

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

耳鼻科的観点からのBOR症候群の発症頻度調査と診療体制モデル構築に関する研究

研究分担者 松永達雄 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター

聴覚障害研究室長

研究要旨

鰓弓耳腎（Branchio-oto-renal (BOR)）症候群は、頸瘻・耳瘻孔・外耳奇形などの鰓原性奇形、難聴、腎尿路奇形を3主徴とする症候群である。BOR症候群の欧米での頻度は4万人に1人とされているが、わが国における頻度は不明である。今回、一定の基準を満たす医療施設の小児科医と耳鼻咽喉科医に患者数および主たる症状に関するアンケート調査を行い、アンケート用紙を送付した全国の1,715施設の中で820施設（47.8%）から回答を得た。この結果を基にわが国における患者数を推計したところ、250人（95%信頼区間170-320人）という結果を得た。この数値は実際に診療を受けている患者数を反映していると考えられ、患者の全体数はさらに多い可能性があると考えられた。さらに今回報告されたBOR患者における各症状の頻度を明らかにした。難聴が87.9%と最多であり、以下頻度順に第2鰓弓奇形が57.1%、耳介奇形が38.5%と続き、腎奇形は29.7%であった。これらの結果から、耳鼻咽喉科におけるBOR症候群の診断率を高めるための診断の着眼点としては、第2鰓弓奇形、第2鰓弓奇形はないが難聴と外耳、中耳、内耳の奇形の複数の合併、腎奇形による腎障害と難聴の合併が重要であると考えられた。

A. 研究目的

鰓弓耳腎（Branchio-oto-renal (BOR)）症候群は、頸瘻・耳瘻孔・外耳奇形などの鰓原性奇形、難聴、腎尿路奇形を3主徴とする症候群である。BOR症候群の欧米での頻度は4万人に1人とされ、小児高度難聴の2%を占めるとされているが、わが国における頻度は不明である。BOR症候群は、まれな疾患で、小児科と耳鼻咽喉科の境界領域にあり、頭頸部の奇形もそ

れほど顕著でないために診断がつかないままの患者も少なくないと思われる。また、本症候群は先天性の高度難聴や小児期腎不全の重要な原因であり、小児科医、耳鼻咽喉科医、遺伝専門医らによる総合的な医療を要するが、わが国では、その発症頻度すら明らかになっていないのが現状である。本研究では、BOR症候群診療体制モデルの構築を目指して、わが国におけるBOR症候群の患者数を把握し、効率的な診断を促進することを目的とする。

## B. 研究方法

我が国における BOR 症候群の患者数推定のために、1) 全国の 200 床以上の病院（一般施設）に勤務する小児科医と耳鼻咽喉科医、2) 日本小児腎臓病学会評議員と小児病院（特別施設）に勤務する腎臓専門医及び耳鼻咽喉科医を対象に、①過去 3 年間に診療した BOR 症候群患者の有無、②患者の生年月、③性別、④主な症状、⑤家族歴の有無、⑥最終受診日についてアンケート調査した。調査対象施設は全国 1715 施設（うち小児科 828 施設および耳鼻咽喉科 887 施設）であり、その結果をもとに、本症の発症頻度を推測し、本症の診断効率を高めるための着目すべき点について耳鼻科的観点から考察した。

### （倫理面への配慮）

本研究を含めた研究計画は、国立成育医療センター、神戸大学の倫理審査委員会において承認済みである。

## C. 研究結果

アンケート用紙を送付した全国の 1,715 施設の中で、820 施設（47.8%）から回答を得た。集計患者の全報告数は 102 例であったが、診断基準を満たさない症例や調査期間外の最終受診例を除外した 85 例を対象とし、我が国における患者数を推計したところ、250 人（95%信頼区間 170-320 人）という結果を得た。

今回報告された BOR 患者の症状では、難聴が 87.9% と最多であり、以下頻度順に第 2 鰓弓奇形が 57.1%、耳介奇形が 38.

5%、中耳奇形が 31.9%、内耳奇形と腎奇形がどちらも 29.7%、耳小かが 24.2%、外耳道奇形が 19.8%、副耳が 9.9% であった。

## D. 考察

日本人 BOR 症候群患者の数を、文献のデータを基に予測すると、日本人の出生数は年間 109 万人、高度難聴の発生率は出生 1000 人に 1 人、BOR 症候群は小児高度難聴の 2% という数値から、年間 22 人の BOR 症候群患者が発生していることになる。10 年で 220 人の患者が発生することになるので、それと比較すると今回のアンケートから推測された現在のわが国の BOR 患者の総数 250 人はかなり少ない。

また BOR 症候群は 40000 人に 1 人という欧米の文献データもあり、日本人の人口 12777 万人からは約 3,000 人の本症候群患者が推測されるが、この数値と比較してもかなり少ない。

今回の調査での患者数が文献データを基に算出した数値より少ない理由としては、第一に患者数の予測に用いた文献データの数値（出生数、高度難聴の発生率、BOR 症候群の小児高度難聴での頻度、人口における頻度）が正しくない可能性がある。日本人の出生数、高度難聴の発生率の出生 1000 人に 1 人という数値は、実際に日本人で検証されておりほぼ正確である。一方、小児高度難聴の 2% および人口 40000 人に 1 人が BOR 症候群というデータは、欧米での調査結果であり、日本人ではこれより低い可能性が考え

られる。

第2の理由として、今回の調査は実際に診療を現在受けている人数から推測した数字であり、診療を受けていないBOR症候群の患者が相当数いて、その数が今回の総患者数に反映されていないため、調査による患者数が少なく算出された可能性が考えられる。BOR症候群は、腎障害のないBO症候群の例も多く、その場合、医療機関との関わりは補聴器の調整が主たる目的になるが、補聴器を医療機関以外の機関（町の補聴器屋など）で行う患者も多く、医療機関の診療されていない患者も相当数存在する。したがって診療を受けていないBOR症候群患者も含めると実際の患者数はより多い可能性が考えられる。この点を明らかにするためには小児の高度難聴とBOR症候群の発症に関するコホート研究が必要である。

今回の症状に関するアンケート調査ではBOR症候群の主要な症状についても調べられた。その結果、耳鼻咽喉科関係で多様な症状が報告された。この中でBOR症候群に特異性の高い症状としては、第2鰓弓奇形のみであった。従って、耳鼻咽喉科での診断にあたっては第2鰓弓奇形を認めた場合には、BOR症候群を疑いその精査を積極的に進めることが重要である。また、第2鰓弓奇形を認めない場合は、難聴と外耳、中耳、内耳の奇形の複数の合併はBOR症候群に比較的特異性の高い症状と考えられ、本症候群を疑うべきと考える。また、腎奇形によ

る腎障害と難聴の合併もBOR症候群に特異性の高い症状であった。このような患者の診断に際しても本症候群を念頭におく必要がある。

今回のアンケート調査で把握した患者を対象として二次調査を行い、BOR症候群の診療上の問題を正確に評価した上で、小児科医（小児腎臓病専門医）、耳鼻咽喉科医、遺伝専門医らによる総合的な診療体制モデルを構築する予定である。

## E. 結論

本調査によるわが国のBOR患者の総数は250人であった。この数値は実際に診療を受けている患者数を反映していると考えられ、患者の全体数はさらに多い可能性がある。

耳鼻咽喉科におけるBOR症候群の診断率を高めるための診断の着眼点として、本症候群に特異性の高い症状およびその組み合わせを具体的に提示した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### Matsunaga T

Value of genetic testing in determination of therapy for auditory disorders.

Keio J Med 2009; 58(4): 216-222

Mutai H, Nagashima R, Sugitani Y, Noda T, Fujii M, Matsunaga T.

- Expression of Pou3f3/Brn-1 and its genomic methylation in developing auditory epithelium.  
Dev Neurobiol 69 (14):913-930, 2009
- Mutai H, Nagashima R, Fujii M, Matsunaga T.  
Mitotic activity and specification of fibrocytes subtypes in the developing rat cochlear lateral wall.  
Neuroscience 163 (4):1255-1263, 2009
- Mizutari K, Fujioka M, Nakagawa S, Fujii , Ogawa K, Matsunaga T  
Balance dysfunction resulting from acute inner ear energy failure is caused primarily by vestibular hair cell damage.  
J Neurosci Res 2009 Nov 11 (Epub ahead of print)
- Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutari K, Fujii M, Matsunaga T  
CHOP expression precedes degeneration of fibrocytes in a rat model of acute cochlear mitochondrial dysfunction  
Neurochem Int 56 (3) 487-494, 2010
- Ozawa H, Mutai H, Matsunaga T, Tokumaru Y, Fujii M, Sakamoto K, Tomita T, Ogawa K.  
Promoted cell proliferation by connexin 30 gene transfection to head-and-neck cancer cell line  
Anticancer Res 2009 29(6):1981-1985, 2009
- Kunishima S, Matsunaga T, Ito Y, Saito H.  
Mutations in MYH9 exons 1, 16, and 30 are infrequently found in Japanese patients with nonsyndromic deafness.  
Genet Test Mol Biomarkers 2009; 13(5): 705-707
- 松永達雄  
薬剤性聴覚障害の発症予防のための12SribosomalRNA ミトコンドリア遺伝子変異解析  
臨床薬理の進歩 30 ; 21-26, 2009
- 松永達雄  
中等度難聴の遺伝子  
In : 加我君孝、内山勉、新正由紀子・編。小児の中等度難聴ハンドブック。金原出版：東京 2009 ; 51-57
- 松永達雄、孫コウイ、務台英樹  
病因と遺伝子  
In : 朝戸裕貴、加我君孝・編。小耳症・外耳道閉鎖症に対する機能と形態の再建。金原出版：東京 2009 ; 11-16
- 加我君孝、竹腰英樹、新正由紀子、松永達雄  
幼小児の人工内耳手術 -先天性および後天性高度難聴児に聴覚を回復させる新しい医療-  
Bio Industry 2009;26(3):92-98
- 加我君孝、竹腰英樹、松永達雄、朝戸裕貴

小耳症・外耳道閉鎖

In: 日本小児耳鼻咽喉科学会・編. 小児耳鼻咽喉科診療指針. 金原出版: 東京  
2009; 101-113

矢島陽子、徳丸裕、羽生昇、松永達雄、  
藤井正人、大島久二  
呼吸困難を主訴とした再発性多発軟骨炎  
例

耳鼻臨床 102: 4; 309-313, 2009

徳丸裕、藤井正人、羽生昇、矢島陽子、  
松永達雄、角田晃一、加我君孝  
頭頸部扁平上皮癌におけるヒト乳頭腫ウ  
イルス (HPV) の感染と p53 遺伝子変異  
頭頸部癌 35(4): 360-364, 2009

## 2. 学会発表

岡本康秀、松永達雄、務台英樹、守本倫  
子、泰地秀信、坂田英明、安達のどか、  
山口聡子、小川郁  
両側性前庭水管拡大症に対する SLC26A4  
遺伝子解析の臨床活用  
第 110 回日本耳鼻咽喉科学会総会  
2009 年 5 月 14-16 日  
ザ・プリンスパークタワー東京、東京

難波一徳<sup>1</sup> 金子寛生<sup>2</sup> 水足邦雄<sup>3</sup> 八木  
博隆<sup>4</sup> 井上泰宏<sup>3</sup> 小川郁<sup>3</sup> 藤井正人<sup>1</sup> 加  
我君孝<sup>1</sup> 松永達雄<sup>1</sup>  
聴神経障害の原因となる変異型 OPA1 の立  
体構造予測  
第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10  
月 21-24 日  
神戸ポートアイランド

松永達雄

先天性および後天性感音難聴に対する遺  
伝子診療  
シンポジウム「5 官としての感覚器とそ  
の障害」

第 63 回国立病院総合医学会  
2009 年 10 月 23-24 日  
仙台国際センター、仙台市

松永達雄、上田勉、西康行、孫コウイ、  
加我君孝

特発性両側性感音難聴の系統的難聴遺伝  
子解析と希少難聴遺伝子TECTAの変異同  
定  
第 54 回日本聴覚医学会総会  
2009 年 10 月 22-23 日  
新横浜プリンスホテル、横浜市

岡本康秀、松永達雄、守本倫子、泰地秀  
信、坂田英明、安達のどか、山口聡子、  
貫野彩子、小川郁  
両側前庭水管拡大症の確実例とボーダー  
ライン例の臨床所見および SLC26A4 変異  
第 54 回日本聴覚医学会総会  
2009 年 10 月 22-23 日  
新横浜プリンスホテル、横浜市

竹腰英樹、松永達雄、榎本千江子、加我  
君孝  
人工内耳埋め込みにおいて脳室-腹腔シ  
ャントの位置変更を要した小児髄膜炎性  
聾症例  
第 54 回日本聴覚医学会総会  
2009 年 10 月 22-23 日  
新横浜プリンスホテル、横浜市

務台英樹、藤井正人、松永達雄  
ラット蝸牛外側壁線維細胞の生後発達様式

第19回日本耳科学会総会  
2009年10月8-10日  
京王プラザホテル、東京

松永達雄、務台英樹、安達のどか、坂田英明、瀧口哲也、藤井正人、加我君孝  
Alport症候群の4家系におけるCOL4A5遺伝子変異の同定

第19回日本耳科学会総会  
2009年10月8-10日  
京王プラザホテル、東京

難波一徳、水足邦雄、井上泰宏、藤井正人、小川郁、加我君孝、松永達雄  
Auditory neuropathyの原因となる変異型OPA1蛋白質の立体構造予測

第19回日本耳科学会総会  
2009年10月8-10日  
京王プラザホテル、東京

松永達雄、竹腰英樹、岡本康秀、加我君孝

めまい・難聴の増悪を反復する1例におけるPendred症候群の遺伝子診断  
第68回日本めまい平衡医学会総会  
2009年11月25-27日  
ホテルクレメント徳島、徳島

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
鰓弓耳腎（BOR）症候群の発症頻度調査と遺伝子診断法の確立に関する研究  
分担研究報告書

*EYA1*遺伝子変異の網羅的解析手段の確立

研究分担者 野津 寛大 神戸大学医学部附属病院小児科助教

**研究要旨**

鰓弓耳腎（BOR）症候群の原因遺伝子として*EYA1*、*SIX1*が既に報告されている。しかし本症候群におけるそれぞれの遺伝子変異検出率は*EYA1*で30–70%、*SIX1*においては10%以下であり、患者における遺伝子変異の検出率は決して良好とは言えない。しかし、本疾患は常染色体優性遺伝性疾患であり、これまでのPCRおよび直接シーケンス法を用いた解析のみでは変異を同定できていない患者が多数いると推測される。私たちはその理論に従い典型的BOR症候群の孤発例で、直接シーケンス法で変異を同定できないにもかかわらず、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法で広範囲欠失を証明し、mRNAを用いたRT-PCR法やLong-PCR法などの最新の解析技術を駆使して*EYA1*の変異を同定し得た患者を経験し、その経験をもとに高い診断率を得ることが可能な解析手順を確立した。今後、本解析方法を用いて日本人BOR患者において網羅的解析を行い、その発症頻度、変異検出率の同定および遺伝子型と臨床像の相関などにつき検討を行っていく予定である。

**A. 研究目的**

これまでの報告では、BOR症候群患者における*EYA1*遺伝子変異検出率は30–70%にすぎず、決して良好とは言えない<sup>1–3</sup>。本研究では、これまでに無い高い変異検出率を得るための*EYA1*遺伝子変異網羅的解析方法の確立を目指す。

**B. 研究方法**

*EYA1*遺伝子変異の網羅的解析を行うために、以下の方法を用いた。

1) PCRおよび直接シーケンス法を用

いたゲノムDNAの解析

*EYA1*遺伝子の全エクソンおよびエクソン・イントロン境界領域に関して従来行ってきたPCRおよび直接シーケンス法により、変異の同定を行う。本解析法による小規模な解析結果について私たちは既に報告を行っている<sup>2</sup>。

2) MLPA法によるゲノムDNAの解析

BOR症候群は常染色体優性遺伝形式を示す症候群である。その場合、ヘテロ接合体広範囲欠失は従来の直接シーケンス法では検出することができない。そのような際に、Multiplex

ligation-dependent probe amplification (MLPA)法によりそれらの変異を検出することが可能となる。

常染色体上の遺伝子は正常では2コピーずつ存在するが、広範囲欠失を認めるエクソンでは1コピーしか存在しない。そのため、広範囲欠失部分のコピー数のPCR半定量解析を行うと正常の半分のPCR産物として検出される。私たちは、Alport症候群において本解析方法を用いた解析結果を過去に報告している<sup>4</sup>。

近年、*EYA1*遺伝子変異を同定した14名中3名が広範囲欠失であったという報告がなされ、このような変異は、これまでの報告においては検出できていなかった可能性が示されている<sup>5</sup>。

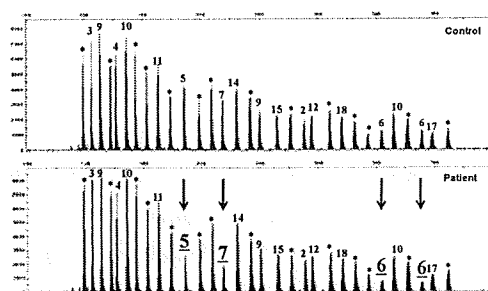
### 3) mRNAを用いたRT-PCR法による解析

ゲノムDNAからの解析により変異を同定できなかった場合においても、イントロン内の変異に伴いスプライシング異常をきたすことにより病気を発症することがある。私たちは、Gitelman症候群においてそのような患者を経験し報告してきた<sup>6</sup>。*EYA1*遺伝子においても、末梢血単核球においてmRNA発現を認めRT-PCR解析が可能であることを見出した。

## C. 結果

本年度は、臨床的にBOR症候群と診断された6家系において*EYA1*遺伝子

解析を行った。その結果、2家系において変異の検出に成功した。1家系はこれまでに報告のない新規の変異であった。他の1家系では直接シーケンス法では変異を検出できず、MLPA法でexon5から7までのヘテロ接合体広範囲欠失を同定した。



MLPA法: exon 5-7のヘテロ接合体広範囲欠失

次に、末梢血単核球をから抽出したmRNAを用いたRT-PCR解析においても、同様にexon 3から8へのskippingを認めた。さらに、欠失のbreak pointに関する検索を行ったところ、レトロポゾンであるLINE1配列の挿入を認めた。以上より、本患者は*EYA1*遺伝子の一部がLINE1に置換しているためBOR症候群を発症した初めての患者として報告した (Morisada, Nozu, Iijima, *Pediatr Nephrol*, 2010 Feb 4. [Epub ahead of print])。このように、本研究によりBOR症候群発症の分子生物学的機序に関する新たな知見を得ることができた。

## D. 考察

私たちは上記に示した遺伝子変異



の網羅的解析手法をすでにAlport症候群の遺伝子解析において実践しており、多数の重要な知見を得ることに成功している<sup>4, 6-16</sup>。今回の研究においても同様の方法論で、BOR症候群におけるEYA1遺伝子変異の網羅的解析法を確立することが可能となった。

#### E. 結論

BOR症候群患者におけるEYA1遺伝子変異検出のための網羅的解析手法の確立を行った。今後、この方法を用いることによって、EYA1遺伝子の変異検出率を飛躍的に向上せしめることが期待でき、BOR症候群の発症機序や病態解明に寄与することができると思われる。

#### F. 参考文献

1. Kochhar A, Orten DJ, Sorensen JL, Fischer SM, Cremers CW, Kimberling WJ, et al. SIX1 mutation screening in 247 branchio-oto-renal syndrome families: a recurrent missense mutation associated with BOR. Hum Mutat. 2008;29(4):565.
2. Okada M, Fujimaru R, Morimoto N, Satomura K, Kaku Y, Tsuzuki K, et al. EYA1 and SIX1 gene mutations in Japanese patients with branchio-oto-renal (BOR) syndrome and related conditions. Pediatr Nephrol. 2006;21(4):475-481.
3. Orten DJ, Fischer SM, Sorensen JL, Radhakrishna U, Cremers CW, Marres HA, et al. Branchio-oto-renal syndrome (BOR): novel mutations in the EYA1 gene, and a review of the mutational genetics of BOR. Hum Mutat. 2008;29(4):537-544.
4. Nozu K, Krol RP, Nakanishi K, Yoshikawa N, Nozu Y, Ohtsuka Y, et al. Detection by multiplex ligation-dependent probe amplification of large deletion mutations in the COL4A5 gene in female patients with Alport syndrome. Pediatr Nephrol. 2009;24(9):1773-1774.
5. Stockley TL, Mendoza-Londono R, Propst EJ, Sodhi S, Dupuis L, Papsin BC. A recurrent EYA1 mutation causing alternative RNA splicing in branchio-oto-renal syndrome: implications for molecular diagnostics and disease mechanism. Am J Med Genet A. 2009;149A(3):322-327.

6. Nozu K, Iijima K, Nozu Y, Ikegami E, Imai T, Fu XJ, et al. A deep intronic mutation in the SLC12A3 gene leads to Gitelman syndrome. *Pediatr Res.* 2009;66 (5) :590–593.
7. Iida K, Nozu K, Takahashi Y, Okimura Y, Kaji H, Matsuo M, et al. Characterization of a splicing abnormality in Gitelman syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2008;51 (6) :1077–1078.
8. Kaito H, Nozu K, Fu XJ, Kamioka I, Fujita T, Kanda K, et al. Detection of a transcript abnormality in mRNA of the SLC12A3 gene extracted from urinary sediment cells of a patient with Gitelman's syndrome. *Pediatr Res.* 2007;61 (4) :502–505.
9. Kaneko K, Tanaka S, Hasui M, Nozu K, Krol RP, Iijima K, et al. A family with X-linked benign familial hematuria. *Pediatr Nephrol.* 25 (3) :545–548.
10. Kumagai H, Matsumoto S, Nozu K. Hypokalemic rhabdomyolysis in a child with Gitelman's syndrome. *Pediatr Nephrol.*
11. Nozu K, Fu XJ, Kaito H, Kanda K, Yokoyama N, Przybyslaw Krol R, et al. A novel mutation in KCNJ1 in a Bartter syndrome case diagnosed as pseudohypoaldosteronism. *Pediatr Nephrol.* 2007;22 (8) :1219–1223.
12. Nozu K, Fu XJ, Nakanishi K, Yoshikawa N, Kaito H, Kanda K, et al. Molecular analysis of patients with type III Bartter syndrome: picking up large heterozygous deletions with semiquantitative PCR. *Pediatr Res.* 2007;62 (3) :364–369.
13. Nozu K, Iijima K, Kawai K, Nozu Y, Nishida A, Takeshima Y, et al. In vivo and in vitro splicing assay of SLC12A1 in an antenatal salt-losing tubulopathy patient with an intronic mutation. *Hum Genet.* 2009;126 (4) :533–538.
14. Nozu K, Inagaki T, Fu XJ, Nozu Y, Kaito H, Kanda K, et al. Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness. *J Med Genet.* 2008;45 (3) :182–186.
15. Nozu K, Przybyslaw Krol R, Ohtsuka Y, Nakanishi K,

Yoshikawa N, Nozu Y, et al. Detection of large deletion mutations in the COL4A5 gene of female Alport syndrome patients. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(11):2085-2090.

16. Yamazaki H, Nozu K, Narita I, Nagata M, Nozu Y, Fu XJ, et al. Atypical phenotype of type I Bartter syndrome accompanied by focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(2):415-418.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fujita T, Shimooka T, Teraoka Y, Sugita Y, Kaito H, Iijima K, Matsuo M, Nozu K, Tanaka R: Acute renal failure due to obstructive uric acid stones associated with acute gastroenteritis. *Pediatr Nephrol* 2009
2. Hashimura Y, Nozu K, Kanegane H, Miyawaki T, Hayakawa A, Yoshikawa N, Nakanishi K, Takemoto M, Iijima K, Matsuo M: Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome. *Pediatr Nephrol* 2009
3. Kamei K, Ito S, Nozu K, Fujinaga S, Nakayama M, Sako M, Saito M, Yoneko M, Iijima K: Single dose of rituximab for refractory steroid-dependent nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1321-1328.
4. Kaneko K, Taniguchi N, Tanabe Y, Nakano T, Hasui M, Nozu K: Oxidative imbalance in idiopathic renal hypouricemia. *Pediatr Nephrol* 2009;24:869-871.
5. Nozu K, Iijima K, Kawai K, Nozu Y, Nishida A, Takeshima Y, Fu XJ, Hashimura Y, Kaito H, Nakanishi K, Yoshikawa N, Matsuo M: In vivo and in vitro splicing assay of *slc12a1* in an antenatal salt-losing tubulopathy patient with an intronic mutation. *Hum Genet* 2009
6. Nozu K, Krol RP, Nakanishi K, Yoshikawa N, Nozu Y, Ohtsuka Y, Iijima K, Matsuo M: Detection by multiplex ligation-dependent probe amplification of large deletion mutations in the *col4a5* gene in female patients with alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2009
7. Shima Y, Nakanishi K, Togawa H, Obana M, Sako M, Miyawaki M, Nozu K, Iijima K, Yoshikawa N: Membranous nephropathy associated with thyroid-peroxidase antigen.

*Pediatr Nephrol* 2009;24:605-608.

8. Togawa H, Nakanishi K, Shima Y, Obana M, Sako M, Nozu K, Tanaka R, Iijima K, Yoshikawa N: Increased chymase-positive mast cells in children with crescentic glomerulonephritis. *Pediatr*

*Nephrol* 2009;24:1071-1075.

9. Yamazaki H, Nozu K, Narita I, Nagata M, Nozu Y, Fu XJ, Matsuo M, Iijima K, Gejyo F: Atypical phenotype of type I Bartter syndrome accompanied by focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr*

*Nephrol* 2009;24:415-418.

10. Kanda K, Nozu K, Yokoyama N, Morioka I, Miwa A, Hashimura Y, et al. Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1 with a novel splice site mutation in MR gene. *BMC Nephrol*. 2009;10:37.

11. Nozu K, Iijima K, Nozu Y, Ikegami E, Imai T, Fu XJ, et al. A deep intronic mutation in the SLC12A3 gene leads to Gitelman syndrome. *Pediatr Res*. 2009;66(5):590-593.

12. Kaneko K, Hasui M, Hata A, Hata D, Nozu K. Focal segmental glomerulosclerosis in a boy with Dent-2 disease. *Pediatr Nephrol*. 2009.

## 2. 学会発表

1. X染色体連鎖型アルポート症候群の分子遺伝学的検討. 野津寛大, Karol Rafal, 神田杏子, 橋村裕也, 中西浩一, 吉川徳茂, 飯島一誠, 松尾雅文. 第112回日本小児科学会学術集会, 2009. 4. 17~19

2. X染色体連鎖型アルポート症候群(XLAS)の分子遺伝学的検討. 野津寛大, 貝藤裕史, 神田杏子, 橋村裕也, 飯島一誠, 松尾雅文, 中西浩一, 吉川徳茂. 第52回日本腎臓学会学術総会, 2009. 6. 3~5

3. COL4A5遺伝子に9塩基の欠失を有し、GBMに4型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖の正常の発現を認めたX染色体連鎖型アルポート症候群男児例. 沢登恵美, 海野杏奈, 金井宏明, 松下香子, 杉田完爾, 東田耕輔, 野津寛大, Krol RP, 飯島一誠. 第101回日本小児精神神経学会, 2009. 6. 20~21

4. NR3C2遺伝子変異に伴いmRNAにsplicing異常を認めたにも関わらず軽症であった偽性低アルドステロン症1型の親子例. 神田杏子, 野津寛大, 橋村裕也, 三輪明弘, 森岡一郎, 横山直樹, 飯島一誠, 松尾雅文. 第44回日本小児腎臓病学会学術集会, 2009. 6. 26~27

5. X染色体連鎖型アルポート症候群の男性患者における糸球体基底膜4型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖陽性例の検討. Krol

RP, Nozu K, Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K, Matsuo M. 第44回日本小児腎臓病学会学術集会, 2009. 6. 26~27

6. 遺伝性腎疾患における intron 内の変異に伴う病気発症メカニズム解明のための in vivo および in vitro の実験系の確立. 野津寛大, 野津圭美, 齊藤加代子, 西田篤丈, 貝藤裕史, 神田杏子, 橋村裕也, 中西浩一, 吉川徳茂, 河井和夫, 竹島泰弘, 飯島一誠, 松尾雅文. 第44回日本小

児腎臓病学会学術集会, 2009. 6. 26~27

7. COL4A5 遺伝子に9塩基の欠失を有し、GBM に4型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖の正常の発現を認めた X 染色体連鎖型アルポート症候群男児例. 沢登恵美, 海野杏奈, 金井宏明, 松下香子, 杉田完爾, 東田耕輔, 野津寛大, Krol RP, 飯島一誠.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌	出版年等
Morisada N, Rendtorff ND, <u>Nozu K</u> , Morishita T, Miyakawa T, Matsumoto T, Hisano S, <u>Iijima K</u> , Tranebjærg L, Shirahata A, Matsuo M, Kusahara K	Branchio-oto-renal syndrome caused by partial EYA1 deletion due to LINE-1 insertion	Pediatric Nephrology	2010 Feb 4. [Epub ahead of print]

## Branchio-oto-renal syndrome caused by partial *EYAI* deletion due to LINE-1 insertion

Naoya Morisada · Nanna Dahl Rendtorff · Kandai Nozu · Takahiro Morishita · Takayuki Miyakawa · Tohru Matsumoto · Satoshi Hisano · Kazumoto Iijima · Lisbeth Tranebjærg · Akira Shirahata · Masafumi Matsuo · Koichi Kusuhara

Received: 11 April 2009 / Revised: 14 December 2009 / Accepted: 16 December 2009  
© IPNA 2010

**Abstract** A 7-year-old Japanese girl with conductive deafness and preauricular fistulae developed proteinuria. She had renal insufficiency, and ultrasound revealed bilateral small kidneys. These findings indicated that she had branchio-oto-renal (BOR) syndrome. In the present patient, we identified, by using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis, a heterozygous *EYAI* gene deletion comprising at least exons 5 to 7. In her parents, we did not detect any deletion in *EYAI* by MLPA, so the deletion was a de novo mutation. PCR analysis and sequencing of patient DNA revealed a heterozygous ~17 kb *EYAI* deletion starting from the eight last bases of exon 4 and proceeding to base 1,217 of intron 7. Furthermore, in place of this deleted region was inserted a 3756-bp-long interspersed nuclear elements-1 (LINE-1, L1). Accordingly, RT-PCR showed that exons 4–7 were not present in *EYAI* mRNA expressed from the mutated allele. Although there are reports of L1 element insertion occurring in various human diseases, this is the first

report of a large *EYAI* deletion in combination with L1 element insertion.

**Keywords** BOR syndrome · *EYAI* · Renal insufficiency · MLPA · LINE-1 (L1) · Retrotransposition · Insertion

### Introduction

Branchio-oto-renal (BOR) syndrome (OMIM 113650), which was first reported in 1975 by Melnick et al. [1], is characterized by branchiogenic malformation, deafness, and renal abnormalities. BOR syndrome is an autosomal dominant disorder and the prevalence is about 1 to 40,000 births, but sporadic cases are also seen [2]. The renal abnormalities reported in BOR patients include renal agenesis, hypoplasia, dysplasia, calyceal cyst or diverticulum, ureteral pelvic junction obstruction, pelviectasis, and

Naoya Morisada, Nanna Dahl Rendtorff and Kandai Nozu contributed equally to this work.

N. Morisada (✉) · T. Miyakawa  
Department of Pediatrics, Saiseikai Yahata General Hospital,  
5-9-27, Haruno-machi, Yahatahigashi-ku,  
Kitakyushu, Fukuoka 805-0050, Japan  
e-mail: nmorisad7599@yahoo.co.jp

N. Morisada · T. Morishita · T. Miyakawa · A. Shirahata ·  
K. Kusuhara  
Department of Pediatrics,  
University of Occupational and Environmental Health,  
Kitakyushu, Japan

N. D. Rendtorff · L. Tranebjærg  
Wilhelm Johannsen Centre for Functional Genome Research,  
Section of Genetics, Department of Cellular and Molecular  
Medicine, The Panum Institute, University of Copenhagen,  
Copenhagen, Denmark

K. Nozu · K. Iijima · M. Matsuo  
Department of Pediatrics,  
Kobe University Graduate School of Medicine,  
Kobe, Japan

T. Matsumoto  
Matsumoto Clinic,  
Kitakyushu, Japan

S. Hisano  
Department of Pathology, Faculty of Medicine,  
Fukuoka University,  
Fukuoka, Japan

L. Tranebjærg  
Department of Audiology, Bispebjerg Hospital,  
Copenhagen, Denmark



vesico-ureteral reflux (VUR) [3]. BOR syndrome is associated with several genetic mutations in the eyes: absent homolog 1 gene (*EYAI*, 8q13.3) [4], the sinus oculis homeobox homolog 1 gene (*SIX1*, 14q23.1-q24.3) [5], the sal-like 1 gene (*SALL1*, 16q12.1) [6], the sinus oculis-related homeobox homolog 5 gene (*SIX5*, 19q13.3) [7], and in an unidentified gene on 1q31 [8]. *EYAI* mutations are considered to be a major cause of BOR syndrome in Japanese patients [2]. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) has been developed as a novel method for the detection of deletions or duplication of one or more exons in various human disease genes [9], but there is only one report of *EYAI* deletion detected by MLPA [10].

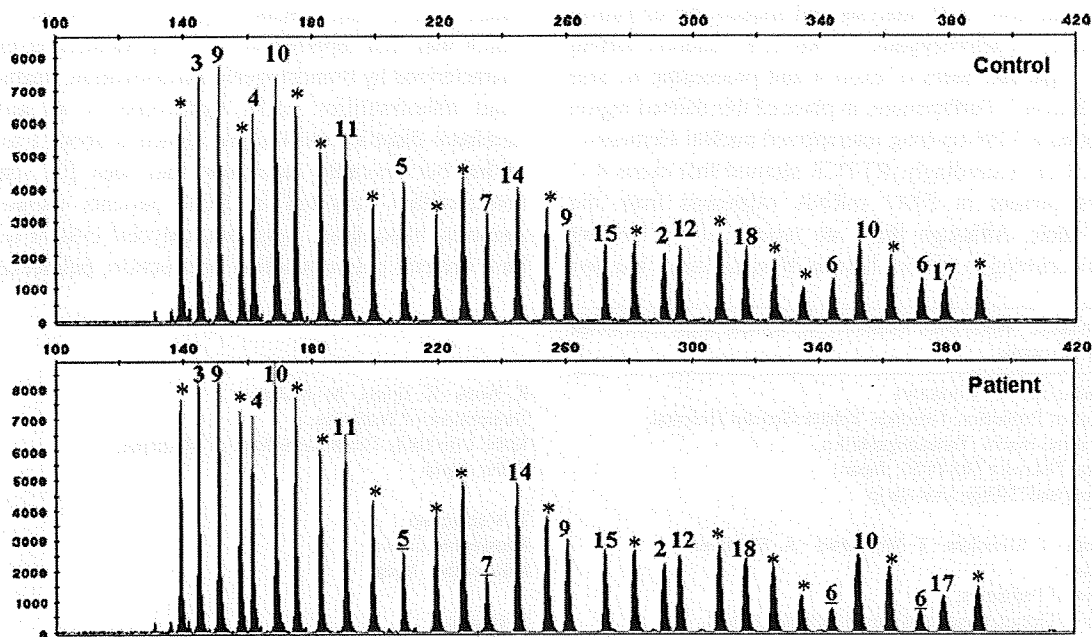
Recent whole genome studies revealed that mammalian genomes are littered with enormous numbers of transposable elements [11]. The long interspersed nuclear element-1 (LINE-1, L1) is the most abundant retrotransposon in the human genome, and its insertion into protein-coding sequences abolishes gene functions or creates novel gene function [12]. There have been some reports of the disorder by L1 element insertion, but few reports of L1 element insertion causing human disorder, especially hereditary kidney disease [13].

Here we report a case of BOR syndrome with a partial *EYAI* deletion detected by MLPA analysis. Subsequent investigation showed that the mutation was caused by L1 element insertion into the *EYAI* gene.

### Case report

A girl was referred to our hospital for further examination of proteinuria at the age of 7, because proteinuria was detected in the annual urinary screening test for Japanese schoolchildren. Her growth, mental development and blood pressure (92/52 mmHg) were normal. She had had bilateral preauricular fistulae and cup-shaped pinnae since birth, but no other malformations were observed. Her hearing loss was confirmed as conductive by audiogram. Computerized tomography (CT) of the temporal bone showed bilateral developmental abnormalities of the mastoid and coalescence of the left auditory ossicles. She was one of a pair of dizygotic twins, but none of her relatives, including her co-twin, had renal disease, auditory disorder, or any other overt malformations.

Ultrasound revealed bilateral small kidneys (left kidney: 63×32 mm, right kidney: 56×30 mm). Blood test showed elevated blood urea nitrogen (11.1 mmol/l, normal 2.9–7.9), serum creatinine (85.0 μmol/l, normal 35.4–70.8), and uric acid (512 μmol/l, normal 137–208) levels. Estimated creatinine clearance was calculated to be 55 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> (Schwartz formula) [14]. Hemoglobin (12.7 g/dl, normal 11.5–15.0), total cholesterol (4.09 mmol/l, normal 3.31–6.62), immunoglobulins (IgG 1,053 mg/dl, normal 870–1,700, IgA 147 mg/dl, normal 110–410), and complement



**Fig. 1** Detection of deletion of *EYAI* exons by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis. DNA from a normal individual (control) and the patient was subjected to *EYAI* MLPA analysis, and the amounts of amplified target sequence were analyzed in an ABI Prism 3130XL genetic analyzer. The P153 probe mix for *EYAI* includes probes for 14 *EYAI* exons (exons numbers are

indicated), and 14 control probes (indicated by asterisks). The patient is heterozygous for a deletion covering, at least, exons 5–7 in *EYAI* (transcript variant NM\_000503.4), as revealed by the lower peaks obtained from these three exons compared with peaks obtained with control individuals

components (C3 9.9 g/l, normal 6.5–13.5, C4 2.2 g/l, normal 1.3–3.5) were normal. Total urinary protein obtained for 24 h was 0.23 g/day. Hematuria was not observed. Vesico-ureteral reflux was not observed in either side of the ureter by voiding cystourethrography (VCG). These findings were compatible with BOR syndrome. To confirm the diagnosis, we performed molecular genetic analysis after informed consent was obtained from the patient and her parents.

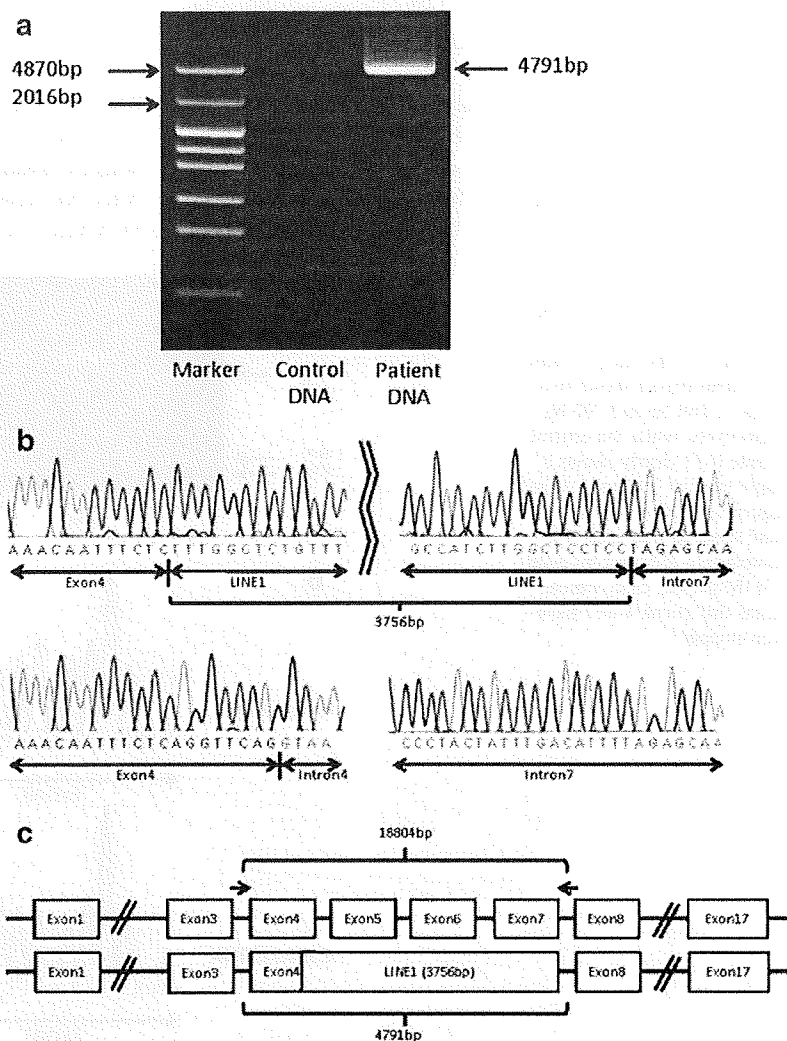
**Materials and methods**

**Genetic analysis by MLPA**

Genomic DNA was extracted from mononuclear cells from the patient's peripheral blood with a Qiagen kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA), according to the manufacturer's

instructions. In order to investigate whether an *EYA1* deletion or duplication was causing the BOR syndrome symptoms in the patient, MLPA was performed. MLPA detects larger deletions or duplications of one or more exons, but not inversions. The MLPA-EYA1 kit (P153) has recently become available and was purchased from MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands). The *EYA1* probe mix contains 17 probes for 14 of the 18 *EYA1* exons (for three exons two different probes are present) and 14 control probes. In the current version of the kit, no probes are included for exon 8, 13, and 16 (transcript variant NM\_000503.4). However, these exons are in close proximity to neighboring exons, with introns 8, 13, and 16 spanning 404, 112, and 105 bp respectively. MLPA experiments were performed essentially as described by MRC-Holland (<http://www.mrc-holland.com/pages/indexpag.html>). Amplification products were identified and quantified by capillary electrophoresis on an ABI 3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster

**Fig. 2** Characterization of a ~17-kb genomic deletion in combination with insertion of an L1 element into the *EYA1* gene. **a** PCR amplifications of genomic DNA using primers annealing to introns 2 and 8 respectively. A band of 4,791 bp was seen in the patient DNA, but not in the control. The length from exon 3 to exon 8 was shortened by a genomic deletion and insertion of an L1 element in the patient. **b** Direct sequence revealed a deletion of the last eight bases of exon 4 and all sequences up to bp 1,218 of intron 7 and insertion of an L1 element of 3,756 bases. The L1 element does not have a poly (A) tail. **c** Schematic representation of the mutant allele compared with the normal allele



City, CA, USA). Peak heights were normalized and deletions were suspected when the peak height was lower than 62% of the controls.

In the present case, the MLPA analysis identified a heterozygous *EYA1* deletion confined to, at least, exons 5–7 compared with transcript variant NM\_000503.4 (Fig. 1). Among the neighboring exons, exons 4 and 9 were amplified normally. However, since the *EYA1* MLPA kit contains no probe for exon 8, we could not exclude the possibility that exon 8 is deleted, although exon 8 is close to exon 9 at a distance of 404 bp. In the parents of the patient we did not detect any mutation in *EYA1* by MLPA, so the deletion was found to be a de novo mutation.

### Long-range PCR and sequencing of patient DNA

Based on the MLPA result, we conducted further analysis of the patient DNA by polymerase chain reaction (PCR) in order to obtain a fragment spanning the aberrant chromosomal junctions. Specific exons of *EYA1* were amplified by PCR using the primers 5'-AGGCAGATGTGCTGAAGTTGT-3' and 5'-ACACAGCCCTTCCTTGTGTA-3', in intron 3 and intron 7 respectively. PCR products from the patient DNA showed a band of 4,791 bp (Fig. 2a). The PCR-amplified products were purified and sequenced by primer walking using the Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA) and

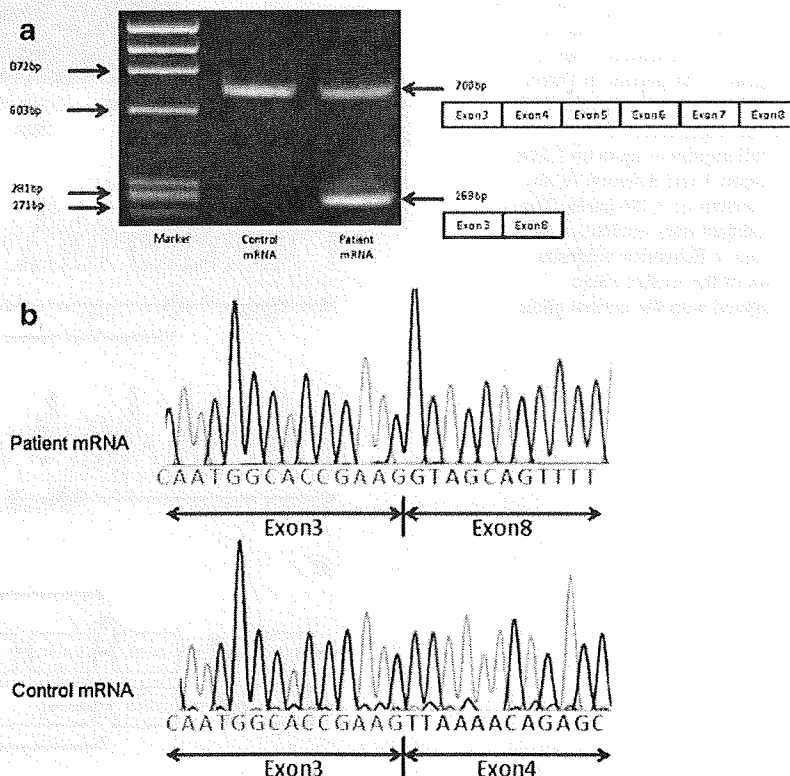
an ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequencing revealed a 17,770-bp *EYA1* deletion starting from the last eight bases of exon 4 and proceeding to bp 1,217 of intron 7. Furthermore, in place of this deleted region was inserted an L1 element of 3,756 bases (Fig. 2b). These results confirmed the deletion of exons 5–7 detected by MLPA and additionally identified the exact deletion break point junctions. Since the deletion starts from the eight last bases of exon 4, the deletion thereby includes the splice donor site for this exon. The MLPA did not detect the eight bases deleted in the 3' end of exon 4, as the MLPA probe for this exon is located in the 5' end of exon 4.

The inserted L1 element contains no poly (A) tail and is integrated in antisense orientation with respect to *EYA1*. Interestingly, the break point in intron 7 was located within a 316-bp repeat element (LIME4a) belonging to the L1 element class of repeats.

### RT-PCR analysis

Finally, we performed mRNA expression analysis using peripheral blood mononuclear cells from the patient. Total RNA was isolated by using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and reverse-transcribed onto cDNA by using random hexamers and the Superscript III kit (Invitrogen). After 40 cycles of PCR amplification using the primers 5'-TCAAGCCAGTTCAGATGTTGC-3', and 5'-ATGTGCTG

**Fig. 3** Transcript abnormality in the *EYA1* gene. **a** RT-PCR using primers in exons 2 and 9 respectively. The sample from the patient (*right*) shows two bands of 268 bp and 700 bp respectively, while the control sample (*left*) clearly shows a single band of 700 bp. **b** Direct sequence of the lower RT-PCR band revealed that exon 3 is immediately followed by exon 8 in the present case, which means that exons 4 to 7 have been skipped



GATACGGTGAGC-3', nested PCR was performed using the primers 5'-CAGATGTTGCTGTTTCCTCAA-3' and 5'-TGGCCAAAAGTGGGATAAGAC-3', annealing to exon 2 and 9 respectively. PCR products were separated on 2% agarose gel and also sequenced with a DNA sequencer. We used the Human Kidney cDNA library (Invitrogen) to obtain normal control kidney cDNA. PCR products from the patient's sample showed two bands, one having the same size as the control and the other one being shorter (Fig. 3a). Sequencing of the shorter PCR product revealed the complete absence of exons 4 to 7, and consequently, exon 3 was directly joined to exon 8 (Fig. 3b). These results demonstrated that the allele with the *EYAI* deletion in combination with L1 element insertion on the mRNA level caused skipping of *EYAI* exons 4 to 7 and that this mutation created no novel splice donor site.

On the mRNA level deletion of exons 4–7 is predicted to lead to deletion of 432 bases; c.124\_432del309 (according to transcript variant NM\_000503.4). On the protein level this is predicted to lead to an in-frame deletion of 144 amino acids, p.Val42\_Gln185del in *EYAI*.

## Discussion

Our patient with conductive hearing loss, preauricular fistulae, and renal insufficiency was diagnosed as having BOR syndrome caused by *EYAI* mutations due to L1 retrotransposon insertion by genetic analysis. *EYAI* encodes a protein tyrosine phosphatase that plays a critical role in signal transduction during the process of human ear and kidney formation [15]. Although recent studies indicate a lower frequency of *EYAI* gene mutation [16], deletions and duplications in *EYAI* have been identified in up to 20% of BOR patients [17]. Therefore, prior to sequencing of *EYAI* (17 PCRs per patient), we performed *EYAI* MLPA analysis (one ligation and one PCR per patient). When applied in this order, the two methods provide the most time- and cost-efficient strategy for molecular diagnosis of *EYAI* [16] compared with previous methods used for identifying *EYAI* rearrangements including Southern blotting [4, 18] and semiquantitative PCR [16]. The advantage of MLPA analysis compared with other methods such as semiquantitative and long-range PCR is that all exons can be analyzed at the same time in a single reaction tube. One previous study identified deletion of exon 9 in a familial case and deletion of exons 9–10 in a sporadic case respectively by applying MLPA analysis of *EYAI* [11]. The present study is the second report identifying partial *EYAI* deletion by MLPA analysis. As MLPA is more rapid and sensitive compared with previous technologies, we believe that it is the most appropriate method for the first step of mutational screening of the *EYAI* gene [19].

Subsequent to MLPA analysis we analyzed genomic DNA by PCR in order to precisely determine the break points of this large deletion. Interestingly, we detected, in combination with the deletion, the presence of an L1 element inserted between the final 9 bp of exon 4 and bp 1,218 of intron 7 in the *EYAI* gene. L1 belongs to the retrotransposons that are mobile elements, and the most abundant and the only active autonomous non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons in the human genome [14]. There are some reports of L1 element insertion causing various human diseases, but L1 retrotransposon-associated large genomic deletions have rarely been reported. *EYAI* gene mutation by short interspersed nuclear elements (SINE) retrotransposon was reported by Abdelhak et al. [20]. They reported that the Alu sequence was inserted into the exon 10 of the *EYAI* gene. Therefore, to the best of our knowledge, our patient is the first case of *EYAI* mutation by L1 element insertion.

In conclusion, we report the first case of BOR syndrome caused by a large *EYAI* gene deletion associated with L1 insertion. We believe that this report provides useful insight into the association of L1 transposition and human disease.

**Acknowledgements** The authors thank Dr. N. Fujimoto and Prof. T. Matsumoto, Department of Urology, Dr. T. Miyamoto and Dr. M. Tamura, Kidney Center, University of Occupational and Environmental Health, Japan, and laboratory technician Marianne Lodahl, Wilhelm Johannsen Centre for Functional Genome Research, The Panum Institute, University of Copenhagen, Denmark. We would like to acknowledge financial support of these studies from the Lundbeck Foundation and Widex AS.

**Disclosure** A Health Labour Sciences Research Grant for the Research on Measures for Intractable Diseases (H21-nanchi-ippan-103 to K.I. and K.N.).

## References

1. Melnick M, Bixler D, Silk K, Yune H, Nance WE (1975) Autosomal dominant branchiootorenal dysplasia. Birth Defects Orig Artic Ser 11:121–128
2. Okada M, Fujimaru R, Morimoto N, Satomura K, Kaku Y, Suzuki K, Nozu K, Okuyama T, Iijima K (2006) *EYAI* and *SIX1* gene mutations in Japanese patients with branchio-oto-renal (BOR) syndrome and related conditions. Pediatr Nephrol 21:475–481
3. Chen A, Francis M, Ni L, Cremers CW, Kimberling WJ, Sato Y, Phelps PD, Bellman SC, Wagner MJ, Pembrey M, Smith RJH (1995) Phenotypic manifestations of branchio-oto-renal syndrome. Am J Med Genet 58:365–370
4. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Weil D, Cruaud C, Sahly I, Leibovici M, Bitner-Glindzicz M, Francis M, Lacombe D, Vigneron J, Charachon R, Boven K, Bedbeder P, Van Regemorter N, Weissenbach J, Petit C (1997) A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. Nat Genet 15:157–164
5. Ruf RG, Berkman J, Wolf MTF, Nurunberg P, Gattas M, Ruf EM, Hyland V, Kromberg J, Glass I, Macmillan J, Otto E, Numberg G,