	493-500	2005
Oguchi T, Ohtsuka A, Hashimoto S, Oshima A, Abe S, Kobayashi Y, Nagai K, Matsunaga T, Iwasaki S, Nakagawa T, Usami S	Clinical features of patients with GJB2 (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns	<i>J Hum Genet</i>	50(2)	76-83	2005
Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Ohtsuka A, Asamura K, Usami S	Deafness due to A1555G mitochondrial mutation without use of aminoglycoside	<i>Laryngoscope</i>	114(6)	1085-91	2004

Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss

Nobuyoshi Suzuki^a, Kenji Asamura^a, Yasutake Kikuchi^a, Yutaka Takumi^a,
Satoko Abe^b, Yasutada Imamura^c, Toshihiko Hayashi^c, Attila Aszodi^d,
Reinhard Fässler^d, Shin-ichi Usami^{a,*}

^aDepartment of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan

^bLaboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo,
4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

^cDepartment of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 153-8902, Japan

^dMax Plank Institut für Biochemie, Department of Molecular Medicine, 85152 Martinsried, Germany

Received 29 October 2004; accepted 2 December 2004

Available online 8 January 2005

Abstract

Type IX collagen is one of the important components, together with type II, V, and XI collagens, in the tectorial membrane of the organ of Corti. To confirm the significance of type IX collagen for normal hearing, we assessed the detailed morphological and electrophysiological features of type IX collagen knock-out mice, which have recently been reported as a deafness model. Through assessment by auditory brainstem response (ABR), knock-out mice were shown to have progressive hearing loss. At the light microscopic level, the tectorial membrane of knock-out mice was found to be abnormal in shape. These morphological changes started in the basal turn and were progressive toward the apical turn. Electron microscopy confirmed disturbance of organization of the collagen fibrils. These results suggest that mutations in type IX collagen genes may lead to abnormal integrity of collagen fibers in the tectorial membrane.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

Keywords: Type IX collagen; Type II collagen; Knock-out mouse; Progressive hearing loss; Tectorial membrane; Morphological change

1. Introduction

Type II and IX collagens are known to be distributed in various organs, including cartilage, the vitreous and the inner ear (Brewton and Mayne, 1994; Ricard-Blum et al., 2000). There has been growing evidence that various collagens in the inner ear are essential to maintain normal hearing. Especially, these molecules are important components of the tectorial membrane, which covers the sensory epithelium of the organ of Corti. The mammalian tectorial membrane is composed of at least four collagens, including types II, V, IX, and XI, and the non-collagenous glycoproteins alpha-tectorin, beta-tectorin, and otogelin (Slepecky et al., 1992a, 1992b, 1992c; Cohen-Salmon et al., 1997; Goodyear and Richardson, 2002). Mutations in the genes encoding these molecules localized in the tectorial

membrane have been reported to cause syndromic as well as non-syndromic hearing loss (Vikkula et al., 1995; Richards et al., 1996; Williams et al., 1996; Verhoeven et al., 1997; McGuirt et al., 1999; Mustapha et al., 1999; Griffith et al., 2000).

To elucidate the precise role of these molecules and speculate the possible morphological and electrophysiological changes that may occur in the human inner ear, targeted disruption of the corresponding gene is an informative strategy to study the genetic disease. This strategy has been successfully applied to deafness caused by the above-mentioned genes, such as *coll1a2*-mutant mice (Mcguirt et al., 1999), *tecta*-mutant mice (Legan et al., 2000) and the *otog*-mutant mice (Simmler et al., 2000).

Recently we have shown that the homozygous type IX collagen knock-out mice show hearing loss, and are associated with abnormal shape of the tectorial membrane, in which organization of the collagen fibrils is disturbed (Asamura et al., submitted for publication). Consequent

* Corresponding author. Tel.: +81 263 37 2666; fax: +81 263 36 9164.
E-mail address: usami@hsp.md.shinshu-u.ac.jp (S.-i. Usami).

mutation screening demonstrated that possible disease-causing mutations in the *col9a3* gene were found in recessive as well as dominant non-syndromic progressive hearing loss families (Asamura et al., in press). These patients showed a moderate, all frequency involved, progressive, bilateral sensorineural hearing impairment. To explore the mechanisms of the progressive nature and predominant high frequency involvement found in the patients, the detailed morphological as well as physiological features of type IX collagen knock-out mice were examined.

2. Methods

2.1. Animals

Type IX collagen knock-out mice were created by targeted disruption of the *col9a1* gene as described by Fassler et al. (1994). In mice with an inactivated *col9a1* gene, *col9a2* and *col9a3* polypeptides are not expressed, even though the mRNAs for both *col9a* subunits are transcribed in the normal fashion (Hagg et al., 1997). *Col9a1* null mice are consequently considered to be collagen IX functional knock-out mice (Hagg et al., 1997). We recently demonstrated that the homozygous type IX collagen knock-out mice have hearing loss and are associated with abnormal shape and disturbed organization of the collagen fibrils of the tectorial membrane (Asamura et al., 2004). All animal handling procedures were in accordance with a protocol approved by the Ethics Committee of Shinshu University School of Medicine.

2.2. Auditory testing

Fifteen homozygous type IX collagen knock-out mice at 1, 3, and 6 months ($n = 5$ each) and 15 wild type mice of C57B6 strain at the same ages ($n = 5$ each) were evaluated by auditory brainstem response (ABR). The animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) by intraperitoneal injection and the ABR tests were performed with a heating pad to maintain the body temperature in a soundproof room. Two different sound stimuli, click and tone burst, were performed at synthesized durations and specified amplitudes using a digital signal-processing platform (Tucker-Davis Technologies, FL, USA), and analyzed with PowerLab[®] systems (ADInstruments, Australia). Click stimuli were 0.1 ms clicks, composed of a square pulse of 0.1 ms duration. Duration of tone burst stimuli was 3.0 ms (1 ms each for rise, plateau and decay) and the center frequencies were 8, 16, 32 kHz. Stainless steel needle electrodes were placed at the vertex and ventrolateral to the left and right ears for the recording and a tweeter modified with a coupler was inserted into the external canal to deliver acoustic stimuli. ABR waveforms were recorded in 5–10 dB intervals down from a maximum amplitude of 85 dB until no waveform could be visualized.

2.3. Morphological analysis

For morphological analysis, 1 ml of fixative consisting of 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) was injected into the middle ear of deeply anesthetized animals, which were then immediately perfused transcardially with the same fixative for 15 min. Cochlear tissues were post-fixed with the same fixative for 4 h, and decalcified in 0.12 M EDTA for 3 days. Then these tissues were treated with OsO_4 (in 0.1 M PBS, pH 7.4), dehydrated in graded ethanols and propylene oxide, and embedded in Durcupan (Fluka, Germany). For light microscopy, semithin sections were stained with toluidine blue. Linear measures of the height and the width of the tectorial membrane were taken according to Keiler and Richter (2001). For electron microscopy, ultrathin sections were post-stained with 1.0% uranyl acetate (10 min) and 0.3% lead citrate (5 min), and viewed on a JEOL-1200CX TEM.

3. Results

3.1. Auditory testing

Fig. 1 shows the ABR thresholds for 1-month-old wild mice and the homozygous type IX collagen knock-out mice using click and tone burst stimuli. Hearing loss in the homozygous type IX collagen knock-out mice was significant already at 1 month across all frequencies when compared to wild mice. ABR thresholds for 1-month-old wild mice were 38.0 dB (S.D. = 0) (click stimuli), 31.0 dB (S.D. = 0) (8 kHz tone burst stimuli), 35.1 dB (S.D. = 8.73) (16 kHz tone burst stimuli), and 45.5 dB (S.D. = 4.83) (32 kHz tone burst stimuli). In contrast, ABR thresholds for the homozygous type IX collagen knock-out mice were 69.7 dB (S.D. = 8.7) (click stimuli), 57.7 dB (S.D. = 7.83) (8 kHz tone burst stimuli), 80.0 dB (S.D. = 0) (16 kHz tone

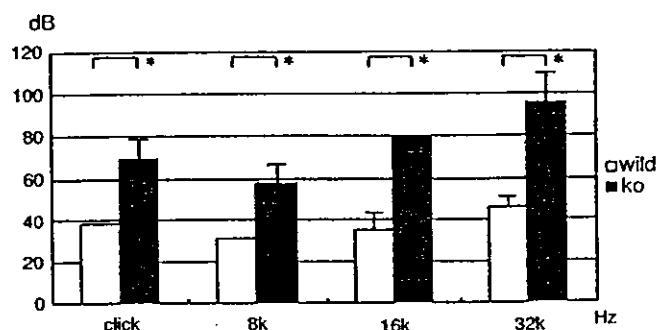


Fig. 1. ABR thresholds for 1-month-old wild and homozygous type IX collagen knock-out mice. Mice were tested using click and tone burst stimuli (8, 16, 32 kHz). ABR thresholds for knock-out mice were significantly high compared to wild mice. Graphed values are mean threshold shift \pm S.D. * $P < 0.01$ (Mann-Whitney). Note that hearing impairment is significant in all frequencies.