

表1 網羅的解析法の対象としたミトコンドリア病の主要な28変異

	塩基番号	塩基置換	遺伝子	報告されている代表的な臨床型
1	1555	A>G	12S rRNA	アミノグリコシド感受性難聴
2	1606	G>A	tRNA Val	失調・ミオクローヌスを伴う難聴
3	3243	A>G	tRNA Leu (UUR)	MELAS、糖尿病、難聴を伴う糖尿病、慢性進行性外眼筋麻痺、ミオパチー
4	3254	C>T	tRNA Leu (UUR)	慢性進行性外眼筋麻痺
5	3255	G>A	tRNA Leu (UUR)	MERRF (赤色ポロ線維を伴うミオクローヌスてんかん)とカーンズ・セイア症候群の重複
6	3256	C>T	tRNA Leu (UUR)	MELAS (脳卒中様症状と高乳酸血症を伴うミトコンドリア脳筋症)
7	3260	A>G	tRNA Leu (UUR)	ミオパチー
8	3271	T>C	tRNA Leu (UUR)	MELAS、糖尿病
9	3280	A>G	tRNA Leu (UUR)	ミオパチー
10	3291	T>C	tRNA Leu (UUR)	MELAS
11	3302	A>G	tRNA Leu (UUR)	ミオパチー
12	3303	C>T	tRNA Leu (UUR)	ミオパチー
13	3460	G>A	ND1	レーベル遺伝性視神経萎縮症
14	8344	A>G	tRNA Lys	MERRF
15	8348	A>G	tRNA Lys	心筋症
16	8356	T>C	tRNA Lys	MERRF
17	8363	G>A	tRNA Lys	MERRF、難聴を伴う心筋症、自閉症
18	9176	T>C	ATP6	遺伝性両側性線条体壊死、Leigh 脳症
19	11777	C>A	ND4	Leigh 脳症
20	11778	G>A	ND4	レーベル遺伝性視神経萎縮症
21	12315	G>A	tRNA Leu (CUN)	慢性進行性外眼筋麻痺
22	12706	T>C	ND5	Leigh 脳症
23	13513	G>A	ND5	MELAS、Leigh 脳症
24	13514	A>G	ND5	MELAS
25	14459	G>A	ND6	ジストニアを伴う LHON、Leigh 脳症
26	14482	C>G	ND6	レーベル遺伝性視神経萎縮症
27	14487	T>C	ND6	ジストニア、Leigh 脳症
28	15498	G>A	CYB	心筋症

表2 373 症例の解析にて検出されたミトコンドリア遺伝子変異

ミトコンドリア DNA 変異	例数
1555A>G	11
3243A>G	10
8348A>G	1
11778G>A	1
15498G>A	1

表3 3243A>G 変異陽性の難聴例における合併疾患

症例番号	MELAS の診断	糖尿病	腎障害	家族の難聴の既往
18	-	+	-	-
22	-	-	-	-
26	-	+	+	-
27	-	-	+	+
49	-	-	-	+
169				
219				
268	-	+	-	-
325				
583	-	-	+	+

## 加齢に伴う進行性感音難聴におけるミトコンドリア機能の影響

分担研究者：山嵜 達也（東京大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：染谷 慎一（東京大学農学部田之倉研究室）

### 研究要旨

DBA/2J マウスにおいて加齢に伴う難聴の発現とそれに関与する遺伝子発現変化について検討した。2カ月齢では軽度～中等度の閾値上昇のみ見られたが、8カ月齢では全例聾となり、8カ月齢では有毛細胞、ラセン神経節細胞ともに高度に変性していた。蝸牛の遺伝子発現では2カ月齢に比べて8カ月齢では2,224の遺伝子が発現低下し、1,928の遺伝子が発現亢進し、特にミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関与する遺伝子の発現低下が顕著であった。呼吸鎖複合体I～Vを構成する遺伝子の中では31の遺伝子の発現が低下しており、このうち各呼吸鎖複合体から一つ遺伝子を選んで定量的RT-PCRを行ったところ、DNAマイクロアレイの結果が確認された。この結果は、DBA/2Jマウスの加齢に伴う難聴の発現において、ミトコンドリア機能およびエネルギー代謝に関する遺伝子発現の著しい低下が関与することを示唆している。

### 研究目的

進行性感音難聴の代表に老人性難聴が挙げられる。老人性難聴の発症に影響を与える因子として、騒音曝露、喫煙、飲酒、環境化学物質曝露、糖尿病・循環器疾患等の合併、食事、性ホルモン、遺伝的要因などが挙げられているが、老人性難聴の発症機序に関する基礎的な研究報告は少ない。加齢に伴う老化現象の一般的な発症機序について、現在、フリーラジカル過剰産生による酸化ストレスとこれに伴うミトコンドリアDNAの損傷集積が主に考えられている。本研究では加齢性難聴の蝸牛においてミトコンドリア機能がどのように変化するか、またその他の遺伝子群の発現にもどのような変化が起きているのかを検討した。

### 研究方法

DBA/2Jマウスを用いて蝸牛内の遺伝子発現が加齢に伴う難聴進行によりどのように変化するかを検討した。このマウスは進行性に感音難聴を呈するため老人性難聴のモデルとして用いられているが、最近の研究ではstereociliaで重要な働きをするcadherinタンパクをコードする遺伝子Cdh23に変異を持つことが示されている。このマウスの聴力（4、8、16kHz）を聴性脳幹反応（auditory brain stem response, ABR）を用いて2カ月齢と8カ月齢で計測し、その後断頭して蝸牛を摘出し、組織学的および遺伝子発現の検討を行った。組織は4% paraformaldehydeにて固定後、10%EDTAで脱灰し、エポキシに包埋して切片を作成

し、トルイジンブルーで染色した。遺伝子発現の変化についてはDNAマイクロアレイを用い、さらに代表的遺伝子について定量的RT-PCRを行った。

## 研究結果

ABRの計測結果では、2カ月齢では軽度～中等度の閾値上昇のみ見られたが、8カ月齢では全例無反応であり、この期間に難聴が進行して聾となることが判明した(図1)。蝸牛の組織学的検討では、2カ月齢では有毛細胞およびラセン神経節細胞はほぼ正常か軽度の変性にとどまっていた。一方、8カ月齢では有毛細胞、ラセン神経節細胞ともに高度に変性していた(図2)。蝸牛の遺伝子発現の変化についてDNAマイクロアレイを用いて評価したところ、2カ月齢に比べて8カ月齢では2,224の遺伝子が発現低下し、1,928の遺伝子の発現が亢進していた。特にミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関与する遺伝子の発現低下が顕著であった。例えばミトコンドリア機能に関するカテゴリーでは、mitochondrion、mitochondrial inner membrane、mitochondrial electron transport chain、oxidative phosphorylation、respiratory chain complex I、IV、Vなど15のカテゴリーで遺伝子発現が低下しており、このうち9つのカテゴリーがミトコンドリア呼吸鎖に関与するカテゴリーに属していた。またこのカテゴリー全体では851ある遺伝子のうち、360の遺伝子が発現低下していた。呼吸鎖複合体I~Vを構成する遺伝子の中では31の遺伝子の発現が低下しており、このうち各呼吸鎖複合

体から一つ遺伝子(*Ndufa1*、*Sdhc*、*Uqcrb*、*Cox7a1*、*Atp5k*)を選んで定量的RT-PCRを行ったところ、DNAマイクロアレイの結果と同様に、その発現低下が確認された(図3)。このほか、energy metabolismに関するカテゴリーでは101の遺伝子中35の遺伝子が、ATP (adenosine triphosphate) biosynthesis processに関するカテゴリーでは59遺伝子中32遺伝子が発現低下していた。聴力に関しては24の遺伝子中9の遺伝子(*Gjb6*、*Otog*、*Slc26a4*、*Tecta*など)が発現低下し、イオントランスポートについては201の遺伝子中22の遺伝子が発現低下していた。

## 考察

今回の結果から、DBA/2Jマウスの加齢に伴う難聴の発現において、ミトコンドリア機能およびエネルギー代謝に関する遺伝子発現の著しい低下が関与することが示唆された。

我々は以前ミトコンドリア遺伝子変異が加速的に蓄積するトランスジェニックマウス(POLG)を作成した。このPOLGマウスでは様々な老化関連症状を示す(Kujoth et al. Science 2005)が、聴力については9か月齢で中等度 ABR 閾値上昇を示し、組織学的にはコルチ器、ラセン神経節細胞の著明な変性とTUNEL陽性細胞の増加がみられている(Someya et al. Neurobiol Aging 2008)。一方、老人性難聴モデルであるC57BL/6マウスに26%のカロリー摂取制限(CR)を行ったところ、通常量の食事を与えた群(コントロール)では15か月齢までに中等度難

聴が生じ、有毛細胞・ラセン神経節の著明な変性が生じていたのに対し、同月齢のCR群では聴力は正常に保たれ、組織変化もごく軽度であった。DNAマイクロアレイによる検討では、4か月齢に比して15か月齢のコントロール群では聴覚、ミトコンドリア機能、神経伝達などに関与する遺伝子群の発現が低下し、アポトーシスなどに関与する遺伝子の発現が亢進していたが、15か月齢のCR群では聴覚・ミトコンドリア機能・神経伝達に関する遺伝子発現が維持されており、アポトーシスも抑制されていた。この結果は、CRによりミトコンドリア機能が維持できれば加齢に伴う難聴を予防できることを示唆している (Someya et al. *Neurobiol Aging* 2007)。

これらの結果を総合すると、蝸牛内では加齢に伴うミトコンドリア遺伝子変異の蓄積によりミトコンドリア機能が低下して細胞の生存維持に必要なエネルギーが低下、アポトーシスが誘導され、その結果聴覚に重要な有毛細胞、ラセン神経節細胞などが減少して老人性難聴が生じることが示唆される。

#### 図の説明

- 1) 2か月齢と8か月齢における ABR 閾値
- 2) 2か月齢と8か月齢における蝸牛組織所見
- 3) DNA マイクロアレイおよび定量的 RT-PCR における呼吸鎖複合体の蝸牛内の発現変化 (8か月齢/2か月齢の比)

図1

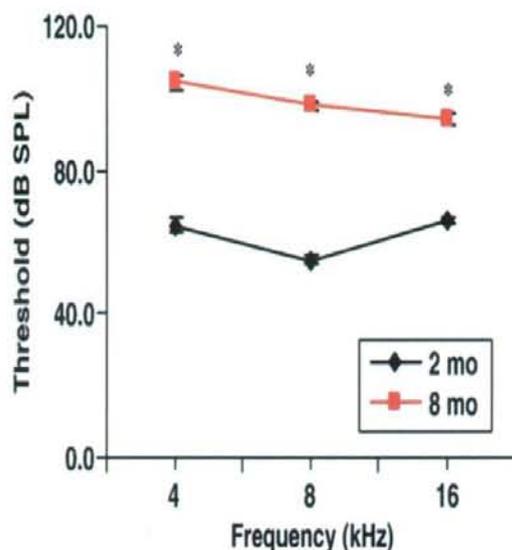


图 2

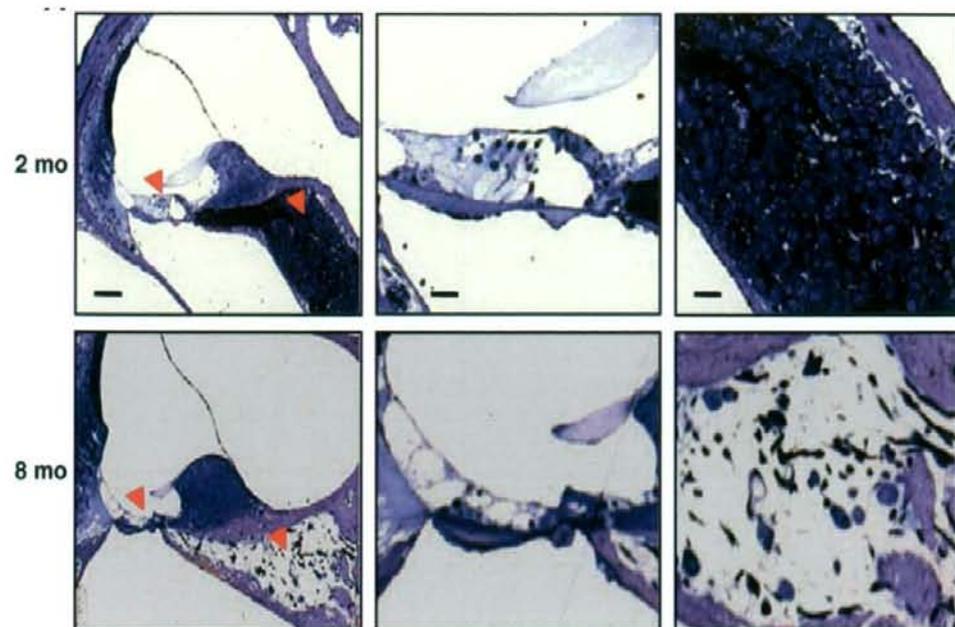
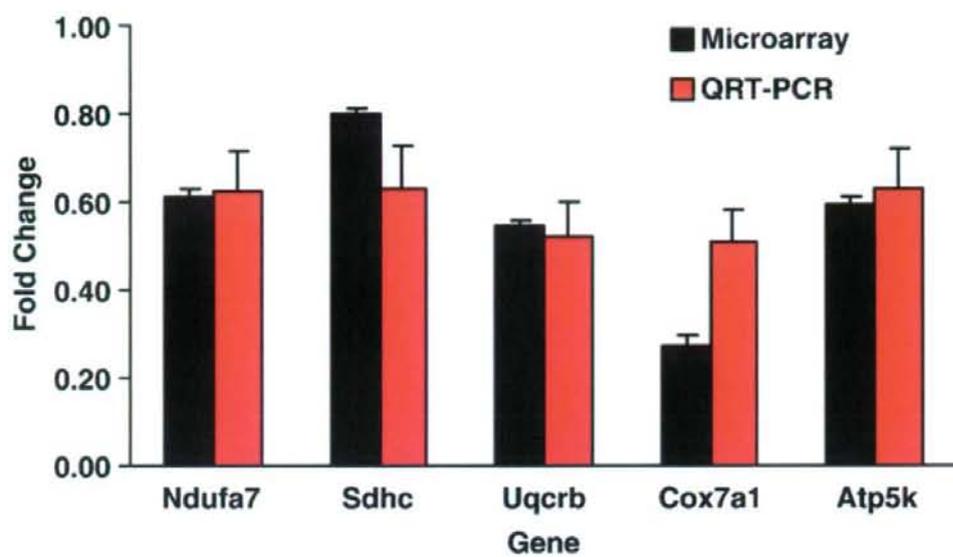


图 3



## 本邦における *USH2A* の遺伝子変異解析

- 分担研究者：水田 邦博 (浜松医科大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者：中西 啓 (浜松医科大学耳鼻咽喉科)  
共同研究者：岩 聡 (浜松赤十字病院耳鼻咽喉科)  
共同研究者：大坪 正史 (浜松医科大学光量子医学研究センター)  
共同研究者：養島 伸生 (浜松医科大学光量子医学研究センター)  
共同研究者：堀田 喜裕 (浜松医科大学眼科)

### 研究要旨

アッシュャー症候群の早期診断に有効な遺伝子診断システムの構築を目指し、臨床症状よりタイプ2と診断した7名の患者において、*USH2A* アイソフォームBの遺伝子解析を行った。5名の患者において10個の疾患原因変異を同定し、そのうち9個は新規の遺伝子変異であった。これより、本邦では欧米人とは全く異なる遺伝子変異によりアッシュャー症候群が発症していると思われる。

### 研究目的

アッシュャー症候群は、感音難聴に網膜色素変性症を合併する常染色体劣性遺伝性疾患である。現在までに、難聴に視覚障害を合併する疾患は約40種類知られているが、本疾患は其中で全患者数の約半数(5/10万人)を占める最多の疾患である。

アッシュャー症候群では、感音難聴が出現してから数年後に、網膜色素変性症の初発症状である夜盲が出現する。夜盲は、視力低下や視野障害などに比べ判然としない症状であるため患者は病識が乏しく、病院をなかなか受診せず網膜色素変性症の診断が遅れることが多い。さらに、本症は臨床症状と発症時期によりタイプ1-3の3つのタイプに分類されるが、それぞれのタイプにより難聴に対する治療が異なっている。タイプ1では、難聴が高度であり人工内耳埋込術が必要であ

ることが多いのに対し、タイプ2、3では、補聴器装用で十分であることが多い。難聴を主訴に医療機関を受診したときに、アッシュャー症候群の早期診断およびタイプ分類が可能であれば、視覚・聴覚に対して効果的な治療が可能と思われる。そこで、アッシュャー症候群の早期診断に有効な遺伝子診断システムの構築を目指し、本邦におけるアッシュャー症候群患者の遺伝子解析を行った。

### 研究方法

アッシュャー症候群は、症状の程度と発症時期により、タイプ1-3の3つのタイプに分類され、さらに、原因遺伝子座がマップまたはクローニングされたものはサブタイプとして分類されている。現在までに、タイプ1 B-

表1 疾患原因変異を同定することができた患者の臨床症状

Patient	Age	Sensorineural hearing loss (dB) <sup>1</sup>	Age realizing NB <sup>2</sup> (years)	Age diagnosed with RP <sup>3</sup> (years)	Caloric test
C152	47	60	14	26	Normal
C212	33	31.7	12	26	Normal
C332	31	58.3	17	30	Normal
C452	32	48.3	17	18	Normal
C712	24	68.3	13	21	Normal

<sup>1</sup> 3分法(良聴耳), <sup>2</sup> NB; night blindness, <sup>3</sup> RP; retinitis pigmentosa

表1 疾患原因変異を同定することができた患者の臨床症状

1H、タイプ2A、2C、2D、タイプ3A、3Bの12のサブタイプが知られており、そのうち9種については原因遺伝子が同定されている。欧米からの報告によると、3つのタイプの中で、タイプ2の頻度が最も高く、タイプ2の中では、タイプ2Aが74-90%を占めている。

そこで、最も患者の頻度が高いタイプ2の患者を対象として、タイプ2Aの原因遺伝子であるUSH2Aの遺伝子解析を行った。USH2AにはアイソフォームAとアイソフォームBの2種類のアイソフォームが知られているが、疾患の発症により重要であると考えられているアイソフォームBについて全エキソン1-73をPCRダイレクトシーケンス法にて遺伝子解析を行った。

(倫理面への配慮)

当研究は浜松医科大学「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会」にて審査・承認されている。

臨床症状よりタイプ2と診断した患者に対して、文書を用いて十分な説明を行い、インフォームド・コンセントを得たあと、検体として血液を採取し

た。解析を開始する前に検体は全て連結可能匿名化し、匿名化した符号と患者を結びつける対応表は個人情報担当管理者を設け別に保管した。実験操作は全て匿名化した符号を用いて行った。

#### 研究結果

臨床症状よりアッシャー症候群タイプ2と診断した7名の患者を対象として、USH2Aの遺伝子解析を行い、5名の患者で疾患原因変異を同定した。10個の疾患原因変異のうち、9個は新規の遺伝子変異であった。全ての変異は、USH2AアイソフォームBの全長に分布しており、明らかなホットスポットは認めなかった。

遺伝子変異を同定することが出来た5名の患者は、10歳代(平均±標準偏差:14.6±2.3歳)で夜盲を自覚し、その後、網膜色素変性症と診断されていた(24.2±4.7歳)(表1)。標準純音聴力検査にて、軽度から準高度の高音漸傾型の感音難聴を認めた。カロリックテストは、5名とも正常で、めまいの自覚等も認められなかった。

C212は、他の患者に比べ難聴が軽度であっ

た。この患者は、2つのミスセンス変異によりアッシュャー症候群を発症していたのに対し、他の患者では、ミスセンス変異+ミスセンス変異以外の変異（スプライシング変異、欠失）、またはミスセンス変異以外の変異の組み合わせ（スプライシング変異+スプライシング変異）により、アッシュャー症候群を発症していた。このことより、2つのミスセンス変異によりアッシュャー症候群が発症した際には、臨床症状が軽度になる可能性があると考えられた。

### 考 察

欧米では、*USH2A* の遺伝子解析が進んでおり、多くの遺伝子変異が同定されている。特に、c. 2299delG 変異の報告が多く、欧米人に特有の遺伝子変異であると考えられている。しかし、今回の我々が行った遺伝子解析では、c. 2299delG 変異はなく、10個の疾患原因変異のうち、9個は新規の遺伝子変異であった。これらのことより、本邦では欧米人とは全く異なる遺伝子変異によりアッシュャー症候群が発症している可能性が示唆された。

遺伝子変異を同定することができなかった2名の患者では、タイプ2Dの原因遺伝子である *USH2D* の遺伝子解析を行ったが、遺伝子変異を同定することは出来なかった。また、タイプ3の患者の中には、タイプ2と同じ臨床症状を示すことがあるため、タイプ3の原因遺伝子である *USH3A* の遺伝子解析も行ったが、遺伝子変異を同定することは出来なかった。今後、タイプ2Cの原因遺伝子である *USH2C* の遺伝子解析を行うとともに、リアルタイムPCRを行い広範囲の欠失の評価を行っていく予定である。

### 結 論

臨床症状よりアッシュャー症候群タイプ2と診断した7名の患者において、*USH2A* アイソフォームBの遺伝子解析を行い、5名の患者で疾患原因変異を同定した。10個の疾患原因変異のうち、9個は新規の遺伝子変異であり、本邦では欧米人とは全く異なる遺伝子変異によりアッシュャー症候群が発症している可能性が示唆された。

### 健康危険情報

なし

### 研究発表

なし

### 知的財産権の出願・登録情報

なし

## 特発性難聴患者における遺伝的背景について

分担研究者：宇佐美 真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：塚田 景大（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：鈴木 伸嘉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：鬼頭 良輔（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

共同研究者：西尾 信哉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

進行性の両側感音難聴は、原因不明の特発性難聴として扱われてきた。しかし、難聴の遺伝子検索の進歩によりその原因が遺伝子変異による遺伝性難聴であるものが少なからず含まれていることが明らかになってきた。今回我々は、両側感音難聴患者における進行性の有無およびその患者の遺伝形式を検討し遺伝的背景について検討した結果、全体では54%の患者が難聴の進行を自覚していた。遺伝形式ごとに検討した結果、常染色体優性遺伝形式または母系遺伝形式をとる症例に進行性難聴が多い傾向にあった。今回さらに、進行性を特徴とする遺伝性難聴について自検例を中心に検討を加えた。

### 研究目的

進行する両側性感音難聴のうち原因不明のものを特発性難聴と呼んでいるが、これらの中には、家族歴に血族結婚や難聴者が存在することが多く、遺伝的素因の関与が考えられてきた。実際に最近のヒトゲノム研究の進歩により、遺伝子変異によることが明らかな難聴は遺伝性難聴として特発性両側性感音難聴から除外され徐々に原因が解明されつつあるのが現状である。今回我々は、両側感音難聴患者における進行性および遺伝的背景について検討するとともに、進行性を示す遺伝性難聴について症例検討を行った。

### 研究方法

① 両側感音難聴患者 1343 例について問

診上での自覚的な進行性の有無について検討し、さらに家系的背景も踏まえて検討を加えた。

② 原因遺伝子ごとに進行性に関して自検例および過去の報告から検討を行った。

### 研究結果

60 歳以下の両側感音難聴患者のうち54%が難聴の進行を自覚しており、そのうち32%が常染色体優性遺伝または母系遺伝形式を示していた（図1）。難聴の発症年齢で検討すると、難聴の発症が10歳以上の症例では、その80%が進行を自覚していた。常染色体劣性遺伝／孤発例、常染色体優性遺伝／母系遺伝で進行性の有無を検討した場合、前者では47%に難

聴の進行を自覚したのに対して、後者では68%と高率に進行性を自覚しており常染色体優性遺伝形式または母系遺伝形式をとる難聴患者では進行する可能性が高い可能性が示唆された(図2)。

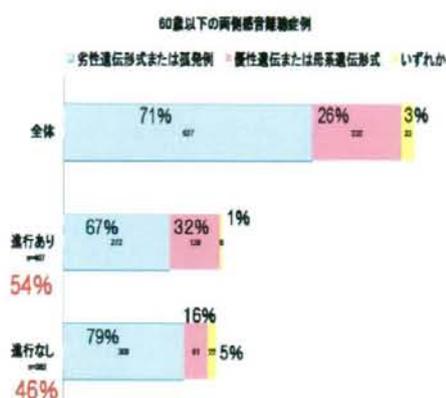


図1 感音難聴患者における進行性の有無と遺伝形式



図2 遺伝形式による進行性の有無

進行性を示す難聴原因遺伝子として常染色体優性遺伝を取る難聴の原因遺伝子では *KCNQ4*, *TECTA*, *COCH*, *WFS1*などが挙げられ、常染色体劣性遺伝を取る難聴の原因遺伝子では *CDH23*や *SLC26A4*が挙げられた。*KCNQ4*の高音障害型難聴や *TECTA*の皿型中等度難聴、*COCH*のめまいの随伴

症状などいずれの原因遺伝子にも聴力型や随伴症状に特徴があり、原因遺伝子を検索する際に、臨床症状と合わせ原因遺伝子を絞り込んで行く必要性があると思われた。

	発症時期	聴力型(frequency)	めまい
Dominant			
<i>KCNQ4</i>	postlingual	high	-
<i>COCH</i>	20-50th	high	+
<i>WFS1</i>	prelingual or postlingual	low	-
Dominant/Recessive			
<i>TECTA</i>	prelingual or postlingual	mid or high	-
<i>MYO7A</i>	postlingual	flat~down sloping	+
<i>CRYM</i>	postlingual	down sloping	-
<i>GOL9A3</i>	postlingual	flat	±
<i>KIAA1199</i>	congenital or postlingual	variable	-
Mit			
<i>Mit1555</i>	postlingual	variable	±
<i>Mit3243</i>	postlingual	variable	+
Recessive			
<i>SLC26A4</i>	congenital~early onset	AB gap of low fluctuating	+
<i>CDH23</i>	congenital~early onset	high	-

表1 進行性を示す原因遺伝子

## 考察

常染色体優性遺伝形式を取る難聴家系に進行例が多く、特発性難聴の中には優性遺伝形式をもつ遺伝性難聴の症例が少なからずいる可能性が示唆された。そのため、進行性難聴患者においては、遺伝的背景を視野に入れ、十分な家系調査とともに遺伝子検索により原因を特定していく必要があると思われた。日本人に発見された難聴の各原因遺伝子についての進行性の有無について検討を行った結果、進行性を示す遺伝性難聴にも聴力型や随伴症状など特徴があり、難聴の特徴に合わせた遺伝子検索が必要である。進行性難聴患者に対して新規変異を含めて今後も遺伝学的検索を継続する必要がある

る

いと考えている。

## 結 論

特発性難聴とされてきた原因不明の難聴は現在、徐々にその原因が解明されつつある。その理由として、難聴の原因遺伝子が明らかとなったことにより除外されたことが大きな要因となっている。今後も遺伝的検索を継続し特発性難聴とされてきた難聴の原因究明に努めていく

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 突発性難聴における虚血関連遺伝子 SNP の検討

分担研究者：暁 清文（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：兵頭 純（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：竹田 将一郎（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：寺岡 正人（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科）  
共同研究者：羽藤 直人（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科）

### 研究要旨

突発性難聴の原因の1つとして、虚血による循環障害が考えられているがその詳細は明らかではない<sup>1)</sup>。今回我々は突発性難聴に対する虚血の関与を明らかにすることを目的として、17種類の虚血関連遺伝子 Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) について、突発性難聴群と健常者コントロール群を比較検討した。その結果、虚血関連遺伝子 PRKCH において、突発性難聴群では健常コントロール群に比べ minor allele である A 塩基をもつ頻度が約2倍であった。PRKCH が脳梗塞症例においては脳梗塞関連遺伝子と同定されていることから、PRKCH 遺伝子型頻度の差は、突発性難聴の発症に虚血が関与している可能性を示唆していると考えられた。

### 研究目的

遺伝子には個人差が存在し、ゲノム上の同じ箇所、同じ遺伝子で塩基配列を比較すると、個体間で異なる塩基が存在する。その違いが「遺伝子多型」である。遺伝子多型の中でも、1塩基の違いを SNP（スニップ）とよび、ヒトの遺伝子領域には約50万ヶ所の SNP が存在すると考えられている。ヒトゲノムの塩基配列の変異情報に関しては、SNP が間接的に疾患感受性遺伝子を同定するツールとしての可能性から注目が集まっている。

突発性難聴の原因の1つとして、虚血による循環障害が考えられている<sup>1)</sup>。虚血関連遺伝子の SNP を検討することで、虚血との関連性に関する情報を得ることができる可能性がある。今回我々は、突

発性難聴に対する虚血の関与を解明することを目的として、突発性難聴患者における虚血関連遺伝子 SNP について健常者コントロールと比較検討を行った。

### 研究方法

愛媛大学耳鼻咽喉科で突発性難聴と診断した20例（男女比1:1、年齢32~78歳、平均60.3歳）および健常者コントロール20例から血液を各3ml採取し、DNAを抽出後、17種類の虚血関連遺伝子 SNP について検討した。各症例の塩基差を判定する「SNP タイピング」は島津製作所・ジェノミックスリサーチ室に依頼した。検討した SNP は表1に示す17種類である。それぞれ既知の主たる SNP を解析した。さらに、治療効果の判定が可能であった

突発性難聴患者 16 例で、出現頻度に差を認めた虚血関連遺伝子 SNP の有無と突発性難聴の治療効果の関連性について検討した。

## 研究結果

17 種類の虚血関連遺伝子 SNP タイプの出現頻度を表 1 に示す。遺伝子型のうち出現頻度の低い方を minor allele といい、この出現頻度の差が疾患群とコントロール群間との差となる。サイトカイン遺伝子である TNF $\alpha$  や MCP1、受容体遺伝子である ICAM1、血栓関連遺伝子である ACE、SOAT 1、GPIB、PAI-1、uPA に関しては、突発性難聴群とコントロール群間で遺伝子型頻度に統計学的に有意差を認めなかった。唯一、差を認めたものは蛋白リン酸化酵素 PRKCH であった。この SNP にはアデニン (A) とグアニン (G) という塩基があり、人には A/A、A/G、G/G の 3 タイプがある。突発性難聴患者では A/A : 2 例、A/G : 8 例、G/G : 9 例であったのに対し、健常者コントロールでは A/A : 0 例、A/G : 5 例、G/G : 14 例と、突発性難聴患者は健常者に比べ、A 塩基をもつ頻度が約 2 倍であった。

治療効果の判定が可能であった突発性難聴 16 例について A 塩基をもつ 8 例とまたない 8 例でその治療効果を比較した。A 塩基の有無では治療効果に差は認められなかった (図 1)。

## 考 察

今回の SNP 解析から、PRKCH が突発性難聴発症に関連遺伝子である可能性が示唆された。PRKCH は蛋白質をリン酸化す

る酵素である PKC (プロテインキナーゼ C) のサブタイプである PKC $\eta$  をコードする。PKC は細胞内シグナル伝達において中心的役割を担っており、様々な経路で虚血性疾患に関与することが明らかになっている。アテローム性動脈硬化ではその進行に伴い、血管内皮細胞や泡沫状マクロファージでの PKC 発現レベル増強が観察されている。また、くも膜下出血後には PKC の活性化を通じて血管平滑筋が持続収縮し、脳血管攣縮が発生することも明らかとなっている。九州大学と理化学研究所の共同研究では、脳梗塞症例群 1112 例および対照群 1112 例を対象に、JSNP (Japanese Single Nucleotide Polymorphisms) データベース取載の 52608 のタグ SNP を用い、脳梗塞関連遺伝子の同定を試みた<sup>2)</sup>。その結果、PKC $\eta$  をコードする PRKCH 遺伝子上のタグ SNP がラクナ梗塞との有意な相関を示し、PRKCH が脳梗塞関連遺伝子と同定された。今回の我々の検討でも、症例数が少ないものの、虚血関連遺伝子 PRKCH において突発性難聴群とコントロール群との間で遺伝子型頻度に統計学的有意差を認めた。このことは突発性難聴の発症に虚血が関与している可能性を示唆すると考えられる。

## 結 論

突発性難聴患者における 17 種類の虚血関連遺伝子 SNP について健常者コントロールと比較検討を行った結果、PRKCH においてのみ遺伝子型頻度に有意差を認めた。この結果から、突発性難聴発症に虚血が関与している可能性が示唆された。

#### 参考文献

- 1) 三宅 弘、柳田則之、勝見清子：突発性難聴の成因説と治療法－各国の現状調査報告。耳鼻 1978；24：1-11.
- 2) Kubo M, Hata J, Ninomiya T, et al. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C eta) increases the risk of cerebral infarction. Nat Genet 2007; 39(2): 212-217.

#### 健康危険情報

なし

#### 研究発表

1. 論文発表  
未発表
2. 学会発表  
寺岡正人, 羽藤直人, 暁 清文: 虚血関連遺伝子 SNP (一塩基多型) と突発性難聴、第 52 回聴覚医学会総会・学術講演会 平成 19 年 10 月 4 日・5 日 名古屋

#### 知的財産権の出願・登録状況

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

表1 SNPタイプの出現頻度

遺伝子名	遺伝子型	Minor Allele Frequency (%)	
		突発性難聴	コントロール
PRKCH	A/G	31.6 *	13.2 *
TNFA	T/C	15.8	20.0
TNFA	C/T	27.5	15.0
TNFA	G/A	0	0
TNFA	G/A	0	0
MCP1	G/C	40.0	32.7
ICAM1	G/A	0	0
ICAM1	G/A	37.5	30.0
ACE	G/T	0	0
ACE	C/G	45.0	37.5
ACE	C/T	47.5	37.7
ACE	A/G	45.0	37.5
SOAT1	C/G	40.0	42.5
SOAT1	C/T	7.5	12.5
GP1BA	C/T	36.8	26.3
PAI-1	G/A	37.5	42.5
uPA	C/T	30.0	25.0

\*: p < 0.05

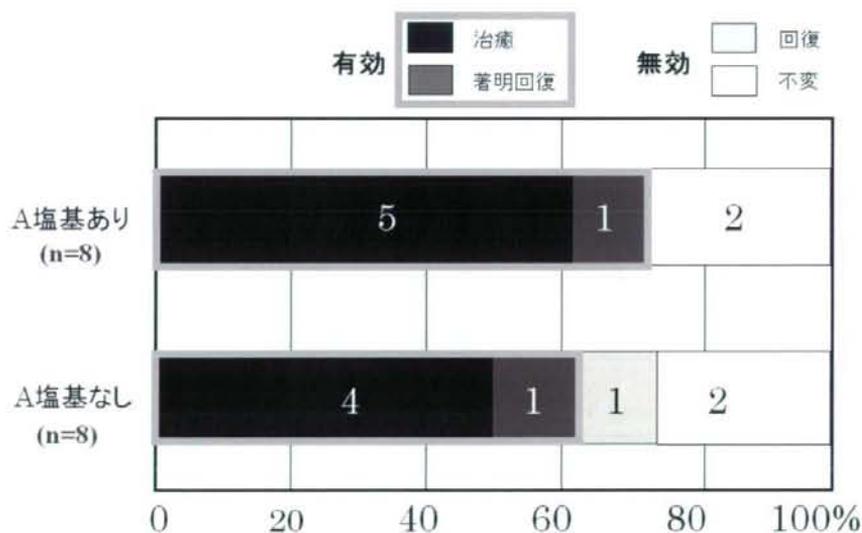


図1 A塩基の有無と突発性難聴の治療成績  
(厚労省研究班の判定基準による)

## 突発性難聴とメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型の検討

—『老化に関する長期縦断疫学研究』より—

分担研究者：中島 務（名古屋大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：内田 育恵（国立長寿医療センター耳鼻咽喉科）

共同研究者：杉浦 彩子（国立長寿医療センター耳鼻咽喉科）

共同研究者：安藤 富士子（愛知淑徳大学医療福祉学部医療貢献学科、  
国立長寿医療センター疫学研究部）

共同研究者：下方 浩史（国立長寿医療センター疫学研究部）

### 研究要旨

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（以下MTHFR）のC677T遺伝子多型と、自己報告式質問票で得た突発性難聴の既往について、中高年齢の地域住民2174名について検討した。多重ロジスティック回帰分析にて解析すると、変異アレルが1つ増えるごとに、突発性難聴のリスクが約1.7倍増加するという結果が得られ、この関係は、心循環器系疾患既往歴や喫煙歴、糖尿病、BMIを調整してもなお、有意であった。MTHFRのC677T多型の変異アレルは、突発性難聴と関連がある可能性が考えられた。

### 研究目的

『国立長寿医療センター研究所—老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）』では、老化や老年病の素因を明らかにする目的で、現在までに224種類の老化、老年病関連遺伝子多型についてタイピングを行っている。その中でメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（以下MTHFR）遺伝子多型は、過去に突発性難聴との関連がイタリア、オランダ、イスラエル、トルコから報告されている。今回、自己報告式調査をもとにした突発性難聴既往の有無で、中高年齢の一般地域住民対象者を2群に分け、MTHFR遺伝子多型と突発性難聴との関連について検討する。

### 研究方法

NILS-LSA 第1次調査（1997年11月～2000

年4月）参加者（40歳～79歳）のうち、次の要件を満たす2174名を対象とした。対象要件は、1）遺伝子検査を行っており、2）本解析に必要な調査項目：質問票への回答、血液検査、聴覚検査を満たす、とした。次に対象者を突発性難聴既往により2群に分類した。自記式質問票で、耳疾患の既往に関する設問に、突発性難聴と回答した者を①突発性難聴群、それ以外を②コントロール群とした。患側についても尋ねているが、患側不明の場合も①に含めた。遺伝子解析は、allele-specific primer/polymerase chain reaction (PCR) assay system (Toyobo Gene Analysis, Tsuruga, Japan)にて行い、MTHFRについては677番目の塩基がシトシンからチミンに変異する一塩基変異多型（rs1801133）について解析した。統計学的解析は、多重ロ

ジスティック回帰分析を用い、目的変数を自記式質問票で得た突発性難聴の有無、説明変数を MTHFR、C677T 遺伝子多型の相加モデル（変異アレルが一つ増える毎のオッズ比）とし、調整変数については、変数の種類を変えて3つのモデルで検討した。調整変数の3つのモデルは、model 1: 年齢、性、騒音職場の就労歴の有無、model 2: model 1 の変数＋心疾患既往歴、高血圧既往歴、喫煙歴、糖尿病の有無、BMI、model 3: model 2 の変数＋血中葉酸値、血中ホモシステイン値である。有意水準は5%とした。

## 研究結果

表1に、突発性難聴群とコントロール群の遺伝子型分布を示す。カイ2乗検定で、両群の遺伝子型分布には統計学的に明らかな有意差を認めなかった。次に多重ロジスティック回帰分析結果を表2に示す。model 1では、変異アレルが1つ増えるごとに、突発性難聴のリスクが約1.7倍増加するという結果で、この関係は、心循環器系疾患既往歴や喫煙歴、糖尿病、BMIを調整したmodel 2でもなお、有意であった。

## 考察

本検討では、MTHFR C677T 多型と突発性難聴の関連が示された。これは、ここ数年イタリア、オランダ、イスラエル、トルコから報告された結果と類似しており、MTHFR C677T が日本でも突発性難聴発症リスクを高めるものと思われる。しかし、本検討で考慮すべき limitation は、1) 突発性難聴の有無について、自己報告式である、2) 突発性難聴発症時の患者背景が得られていない、という点である。しかし一般の受療患者解析に比べ

ると、他科領域に関する情報量が多い、ケース、コントロールの背景要因にバイアスの少ないサンプリングが可能となるなどの点で、十分意義があると考えられる。

一方、本遺伝子多型の関与の機序として、ホモシステイン代謝への影響が考えられる。本対象で、MTHFR C677T 多型と血中葉酸値、血中ホモシステイン値を単変量解析したところ、ホモ変異接合体では有意にホモシステイン値が高く、葉酸値は低かったが、突発性難聴群とコントロール群の間で、血中葉酸値、血中ホモシステイン値を単変量解析したところ、有意差は認めなかった。

今後、突発性難聴発症におけるホモシステイン代謝の関与については、さらなる検討が課題である。

## 結論

今回の解析より、MTHFR C677T 多型の変異アレルは、日本でも突発性難聴のリスクに関連している可能性が考えられた。

[謝辞] 本研究の調査、解析にご協力いただいた国立長寿医療センター疫学研究部の皆様に感謝いたします。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 突発性難聴と遺伝子型の分布

遺伝子型	CC	CT	TT	計
コントロール群	798 37.3%	1023 47.8%	320 15.0%	2141 100.0%
突発性難聴群	8 24.2%	16 48.5%	9 27.3%	33 100.0%

表2. 相加モデルにおける調整変数の組合せ別にみた突発性難聴の  
変異アレル1つ増える毎のオッズ比

	CC(T=0)	CT (T=1)	TT (T=2)	<i>p</i>
N	806	1039	329	
model 1	1	1.687 (1.023-2.780) / T-allele		0.0404
model 2	1	1.654 (1.003-2.728) / T-allele		0.0486
model 3	1	2.475 (1.324-4.627) / T-allele		0.0045