

る。

これまで報告された頻度、およびタイプ別割合の結果を表2にまとめた。表現型によるタイプ分類の割合はタイプ1で17.7%~50.0%、タイプ2で12.2%~82.3%、タイプ3では0%~20%となっており、国により大きなばらつきがみられている^{10)~12), 15)}。本調査ではタイプ1は25.4%、タイプ2は45.8%、タイプ3は28.8% (図2b)であり、諸外国と大きく相違ない頻度と思われた。しかし、判定できない症例が46.8%であり、この結果は分類基準の曖昧さが原因と思われた。Usher症候群のタイプ分類に関する報告の中から、症状(あるいは表現型)における記載を表5にまとめた。タイプ1では難聴については先天性の高度~重度難聴⁶⁾、前庭機能障害がみられる^{6), 12)}との記述でほぼ統一されていたが、検査内容(温度刺激検査など)の記載はないものがほとんどであった。また“balance deficiency”といった記述¹⁷⁾もあり、前庭機能に関する検査、もしくはめまいの訴えのいずれに基づいた判定なのか迷う表現が多かった。またタイプ2では前庭機能は正常であるという表現で統一されていた^{12)~16)}が、難聴は発症時期、重症度、および聴力像において表現がさまざまであった^{11), 12), 16)~18)}。さらにタイプ3では進行する難聴⁶⁾との記述は統一されていたが、発症時期¹⁹⁾、および前庭機能障害の進行の有無も含めて記述にばらつきがあり^{20)~22)}、一部¹⁵⁾を除いて難聴の進行の定義を記述しているものはなかった。曖昧さを解消するために、また本邦でUsher症候群の実態調査を進めて行くにあたり、どの施設でも統一されたタイプ

分類が可能になるような方法を考えていく必要があると思われた。

今回の調査結果は日本耳鼻咽喉科学会の定める認可研修施設を5年間に受診した患者数を示すものであり、「耳鼻咽喉科で経過観察されているUsher症候群の患者概数」と言い換えることもできる。岩崎らは本邦のUsher症候群患者の頻度としては10万人あたり6.7人と報告している¹⁴⁾が、本研究においてはわずか111名しか把握することができなかった。患者数が極端に少ない理由として、まずUsher症候群患者であっても耳鼻咽喉科を受診していない場合が挙げられる。タイプ2、3の患者では眼科を受診しても難聴が軽度~中等度であれば補聴器を使用せず、必ずしも耳鼻咽喉科を受診しない場合があるとされる¹⁴⁾。当院では網膜色素変性症患者は全例当科に紹介してもらい、聴力検査を実施している。難聴を認めた患者に対しては、了解の上遺伝子検査、前庭機能検査(重心動揺検査、温度刺激検査)を施行している。その結果、難聴の自覚のない患者の中に聴力検査で初めて聴力障害が指摘された症例もあり、より多くのUsher症候群患者を診断することができている(岩崎ら、投稿中)。

もう一つの原因として耳鼻咽喉科を受診してもその後経過観察されていないことが考えられる。従来はUsher症候群患者に対する耳鼻咽喉科の診断・治療に対する介入の選択肢が乏しく、ほとんどの症例で定期的経過観察ができていなかったと思われる。診断では、近年遺伝子検査が盛んになっており、Usher症候群においても現在

表5 Usher症候群タイプ分類の報告で、難聴と前庭機能に関する記述

	難 聴	前庭機能
タイプ1	・ congenital severe to profound hearing loss ¹⁶⁾	・ vestibular areflexia ⁶⁾ ・ no vestibular response ¹²⁾ ・ balance deficiency ¹⁷⁾
タイプ2	・ congenital non-progressive moderate to severe hearing loss which is milder in the low frequencies ¹¹⁾ ・ congenital mild to severe hearing loss ¹²⁾ ・ congenital moderate to severe hearing loss ¹⁶⁾ ・ moderate to severe hearing impairment that is in most cases stable ¹⁷⁾ ・ congenital, moderate to severe, high frequency sloping hearing impairment ¹⁸⁾	・ regular vestibular response ¹²⁾ ・ normal vestibular function ¹⁶⁾
タイプ3	・ progressive hearing loss ⁶⁾ ・ congenital or early onset progressive hearing loss ¹⁹⁾	・ valiable vestibular function ²⁰⁾ ・ progressive vestibular loss ²¹⁾ ・ with or without vestibular impairment ²²⁾

までに9種の原因遺伝子(タイプ1: MYO7A、USH1C、CDH23、PCDH15、USH1G、タイプ2: USH2A、GPR98、WHRN、タイプ3: CLRN1)が明らかになっている²¹⁾。アメリカやヨーロッパなどにおいては遺伝子検査が普及し、最近では唾液から抽出したDNAサンプルに対し、マイクロアレイ法を用いてUsher症候群のスクリーニング検査を行い、早期診断の報告がなされている²¹⁾。しかし難聴の原因遺伝子において日本人で見出される変異は欧米人に見出される変異部位と大きく異なっていることが明らかとされており、これは創始者効果によるものであることが証明されている²³⁾。よってUsher症候群に関しても本邦での遺伝子検査が必須であると思われる。本邦では現在までにUsher症候群患者でMYO7A、CDH23、USH2Aの遺伝子変異が報告されており^{24)~26)}、今後も更に遺伝子診断とそのスクリーニング検査により診断率が向上すると考えられる。

また治療は、従来先天性高度~重度感音難聴を呈するタイプ1患者は、従来補聴器を使用し、聾学校へ通学するという選択肢しかなかったと思われる。しかし最近では新生児聴覚スクリーニングにより難聴が早期に発見され、人工内耳の発達によって高度難聴児でも聴覚を活用し、言語発達を促すことが可能になってきた²⁷⁾。現在までに人工内耳埋め込み術を施行された乳幼児の中にタイプ1患者が含まれている可能性はあると思われる。このような症例では将来的に視覚障害が進行することが予想され、人工内耳による聴覚活用の有用性がコミュニケーション手段としてより重要になってくることが考えられる。今後遺伝子検査により早期にUsher症候群の診断が可能になれば、補聴器や人工内耳による適切な治療方法を考える上で貴重な情報となる可能性がある。

Usher症候群の疫学調査において、ヨーロッパではデータベースに登録されている患者、また患者の会から患者抽出を行っている。また本邦においてもプリオン病ではサーベイランスが開始され全国を10のブロックに分け、各ブロックに委員が配置されて全例調査が行われている²⁸⁾。また稀少難治性皮膚疾患(天疱瘡、表皮水疱症、膿疱性乾癬)では難治性疾患克服研究事業治療研究対象疾患の医療費受給申請時に提出される臨床調査個人票により各都道府県から厚生労働省にオンラインでデータが集積され、データベース化されている。Usher症候群においてより正確な実態把握をしていくためには、上記手段を参考にデータベース作成していくことが緊要である。またその際は眼科医と連携し共同研究の協力体制構

築が必要とも考える。

まとめ

- ・日本耳鼻咽喉科学会の定める認可研修施設(全国697施設)を対象にUsher症候群に関するアンケート調査に基づいた初めての全国実態調査を行った。
- ・耳鼻咽喉科においては大学病院(分院含む)にて経過観察されていることが多いことが明らかとなった。
- ・タイプ分類に関して容易にどの施設でも統一された分類が可能となる方法を工夫する必要があると思われる。
- ・Usher症候群をより実数に近い形で把握するためには、患者データベースの作成が必要と考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、アンケート調査へご協力いただいた日本耳鼻咽喉科学会の定める認可研修施設に謝意を表します。

本研究は厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業の研究助成により行われた。

参考文献

- 1) Von Graefe A.: Exceptionelles Verhalten des Gesichtsfeldes bei pigmentartiger Netzhaut. *Von Graefe's Arch Ophthalmol* 4: 250-253, 1858.
- 2) Usher CH.: On the inheritance of retinitis pigmentosa, with notes of cases. *R Lond Ophthalmol Hosp Rep* 19: 130-236, 1914.
- 3) Lindenov H.: The Etiology of Deaf-Mutism, with Special Reference to Heredity. *Op Ex Domo Biol Hered Hum* 8: 1-268, 1945.
- 4) Hallren B.: Retinitis pigmentosa combined with congenital deafness, vestibulo-cerebellar ataxia and mental abnormality in a proportion of cases. A clinical and genetic statistical study. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 34 (suppl 138): 1-101, 1959.
- 5) Davenport SLH, Omenn GS.: The heterogeneity of Usher Syndrome. Amsterdam Excerpta Media Foundation. *International Congress ser abstr* 215: 87-88, 1977.
- 6) Kimberling WJ, Moller C.: Clinical and molecular genetics of Usher syndrome. *J Am Acad Audiol* 6: 63-72, 1995.
- 7) Nuutila A.: Dystrophia retinae pigmentosa-

- dysacusis syndrome (DRD) : a study of the Usher or Hallgren syndrome. *J Genet Hum* 18 : 57-88, 1970.
- 8) Boughman JA, Vernon M, Shaver KA. : Usher syndrome : definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chron Dis* 36 : 595-603, 1983.
- 9) Grøndahl J. : Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and Usher syndrome in Norway. *Clin Genet*. 31 : 255-264, 1987.
- 10) Rosenberg T, Haim M, Hauch A, et al. : The prevalence of Usher syndrome and other retinal dystrophy-hearing impairment associations. *Clin Genet* 51 : 314-321, 1997.
- 11) Hope CI, Bunday S, Proops D, et al. : Usher syndrome in the city of Birmingham-prevalence and clinical classification. *Br J Ophthalmol* 81 : 46-53, 1997.
- 12) Spandau UH, Rohrschneider K. : Prevalence and geographical distribution of Usher syndrome in Germany. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240 : 495-498, 2002.
- 13) 大鳥利文、法 貴隆、越智信行、須田秩史、羽白多恵子、他 : Usher症候群についての眼科的研究. *臨眼* 32 : 423-430, 1978.
- 14) 岩崎 聡、橋本泰幸、浜田 登、渡邊高弘、名倉三津佳、他 : アンケート調査による網膜色素変性症と難聴・耳鳴の頻度. *Otol Jpn* 16 : 37-41, 2006.
- 15) Pakarinen L, Karjalainen S, Simola KOJ, et al. : Usher's syndrome type 3 in Finland. *Laryngoscope* 105 : 613-617, 1995.
- 16) Kimberling WJ, Moller CG, Davenport SL, et al. : Usher syndrome : clinical findings and gene localization studies. *Laryngoscope* 99 : 66-72, 1989.
- 17) El-Amraoui A, Petit C. : Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J Cell Sci* 118 : 4593-4603, 2005.
- 18) Cohen M, Bitner-Glindzicz M, Luxon L. : The changing face of Usher syndrome : clinical implications. *Int J Audiol* 46 : 82-93, 2007.
- 19) Bonnet C, Grati M, Marlin S, et al. : Complete exon sequencing of all known Usher syndrome genes greatly improves molecular diagnosis. *Orphanet J Rare Dis* 11 : 21, 2011.
- 20) Cremers FP, Kimberling WJ, Külm M, et al. : Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet* 44 : 153-160, 2007.
- 21) Kimberling WJ, Hildebrand MS, Shearer AE, et al. : Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet Med* 12 : 512-516, 2010.
- 22) Ebermann I, Wilke R, Lauhoff T, et al. : Two truncating USH3A mutations, including one novel, in a German family with Usher syndrome. *Mol Vis* 30 (13) : 1539-1547, 2007.
- 23) Usami S, Wagatsuma M, Fukuoka H, et al. : The responsible genes in Japanese deafness patients and clinical application using Invader assay. *Acta Otolaryngol* 128 : 446-454, 2008.
- 24) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, et al. : Identification of 11 novel mutations in USH2A among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin Genet* 76 : 383-391, 2008.
- 25) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, et al. : Mutation analysis of the MYO7A and CDH23 genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. *J Hum Genet* 55 : 796-800, 2010.
- 26) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, et al. : Novel USH2A mutations in Japanese Usher syndrome type 2 patients: marked differences in the mutation spectrum between the Japanese and other populations. *J Hum Genet* 56 : 484-490, 2011.
- 27) 宇佐美真一 : 難聴の遺伝子診断. *日本臨床* 69 : 357-367, 2011.
- 28) Nozaki I, Hamaguchi T, Sanjo N, et al. : Prospective 10-year surveillance of human prion diseases in Japan. *Brain* 133 : 3043-3057, 2010.

論文受付 23年10月26日
論文受理 24年2月15日

別刷請求先 : 〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1
信州大学医学部耳鼻咽喉科学教室 吉村 蒙兼



◆特集・知っておきたい耳鼻咽喉科領域における症候群 眼症状を伴うもの

工 積*

Abstract 耳鼻咽喉科疾患における眼症状合併率は少なくなく、特に難聴児では眼科異常合併率が40~60%と高く、コミュニケーション手段の習得に大きな影響を及ぼす。感音難聴に網膜色素変性症を伴う Usher 症候群、感音難聴に虹彩色素異常などを伴う Waardenburg 症候群、進行性感音難聴と腎障害および水晶体異常などを伴う Alport 症候群、進行性感音難聴に偽網膜腫瘍や精神発達遅滞を伴う Norrie 病などが難聴との関連が深い症候群として挙げられる。

Key words Usher 症候群(Usher syndrome), 網膜色素変性症(retinitis pigmentosa), Waardenburg 症候群(Waardenburg syndrome), 虹彩色素異常(iris heterochromia), Alport 症候群(Alport syndrome), 円錐水晶体(lenticonus), Norrie 病(Norrie disease)

はじめに

日常の耳鼻咽喉科診療において、その解剖学的・神経学的理由から眼症状を伴う場合は少ない。最近の大規模な論文検索によると、特に難聴児における眼科異常合併率が40~60%と高く、コミュニケーション手段の習得に大きな影響を及ぼすとともに、生活のQOLを大きく低下させているとされている¹⁾²⁾。よって本稿では難聴との関連が深い下記症候群を中心に解説する。

Usher 症候群

1. 疾患概念

感音難聴に網膜色素変性症を伴う常染色体劣性遺伝性疾患であり、盲聾患者の約半数を占める最多の疾患である³⁾。

2. 歴史

「感音難聴に網膜色素変性症を伴う疾患」として1858年に von Graefe により初めて報告され⁴⁾、1914年に Usher が遺伝的側面についても言及し、「Usher 症候群」として報告した⁵⁾。その後、1945

年に Lindenov により Usher 症候群は常染色体劣性遺伝形式であることが報告され⁶⁾、1959年には Hallgren が Usher 症候群には少なくとも2つのタイプがあり、タイプの違いは原因遺伝子によるものと仮説を立てた⁷⁾。1977年に Davenport らにより難聴の程度や前庭機能障害の有無などの臨床症状により4つのタイプに分類された⁸⁾。しかし、X連鎖劣性遺伝形式をとるとされたタイプ4症例は連鎖解析にて常染色体劣性遺伝形式であることが判明し⁹⁾、以後 Usher 症候群はタイプ1~3の3つにタイプ分類されている。

3. 頻度

海外の報告で人口10万人あたり3.0~6.2人と報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。本邦では岩崎らの網膜色素変性症患者を対象とした自覚症状に基づいたアンケート調査で、人口10万人あたり6.7人であり諸外国と類似した頻度が報告されている¹²⁾。

4. 診断

難聴の程度や前庭機能障害の有無などの臨床症状により、以下のタイプ1~3の3つに分類されている¹³⁾。

* Takumi Yutaka, 〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部耳鼻咽喉科学教室, 准教授

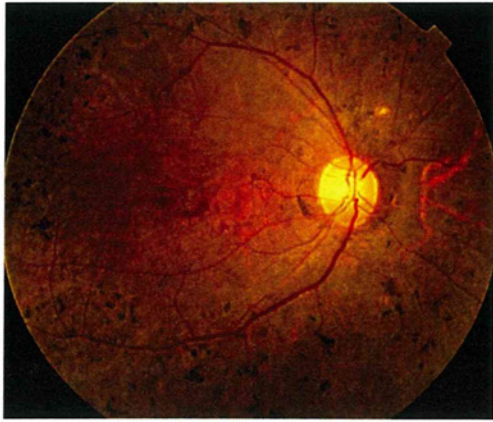


図 1. 網膜色素変性症進行例の眼底写真
(日本眼科学会 HP より引用)

タイプ1: 幼少期より高度難聴および前庭機能障害を呈する。視覚症状は10歳前後より生じる。

タイプ2: 若年期より高音漸傾型の難聴を呈する。視覚症状は思春期以降に生じる。前庭機能障害を伴わない例が多い。

タイプ3: 難聴、前庭機能障害、視覚症状とも思春期以降に生じ、徐々に進行。

タイプ1の小児の歩行開始は通常よりも遅れる場合が多く、およそ18ヶ月齢~2歳とされている。より年長児で「ぎこちなく」見える場合があり、予期せぬ損傷を負うことが多い。また、自転車に乗ったり、スポーツをするといったような平衡感覚を要する活動に困難を要することもある。網膜色素変性症は網膜の進行性、両側性、左右対称性

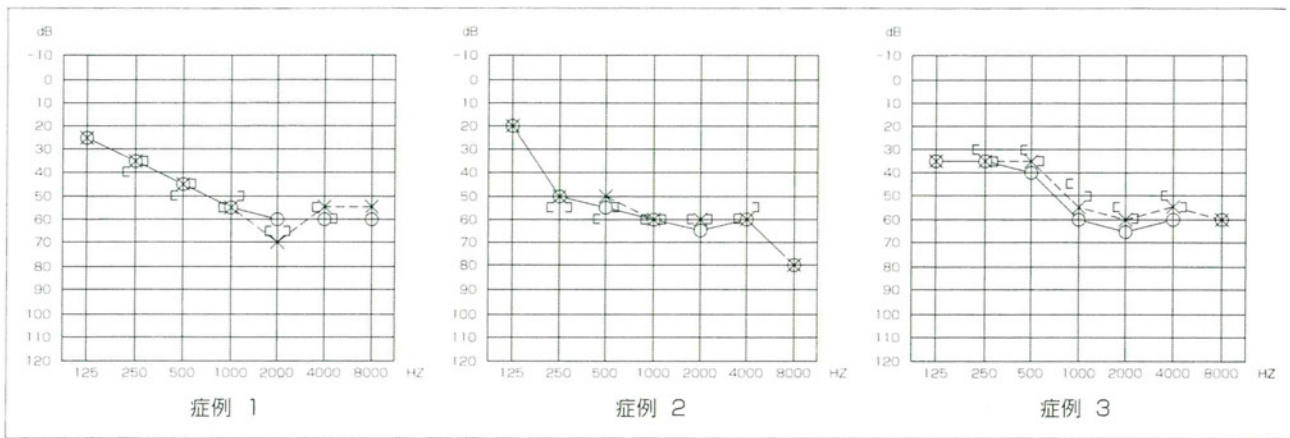


図 2. Usher 症候群タイプ2の3症例(30歳, 42歳, 27歳)の初診時聴力像
初診時年齢が異なっても聴力像は類似している(文献16-図1より改変して引用)

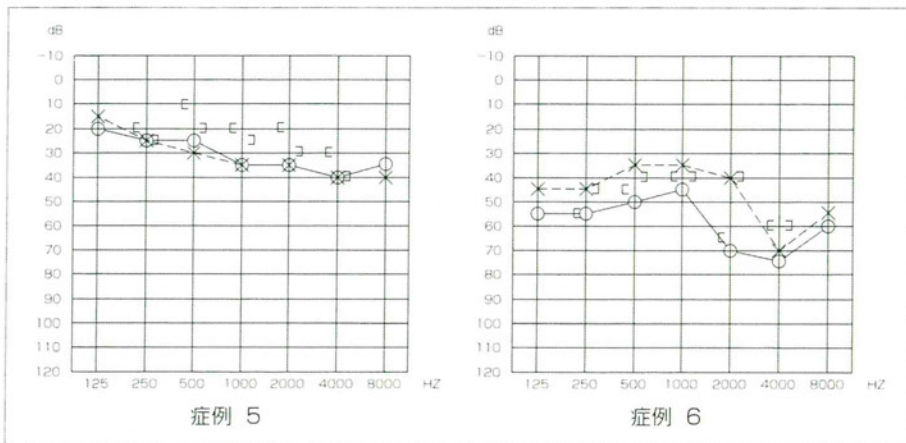


図 3. Usher 症候群タイプ3の2症例(30歳および70歳)の初診時聴力像
初診時年齢が高い方が進行した難聴を呈している(文献16-図1より改変して引用)

表 1. Usher 症候群の原因遺伝子

タイプ1

サブタイプ	遺伝子座	原因遺伝子
USH1A	(14q32)	non existent
USH1B	11q13.5	MYO7A
USH1C	11p15.1	USH1C
USH1D	10q22.1	CDH23
USH1E	21q21	unknown
USH1F	10q21.1	PCDH15
USH1G	17q25.1	USH1G
USH1H	15q22-23	unknown

タイプ2

サブタイプ	遺伝子座	原因遺伝子
USH2A	1q41	USH2A
USH2B	3p23-24.2	unknown
USH2C	5q14.3	GPR98
USH2D	9q32	WHRN

タイプ3

サブタイプ	遺伝子座	原因遺伝子
USH3A	3q25.1	USH3A
USH3B	20q	unknown

(<http://hereditaryhearingloss.org/>と文献 17-表 4 を改変して引用)

の変性であり、周辺から発症する(図 1)。まず杆細胞(暗順応状態で活性化する光受容器)が最初におかされ、初期徴候である夜盲と視野狭窄(トンネル視)を引き起こす。これが重症化して気づかれるようになるまで、非症候群性難聴と誤診される場合が多い。その後徐々に錐体細胞(明順応状態で活性化する光受容器)もおかされ、視野狭窄が進行する¹⁴⁾。視野喪失の速度と程度は家系内でも家系によっても様々であり、30~40歳のタイプ1患者では、通常視野は5~10°である。年ごとに視覚障害は著しく増悪するが、完全失明に至ることはあまりない¹⁵⁾。タイプ2、3は難聴も軽度であり、必ずしも耳鼻咽喉科を受診するとは限らないため、その報告は少ない¹⁶⁾。タイプ2の難聴はほとんど進行しないとされている(図2)が、難聴が進行する非典型的臨床像を示す症例も報告されており¹⁷⁾。遺伝子検査を行う上でも特に注意が必要である。タイプ3の難聴は思春期以降徐々に進行するとされているが、網膜色素変性症の診断が遅れる場合もあり、特発性難聴などとして経過観察されている症例も存在すると考えられる(図3)。

さらに現在までに9種の原因遺伝子が同定されている(表1)。

タイプ1: MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G

タイプ2: USH2A, GPR98, WHRN

タイプ3: USH3A

本邦でも Usher 症候群患者で MYO7A, CDH23, USH2A の遺伝子変異が報告されており、今後も更に遺伝子診断が行われることが期待される^{17)~20)}。

5. 治療

聴覚障害に対しては、先天性高度難聴を呈するタイプ1症例に対しては人工内耳が有効であり、早期からの人工内耳装用により大幅に聴取能の向上が可能である。タイプ2、3患者では難聴が軽度~中等度であれば補聴器を使用せず、必ずしも耳鼻咽喉科を受診しない場合があるとされるため¹²⁾、難聴の自覚の有無にかかわらず網膜色素変

性症に罹患した患者の聴力検査を行うことが望ましい。聴力に応じて補聴器・人工内耳を装用することで、聴取能の向上が可能である。

一方、網膜色素変性症に対しては有効な治療法は確立されておらず、対症的に遮光眼鏡の使用、ビタミン A などの内服、循環改善薬による治療などが行われているが、その効果は限定的である。米国では毛様体神経栄養因子(ciliary neurotrophic factor: CNTF)投与による臨床治験(フェーズII)が行われている²¹⁾。またごく最近、MYO7A 遺伝子変異によるタイプ1B(前述)に対し、LentiVector® 遺伝子導入技術を用いた UshStat® による遺伝子治療が米国 FDA の臨床治験認可(フェーズ I/IIa)となった。遺伝子治療による Usher 症候群の根本的治療に期待が高まっている。

6. 追記

Usher 症候群は聴覚・視覚の重複障害となるため、日常生活に多大な支障をきたす。よって QOL



図 4. Waardenburg 症候群タイプ 1 症例の虹彩色素異常(右眼)と内眼角外側偏位

表 2. Waardenburg 症候群のサブタイプ分類

サブタイプ	1	2(A~D)	3(Klein-WS)	4(Shah-WS)
遺伝形式	常優	常劣	常優	常優/常劣
原因遺伝子	<i>PAX3</i>	<i>MITF</i> , <i>SNAI2</i> 他	<i>PAX3</i>	<i>EDNRB</i> , <i>EDN3</i> , <i>SOX10</i>
難 聴	(+)	(+)	(+)	(+)
内眼角外側偏位	(+)	(-)	(+)	(-)
頭蓋顔面奇形	(+)	(+)	(+)	(+)
色素異常	(+)	(+)	(+)	(+)
筋骨異常	(-)	(-)	(+)	(-)
Hirschsprungs 病	(-)	(-)	(-)	(+)
精神発達遅滞	(-)	(-)	(-)	(+)

(<http://hereditaryhearingloss.org/>と文献 27-Table 1 を改変して引用)

向上のためには特別な支援が必要であり、実態調査や診断基準、治療指針策定を目的に、平成 22 年度より難治性疾患克服研究事業として「Usher 症候群に関する調査研究」(研究代表者:宇佐美真一)が全国 13 施設の共同研究で開始されている¹¹⁾。

Waardenburg 症候群

1. 疾患概念

感音難聴に皮膚や毛髪、虹彩などの色素異常を伴う遺伝性疾患(図 4)であり、常染色体優性および劣性遺伝のいずれの場合もある。内眼角外側偏位や上肢奇形、Hirschsprung 病、精神発達遅滞などの随伴症状によってタイプ分類がなされている²²⁾。

2. 歴 史

1951 年、オランダの眼科医であった Waardenburg によって難聴、虹彩色素異常、前頭部の限局白髪、内眼角・涙点の外側偏位などを有する症候群として報告され²³⁾、後日これにちなんで Waardenburg 症候群(タイプ 1)と名付けられた。1971 年に内眼角外側偏位を伴わないタイプ 2 が報告され²⁴⁾、その後上肢の異常を伴うタイプ 3(Klein-Waardenburg syndrome)²⁵⁾、Hirschsprung 病を

伴うタイプ 4(Waardenburg-Shah syndrome)²⁶⁾が報告されている。

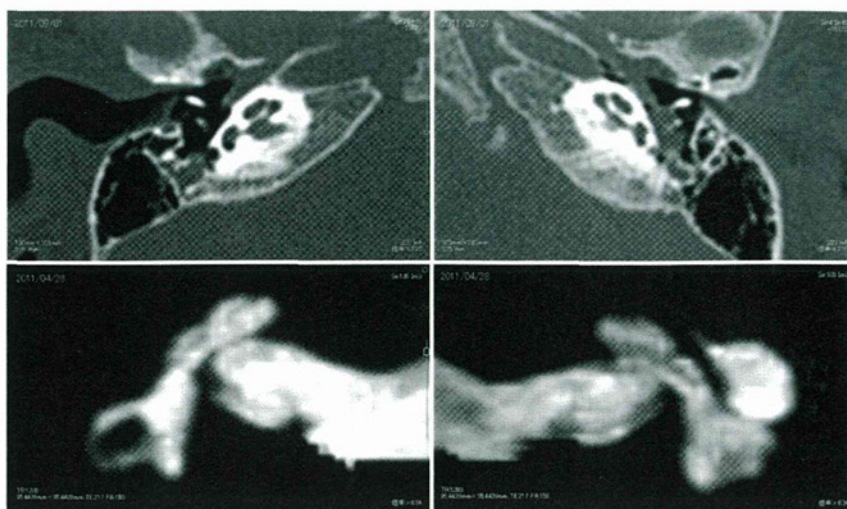
3. 頻 度

これまでの報告では、一般的に 1/32,400~42,000 人の確率で発症すると報告されており、また先天難聴児の 1~3% に認めるとされている²⁷⁾²⁸⁾。

4. 診 断

遺伝形式や随伴症状の種類によって、以下のタイプ 1~4 の 4 つに分類されており(表 2)²⁷⁾、タイプ 1 についてはコンソーシアムにて詳細な診断基準が提唱されている²⁹⁾。常染色体優性遺伝形式をとるものが多いが、タイプ 2、4 の一部は劣性遺伝形式をとり、またタイプ 1、2 が高頻度であると報告されている²⁷⁾³⁰⁾。タイプ 1 とタイプ 3 の原因遺伝子はほとんどが *PAX3* 遺伝子であるとされ随伴症状も似ているが、タイプ 3 のみ上肢骨格筋の異常を伴う。一方タイプ 2 とタイプ 4 の原因遺伝子は様々であり、内眼角外側偏位を伴わない。タイプ 4 のみ Hirschsprung 病や精神発達遅滞を伴う²⁷⁾³¹⁾。タイプ 2 には A~D があるが、原因遺伝子が明らかになっているのは A(*MITF*)と D(*SNAI2*)のみである。タイプ 4 では *SOX10*、

図 5.
 Waardenbrug 症候群タイプ 1 症例の内耳奇形像
 蝸牛の回転数不足と半規管低形成を認める(上段:側頭骨 CT 水平断, 下段:3D-MRI)



EDNRB, EDN3 が明らかとなっている³¹⁾。

5. 治療

Waardenburg 症候群の治療法は現在確立されていない。実生活上で最も問題となる症状は難聴であり、タイプ 1 の 20%、タイプ 2 の 50% に認め、程度は様々で進行する例もあるとされている。また高度難聴児に対しては人工内耳埋込術が行われるようになってきており、その成績も良好との報告が多いが²⁷⁾³²⁾、17% に内耳奇形を、8% に蝸牛奇形を認めるとされており³³⁾、安全な電極挿入のための術前評価が重要である。蝸牛の回転数不足が認められた自験例(図 5)では、柔らかくやや短い電極を選択することで全電極挿入と蝸牛全体の活用が可能であった。

Alport 症候群

1. 疾患概念

進行性感音難聴、腎障害(糸球体腎炎、血尿、腎不全)、眼症状(水晶体異常、白内障)を認める症候群で、IV 型コラーゲンの異常が病因とされている³⁴⁾。遺伝形式は約 85% が X 連鎖性優性遺伝であり、男性がより重症となる。それ以外の約 15% は常染色体劣性遺伝形式をとるが、常染色体優性遺伝形式をとるものもある(後述)。

2. 歴史

血尿を伴う慢性腎炎と進行性感音難聴を有する症候群として、1927 年に Alport によって最初に報告された³⁵⁾。1986 年には難聴の有無や遺伝形式

の違いによる 6 つのタイプの優性形質の Alport 症候群の存在が Atkin らによって報告されている³⁶⁾。その翌年の 1987 年に Flinter の診断基準が作られ³⁷⁾、1996 年には Gregory の診断基準(1996)が作られている³⁸⁾。Flinter の基準は臨床症状のみでできており、① 血尿の家族歴を有する。腎不全の有無は問わない。② 電顕で特徴的な腎糸球体基底膜像(非薄化、層状化、断裂など)がみられる。③ 特徴的な眼所見(円錐角膜、白内障、球状水晶体など)がある。④ 高音域の感音難聴がある。の 4 項目のうち 3 項目以上を満たす場合を Alport 症候群と診断するとしている。一方 Gregory の基準は原因遺伝子が IV 型コラーゲン遺伝子であることが明らかになってから作られたため、臨床症状に加えて遺伝子の異常、遺伝子から産生される蛋白質の異常を検出する分子遺伝学的診断が付け加えられ、10 項目のうち少なくとも 4 項目が該当することが必要とされている。

3. 頻度

一般的な発症頻度はおよそ 1/53,000 人とされ³⁹⁾、末期腎不全に至る患者の 0.3~2.3% を占めるとされているが、正確な頻度は未だ不明である。また、小児腎臓専門医によって顕微鏡的血尿の診断を受けた子どもの約 1/5 は Alport 症候群であるとする報告もある。

4. 診断

難聴は感音難聴で、眼疾患は円錐水晶体、球状水晶体、白内障、黄斑または周辺斑点、隔離症な

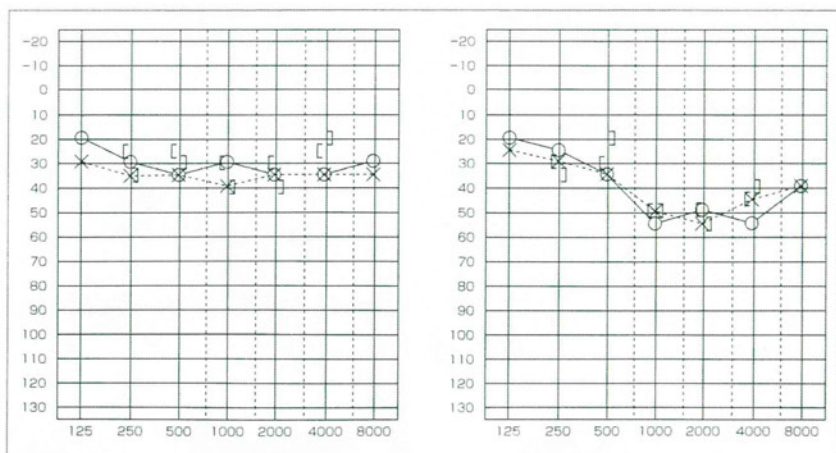


図 6. Alport 症候群(XLAS 疑い男子)での聴力変化(左 13 歳時, 右 18 歳時)



図 7. Alport 症候群にみられた前方円錐水晶体の 1 例 (文献 43 より引用)

どを伴うことがあるが、腎臓病、難聴、眼疾患の順に頻度は低下する(難聴は 30~50% で存在するという報告がある)。なお、網膜色素変性症(RP)を伴った患者の報告例はない。

COL4A5 遺伝子異常により 4 型コラーゲン $\alpha 5$ 鎖に異常が生じて発症する X 連鎖型 Alport 症候群(XLAS)が約 80% と大部分を占め、男性では 40 歳までに 90% が、女性も 12% が末期腎不全に至ると報告されている⁴⁰⁾⁴¹⁾。COL4A3 または COL4A4 遺伝子のホモ接合体変異あるいは複合ヘテロ接合体変異によって発症する常染色体劣性 Alport 症候群(ARAS)は約 15% を占め、①男女間に臨床像の差がない、②両親に近親婚がみられる、③両親に重度の腎症状がみられない等のいくつかを満たすとされ、XLAS の男性と同程度以上の症状を示すとされている⁴²⁾。同じ遺伝子のヘテロ接合体変異によって発症する常染色体優性 Al-

port 症候群(ADAS)は XLAS の男性患者や ARAS より比較的軽症で腎不全も高齢でみられるとされる。

難聴は後天性であり、XLAS 男子は学童期~思春期までに難聴が指摘される(図 6: 当科を受診した XLAS 疑い男子の聴力変化)。初期は聴力検査のみでわかる 2,000~8,000 Hz の閾値上昇を認める程度であるが、男性では徐々に進行して 40 歳時では 80~90% に認め⁴⁰⁾、会話音域の周波数にも及ぶ。一方 XLAS 女子の難聴発症は人生後半である。また、ARAS は若年期より難聴を発症するが性差はなく、ADAS では難聴の発症が非常に遅いとされる。

眼症状として、前方円錐水晶体(図 7)は Alport 症候群に特徴的で、XLAS や ARAS の 15~20% に発症し、通常は学童期~思春期に明らかとなる。黄斑または周辺斑点は Alport 症候群の約 30% に発症するとされている。

5. 治療

根本的な治療方法は存在せず、アンジオテンシン変換酵素阻害薬・アンジオテンシン受容体拮抗薬投与など高血圧に対する基本的治療や腎機能障害に対する投薬などを行うが、腎不全への進行を阻止する治療法はなく、最終的に透析・腎移植を行う。白内障や難聴も基本的治療を行い、高度難聴例に対しては人工内耳装用が有用である。

Norrie 病

Norrie 病は偽網膜膠腫や難聴、精神発達遅滞を

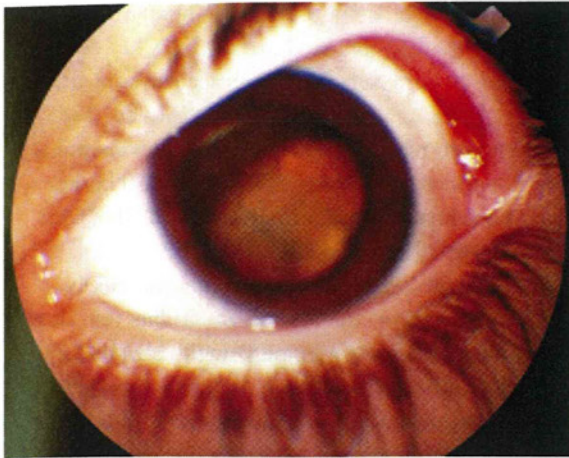


図 8. Norrie 病にみられた偽網膜膠腫の 1 例
(文献 45 より引用)

主徴とする X 染色体劣性遺伝性疾患である。本疾患は *NDP* 遺伝子変異により発症し、家族性滲出性硝子体網膜症 (FEVR) との関連が報告されている⁴¹⁾。病理組織学的には網膜異形成など胎生期における網膜の分化発育阻止を認め、生下時より網膜剥離 (偽網膜膠腫：図 8) を認めることが多い⁴⁵⁾。また 30~50% に精神発達遅滞を認めるとされている⁴⁶⁾。

Norrie 病の男性の多くは、幼少期に始まる進行性感音難聴を呈する (図 9)。初期は軽度で左右非対称であるが、思春期になると高音障害型を呈するようになり、35 歳頃までには高度感音難聴を呈するようになる⁴⁷⁾。病理組織学的には蝸牛血管条の障害が考えられており、後迷路機能は正常である。

その他

その他として、先天性風疹症候群 (先天性感音難聴、先天性白内障など)、CMV 感染症 (感音難聴、髄膜炎、網膜炎など)、原田病 < Vogt-Koyanagi-Harada disease > (感音難聴、ぶどう膜炎、めまいなど)、CHARGE 連合 (虹彩欠損 (C)・心疾患 (H)・後鼻孔閉鎖 (A)・成長障害と精神遅滞 (R)・性器の低形成 (G)・耳介の変形と難聴 (E) など)、Cogan 症候群 (実質性角膜炎、めまい、耳鳴、難聴など)、Stickler 症候群 (進行性近視、網膜剥離、難聴、口蓋裂、骨格異常など) などが挙げられるが、他稿に譲る。

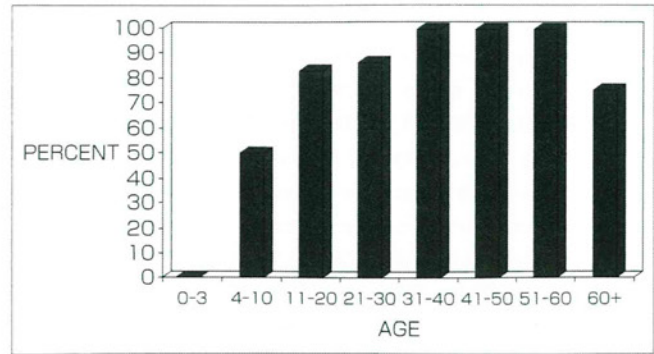


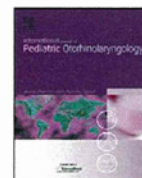
図 9. Norrie 病男子における難聴者の割合
(文献 44 より引用)

参考文献

- 1) Nikolopoulos TP, Lioumi D, Stamataki S, et al : Evidence-based overview of ophthalmic disorders in deaf children : a literature update. *Otol Neurotol*, **27** : S1-24, 2006.
- 2) Falzon K, Guerin M, Fulcher T, et al : Ophthalmological screening of a paediatric cochlear implant population : a retrospective analysis and 12-year follow-up. *Eye (Lond)*, **24** : 1031-1036, 2010.
- 3) Cremers FP, Kimberling WJ, Külm M, et al : Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet*, **44** : 153-160, 2007.
- 4) Von Graefe A : Exceptionelles Verhalten des Gesichtsfeldes bei pigmentenartung der Netzhaut. *Von Graefe's Arch Ophthlalmol*, **4** : 250-253, 1858.
- 5) Usher CH : On the inheritance of retinitis pigmentosa, with notes of cases. *R Lond Ophthalmol Hosp Rep*, **19** : 130-236, 1914.
- 6) Lindenov H : The Etiology of Deaf-Mutism, with Special Reference to Heredity. *Op Ex Domo Biol Hered Hum*, **8** : 1-268, 1945.
- 7) Hallgren B : Retinitis pigmentosa combined with congenital deafness, vestibulo-cerebellar ataxia and mental abnormality in a proportion of cases. A clinical and genetico statistical study. *Acta Psychiatr Neurol Scand*, **34** (suppl 138) : 1-101, 1959.
- 8) Davenport SLH and Omenn GS : The heterogeneity of Usher Syndrome. *Amsterdam Excerpta Media Foundation. International Congress ser abstr*, **215** : 87-88, 1977.

- 9) Kimberling WJ, Möller C : Clinical and molecular genetics of Usher syndrome. *J Am Acad Audiol*. **6** : 63-72. 1995.
- 10) Kimberling WJ, Hildebrand MS, Shearer AE, et al : Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations : Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet Med*. **12** : 512-516. 2010.
- 11) 吉村豪兼, 岩崎 聡, 中西 啓ほか : Usher 症候群の全国アンケート調査結果の検討. *Otol Jpn*. **22**. 2012(印刷中).
- 12) 岩崎 聡, 橋本泰幸, 浜田 登ほか : アンケート調査による網膜色素変性症と難聴・耳鳴の頻度. *Otol Jpn*. **16** : 37-41. 2006.
- 13) Smith RJH, Berlin CI, Hejtmancik JF, et al : Clinical diagnosis of the Usher syndromes. Usher Syndrome Consortium. *Am J Med Genet*. **50** : 32-38. 1994.
- 14) Gregory-Evans K, Bhattacharya SS : Genetic blindness : current concepts in the pathogenesis of human outer retinal dystrophies. *Trends Genet*. **14** : 103-108. 1998.
- 15) Bronya JB Keats, Jennifer Lentz(著) : 窪田美穂, 鳴海洋子(訳) : Gene Reviews Japan : Usher Syndrome Type I (<http://grj.umin.jp/grj/ush1.htm>)
- 16) 橋本泰幸, 岩崎 聡, 名倉三津佳ほか : Usher 症候群タイプⅡ・Ⅲの臨床経過の検討. *Audiology Japan*. **48** : 214-219. 2005.
- 17) 中西 啓, 岩崎 聡, 瀧澤義徳ほか : 非典型的臨床症状を示した *USH2A* 遺伝子変異例. *耳鼻臨床*. **103** : 413-419. 2010.
- 18) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, et al : Identification of 11 novel mutations in *USH2A* among Japanese patients with Usher syndrome type 2. *Clin Genet*. **76** : 383-391. 2008.
- 19) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, et al : Mutation analysis of the *MYO7A* and *CDH23* genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1. *J Hum Genet*. **55** : 796-800. 2010.
- 20) Nakanishi H, Ohtsubo M, Iwasaki S, et al : Novel *USH2A* mutations in Japanese Usher syndrome type 2 patients : marked differences in the mutation spectrum between the Japanese and other populations. *J Hum Genet*. **56** : 484-490. 2011.
- 21) Sieving PA, Caruso RC, Tao W, et al : Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration : phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci USA*. **103** : 3896-3901. 2006.
- 22) Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, et al : Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat*. **31** : 391-406. 2010.
- 23) Waardenburg PJ : A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet*. **3** : 195-253. 1951.
- 24) Arias S : Genetic heterogeneity in the Waardenburg syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser*. **7** : 87-101. 1971.
- 25) Klein D : Historical background and evidence for dominant inheritance of the Klein-Waardenburg syndrome (type III). *Am J Med Genet*. **14** : 231-239. 1983.
- 26) Shah KN, Dalal SJ, Desai MP, et al : White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease : possible variant of Waardenburg syndrome. *J Pediatr*. **99** : 432-435. 1981.
- 27) Kaufmann L, Sauter TB, Lee DJ : Dysplasia of the cerebellum in Waardenburg syndrome : outcomes following cochlear implantation. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. **74** : 93-96. 2010.
- 28) Tamayo ML, Gelvez N, Rodriguez M, et al : Screening program for Waardenburg syndrome in Colombia : clinical definition and phenotypic variability. *Am J Med Genet A*. **146A** : 1026-1031. 2008.
- 29) Farrer LA, Arnos KS, Asher JH Jr, et al : Locus heterogeneity for Waardenburg syndrome is predictive of clinical subtypes. *Am J Hum Genet*. **55** : 728-737. 1994.
- 30) Read AP, Newton VE : Waardenburg syndrome. *J Med Genet*. **34** : 656-665. 1997.
- 31) Pingault V, Ente D, Dastot-Le Moal F, et al : Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat*. **31** : 391-406. 2010.
- 32) Deka RC, Sikka K, Chaturvedy G, et al : Cochlear implantation in Waardenburg syn-

- drome : The Indian scenario. *Acta Otolaryngol.* **130** : 1097-1100, 2010.
- 33) Oysu C, Oysu A, Aslan I, et al : Temporal bone imaging findings in Waardenburg's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* **58** : 215-221, 2001.
 - 34) Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, et al : Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87** : 1606-1610, 1990.
 - 35) Alport AC : Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis. *Br Med J.* **1** : 504-506, 1927.
 - 36) Hasstedt SJ, Atkin CL, San Juan AC Jr, et al : Genetic heterogeneity among kindreds with Alport syndrome. *Am J Hum Genet.* **38** : 940-953, 1986.
 - 37) Flinter FA, Bobrow M, Chantler C : Alport's syndrome or hereditary nephritis? *Pediatr Nephrol.* **1** : 438-440, 1987.
 - 38) Gregory MC, Terreros DA, Barker DF, et al : Alport syndrome--clinical phenotypes, incidence, and pathology. *Contrib Nephrol.* **117** : 1-28, 1996.
 - 39) Levy M, Feingold J : Estimating prevalence in single-gene kidney diseases progressing to renal failure. *Kidney Int.* **58** : 925-943, 2000.
 - 40) Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, et al : X-linked Alport syndrome : natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol.* **11** : 649-657, 2000.
 - 41) Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, et al : X-linked Alport syndrome : natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families : a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol.* **14** : 2603-2610, 2003.
 - 42) Longo I, Scala E, Mari F, et al : Autosomal recessive Alport syndrome : an in-depth clinical and molecular analysis of five families. *Nephrol Dial Transplant.* **21** : 665-671, 2006.
 - 43) Al-Mahmood AM, Al-Swailem SA, Al-Khalaf A, et al : Progressive posterior lenticonus in a patient with alport syndrome. *Middle East Afr J Ophthalmol.* **17** : 379-381, 2010.
 - 44) Sims KB : NDP-Related Retinopathies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1331/>), Gene Reviews (Internet). Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al, ed.
 - 45) Allen RC, Russell SR, Streb LM, et al : Phenotypic heterogeneity associated with a novel mutation (Gly112Glu) in the Norrie disease protein. *Eye.* **20** : 234-241, 2006.
 - 46) Lev D, Weigl Y, Hasan M, et al : A novel missense mutation in the NDP gene in a child with Norrie disease and severe neurological involvement including infantile spasms. *Am J Med Genet A.* **143A** : 921-924, 2007.
 - 47) Halpin C, Owen G, Gutierrez-Espeleta GA, et al : Audiologic features of Norrie disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **114** : 533-538, 2005.



Case report

An Usher syndrome type 1 patient diagnosed before the appearance of visual symptoms by *MYO7A* mutation analysisHidekane Yoshimura^a, Satoshi Iwasaki^b, Yukihiko Kanda^c, Hiroshi Nakanishi^d, Toshinori Murata^e, Yoh-ichiro Iwasa^a, Shin-ya Nishio^a, Yutaka Takumi^{a,b}, Shin-ichi Usami^{a,*}^a Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan^b Department of Hearing Implant Sciences, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan^c Kanda ENT Clinic, Nagasaki Bell Hearing Center, Nagasaki, Japan^d Department of Otorhinolaryngology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan^e Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2012

Received in revised form 6 November 2012

Accepted 9 November 2012

Available online 11 December 2012

Keywords:

MYO7A

USH1B

Usher syndrome

Non-syndromic hearing loss

Japanese

ABSTRACT

Usher syndrome type 1 (USH1) appears to have only profound non-syndromic hearing loss in childhood and retinitis pigmentosa develops in later years. This study examined the frequency of USH1 before the appearance of visual symptoms in Japanese deaf children by *MYO7A* mutation analysis. We report the case of 6-year-old male with profound hearing loss, who did not have visual symptoms. The frequency of *MYO7A* mutations in profound hearing loss children is also discussed. We sequenced all exons of the *MYO7A* gene in 80 Japanese children with severe to profound non-syndromic HL not due to mutations of the *GJB2* gene (ages 0–14 years). A total of nine DNA variants were found and six of them were presumed to be non-pathogenic variants. In addition, three variants of them were found in two patients (2.5%) with deafness and were classified as possible pathogenic variants. Among them, at least one nonsense mutation and one missense mutation from the patient were confirmed to be responsible for deafness. After *MYO7A* mutation analysis, the patient was diagnosed with RP, and therefore, also diagnosed with USH1. This is the first case report to show the advantage of *MYO7A* mutation analysis to diagnose USH1 before the appearance of visual symptoms. We believed that *MYO7A* mutation analysis is valid for the early diagnosis of USH1.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Usher syndrome (USH) is an autosomal recessive disorder characterized by hearing loss (HL), retinitis pigmentosa (RP) and vestibular dysfunction. Three clinical subtypes can be distinguished [1] and USH type 1 (USH1) is the most severe among them because of profound HL, absent vestibular responses, and prepubertal onset RP [2]. For USH1, early diagnosis has many immediate and several long-term advantages for patients and their families [3]. However, diagnosis in childhood, based on a clinical phenotype, can be difficult because patients appear to have only non-syndromic HL in childhood and RP develops in later years.

Early diagnosis is now possible through DNA testing [3]. To date, seven genetic loci for USH1 have been mapped to

chromosomes 11q13.5, 11p15.1, 10q22.1, 21q21, 10q21–q22, 17q24–q25, and 15q22–q23. Five of the corresponding genes have been identified (*MYO7A* [4], *USH1C* [5], *CDH23* [6], *PCDH15* [7], and *USH1G* [8]). USH1B in the most common USH1 genetic subtype, encoding the actin-based motor protein myosin VIIa (*MYO7A*), accounts for 30–50% of USH1 cases in the UK and the USA [9]. In Japanese, little is known about the most common cause of USH1, but mutation screening for *MYO7A* and *CDH23* is also expected to be a highly sensitive method for diagnosis [10]. Mutations in *MYO7A* are known to be responsible for dominant non-syndromic HL (DFNA11) [11] and infrequently, recessive non-syndromic HL (DFNB2) [12]. However, there was no obvious correlation between mutation in *MYO7A* and the resulting phenotype [13], unlike mutations in *CDH23* [14]. Therefore, we thought that young deaf children with *MYO7A* mutations, should undergo ophthalmologic examination to determine whether they will develop RP.

To examine whether USH1 patients before the appearance of visual symptoms exist among the Japanese non-syndromic severe to profound HL children, mutation analysis of the *MYO7A* gene was performed.

* Corresponding author at: Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan. Tel.: +81 263 37 2666; fax: +81 263 36 9164.

E-mail address: usami@shinshu-u.ac.jp (S. Usami).

2. Materials and methods

2.1. Subjects

We screened 80 Japanese children with severe to profound non-syndromic HL (ages 0–14 years): 10 from autosomal recessive families (normal hearing parents and two or more affected siblings), and 70 with sporadic deafness compatible with recessive inheritance or non-genetic hearing loss. There were 35 males and 45 females. None of the subjects had any other associated neurological symptoms including vestibular or visual dysfunction. Severity of hearing loss was classified by a puretone average over 500, 1000, 2000 and 4000 Hz in the better hearing ear as follows: severe hearing loss, 71–95 dB; and profound hearing loss, greater than 95 dB. All probands had congenital or early onset hearing loss, and families were too small for linkage analysis. Patients with *GJB2* mutations were previously excluded from this study. The control group was composed of 190 unrelated Japanese individuals who had normal hearing shown by auditory testing. All subjects gave prior informed consent for participation in the project and the Ethical Committee of Shinshu University approved the study.

2.2. Mutation analysis

Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify all 49 exons and flanking intronic sequences of the *MYO7A* gene. Each genomic DNA sample (40 ng) was amplified, using the primers described by Kumar et al. [15] with a slight modification and KOD DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan), for 8.5 min at 95 °C, followed by 30 three-step cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min, ending with a holding period at 4 °C in PCR thermal cycler (Takara, Shiga, Japan). PCR products were treated with ExoSAP-IT® (GE Healthcare Bio, Buckinghamshire, UK) by incubation at 37 °C for 60 min, and inactivation at 80 °C for 15 min. After the products were purified, we performed standard cycle-sequencing reactions with Big Dye® terminators in an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer autosequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Computer analysis to predict the effect of missense variants on *MYO7A* protein function was performed with Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT; <http://sift.jcvi.org/>), and Polymorphism Phenotyping (PolyPhen2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Gene accession number: NM_000260.3 Homo sapiens myosin VIIA (*MYO7A*), transcript variant 1, mRNA3.

3. Results

3.1. Mutation screening

A total of nine sequence variants were found in the present study (Table 1). Of these, three variants found in two patients with deafness were classified as possible pathogenic variants (Table 1). Of these, a nonsense mutation (p.Gln18X) has been previously reported [16] and two mutations (p.Cys1201Ser and p.Phe1774-Leu) were novel. A patient with compound heterozygotes; with a nonsense mutation (p.Gln18X) [16] and a missense mutation (p.Phe1774Leu) was confirmed by the segregation analysis (Fig. 1). This patient without any visual symptoms was then diagnosed with USH1 after detailed ophthalmological examinations as described below. The remaining possible pathogenic variant (p.Cys1201Ser) was found to be in heterozygous state without second mutation, and did not fulfill the criteria for recessive inheritance mode. The patient carrying the *MYO7A* mutation (heterozygous case) was too young (2 years old) to receive additional testing (ophthalmological testing such as ERG), but had no visual complaint.

The remaining six out of nine DNA variants were presumed to be non-pathogenic variants because they had high allele carrier rates (>2%) and/or because of the result on prediction software for evaluation of the pathogenicity of missense variants (Table 1). Of these possible polymorphisms, two variants (p.Glu1641Lys and p.Ala1950Thr) were novel. One variant (p.Thr1566Met), previously reported as a pathogenic mutation by Najera et al. [17], was indicated by the prediction software score to probably be a non-pathologic polymorphism. Other variants have already been described as non-pathologic polymorphisms [18,19].

3.2. Case

The patient visited an ENT clinic at the age of 14 months because the parents noticed no response to sound. Auditory steady-state evoked responses (ASSR), one of an objective audiometry, showed profound hearing loss for all frequencies. In addition, caloric testing showed no response bilaterally. The patient received a cochlear implantation (CI) in the right ear at the age of 31 months and in the left ear at the age of 6. To distinguish between non-syndromic HL USH1, we recommended that an ophthalmologist be consulted. Although the proband showed no apparent nyctalopia or dark adaptation problems, a fundus examination revealed attenuated retinal vessels in the midperiphery without apparent pigmentary clumps (Fig. 1). Goldman visual field examination showed mild constriction of visual fields.

Table 1
MYO7A variations found in Japanese non-syndromic hearing loss children and controls.

Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Evolutionary conservation	Alleles in control chromosomes	Hereditary	PolyPhen2 score	SIFT score	Pathogenicity	Reference
3	c.47T>C	p.Leu16Ser	No	71/160	Sporadic	0	1		Janecke et al. [18]
3	c.52C>T	p.Gln18X	–	0/380	Sporadic	–	–	Pathogenic	Cremer et al. [16]
28	c.3602G>C	p.Cys1201Ser	Yes	1/382	Sporadic	0.999	0.02	Pathogenic	This study
35	c.4697C>T	p.Thr1566Met	No	0/380	Sporadic	0.011	0.15		Najera [17]
36	c.4921G>A	p.Glu1641Lys	No	0/380	Sporadic	0.671	0.15		This study
36	c.4996A>T	p.Ser1666Cys	No	71/150	Sporadic	0	1		Janecke et al. [18]
38	c.5320T>C	p.Phe1774Leu	Yes	0/384	Sporadic	0.987	0.01	Pathogenic	This study
42	c.5848G>A	p.Ala1950Thr	No	0/380	Sporadic	0.003	0.18		This study
43	c.5860C>A	p.Leu1954Ile	No	49/160	Sporadic	0	1		Bharadwaj [19]

Computer analysis to predict the effect of missense variants on *MYO7A* protein function was performed with sorting intolerant from tolerant (SIFT; <http://sift.jcvi.org/>), and polymorphism phenotyping (PolyPhen2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

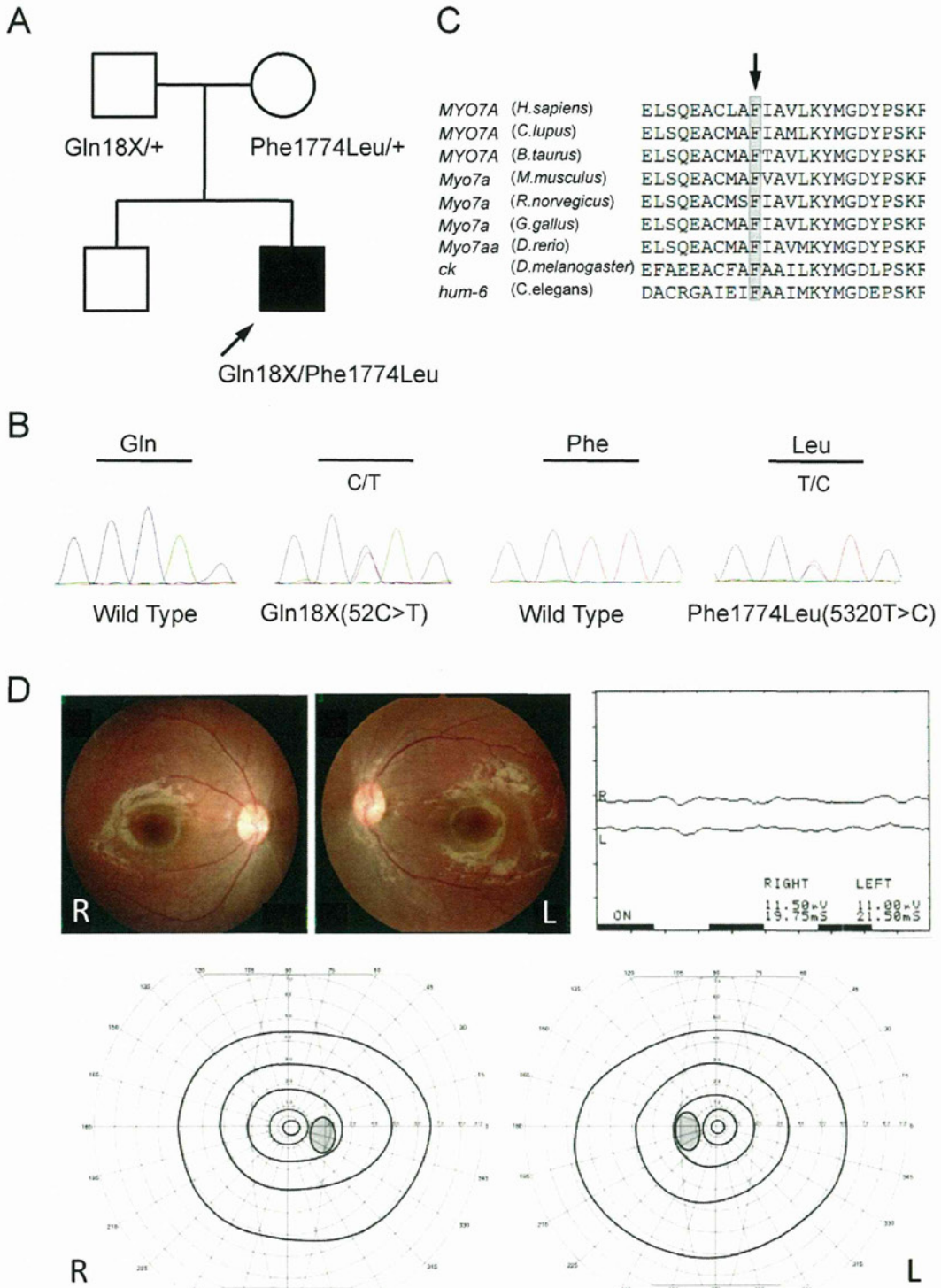


Fig. 1. Pedigree, sequence chromatograms, and ophthalmological findings of the patient with the Gln18X and Phe1774Leu mutations. (A) The pedigree and sequence results for the proband and family. (B) Sequence chromatograms from wild-type and mutations. The proband and his father carried a heterozygous 52C>T transition in exon 3, which results in an arginine to a stop codon (Gln18X). Another variation, 5320T>C (Phe1774Leu), was derived from the proband and his mother. (C) Evolutionary conservation of MYO7A gene in nine species. Arrow indicates mutation point found in the present study. (D) The proband had ophthalmologic test at the age of 7. Fundus examination revealed attenuated retinal vessels in the midperiphery without apparent pigmentary clumps. Goldman visual field examination showed mild constriction of visual fields. Full-field electroretinogram of the proband showed complete absence bilaterally.

A full-field electroretinogram showed complete absence bilaterally. Therefore, the proband was diagnosed with RP. On the basis of the results of ASSR, caloric test and ERG, the patient was then diagnosed with USH1. We provided genetic counseling to the family about (1) the risk of future vision loss and (2) the benefits of CI (in this case, however, the patient had already received bilateral CI).

4. Discussion

The present study reported nine *MYO7A* sequence variants in Japanese children with non-syndromic hearing loss. Among them, six were polymorphisms, and the remaining three variants are possible disease-causing mutations (Table 1). These three variants were found in none (or very few) of the controls, suggesting these are possible pathologic mutations. Of these three mutations, however, two mutations (p.Cys1201Ser and p.Phe1774Leu) have not been included in the USHbases (http://grenada.lumc.nl/LOVD2/Usher_montpellier/USHbases.html). We have previously reported genes responsible for deafness in Japanese patients and observed differences in mutation spectrum between Japanese (who are probably representative of other Asian populations) and populations with European ancestry [20]. Ethnic background is important and should be noted when genetic testing is performed.

Kimberling et al. showed that in deaf or hard of hearing children, negative for *GJB2/6* mutations, 12.7% (7/55) carried ≥ 1 Usher mutations [3]. In particular, *MYO7A* mutations were found in two of them (3.6%). In the present study, we found 2 *MYO7A* mutations in 80 Japanese children with severe to profound non-syndromic HL (2.5%), a not greatly different frequency.

The present case is the first to demonstrate that *MYO7A* mutation analysis could diagnose USH1 in a deaf child before the appearance of the visual symptoms. This result indicates the importance of *MYO7A* mutation screening in non-syndromic HL children. Anomalies of light-evoked electrical response of the retina can be detected by ERG at 2–3 years of age, which allows for early clinical confirmation of the disease [21]. In young children, ERG is not widely used because it is likely to involve the use of a general anesthetic and may be fraught with technical difficulties [21]. However, the mutations analysis of the *MYO7A* gene could replace the ERG testing.

Early detection of USH1 has mainly two benefits. First, we can provide the parents with the opportunity to choose CI, including bilateral, at an early stage. There is a need to provide USH children with the best hearing amplification available, with a preference for CI if possible, accompanied by intensive training and habilitation before the development of RP [22]. Especially, bilateral CI is believed to be essential for these children. In general, for implanted children, the best speech results are directly associated with cochlear implantation before the age of 5 years and with emphasis on pre- and post-implantation oral communication therapy [21]. Moreover, the children with USH1 do not differ from the rest of the implanted children; the best results are obtained with the young children [23]. In the current case, the patient has already received bilateral CI. We thought that this choice was appropriate. Secondly, ophthalmologic therapy to delay the progression of the RP may become available in the near future. Therapeutic strategies aim to treat retinal degeneration by targeting the specific genetic disorder (gene therapy) (<http://www.oxfordbiomedica.co.uk/>), slowing or stopping photoreceptor degeneration or apoptosis [24], or the use of blue and ultraviolet light filtering glasses [25].

In conclusion, we reported a case in which *MYO7A* mutation analysis diagnosed USH1 in a proband before the appearance of the visual symptoms. As shown in this case, *MYO7A* mutation analysis as a valid tool for the early diagnosis of USH1, however a new time- and cost-saving analytic procedure is necessary for a routine

clinical testing. We are currently setting a new platform using massive parallel sequencing of all exons of USH1 related genes in deaf children by using next-generation sequencing.

Conflict of interest statement

We, the authors, declare that there were no conflicts of interest in conjunction with this paper.

Acknowledgments

We thank William J. Kimberling and A.C. Apple-Mathews for help in preparing the manuscript. This study was supported by a Health Sciences Research Grant from the Ministry of Health and Welfare of Japan and by the Usher Syndrome Research Committee of the Ministry of Health and Welfare of Japan.

References

- [1] R.J. Smith, C.I. Berlin, J.F. Hejtmancik, B.J. Keats, W.J. Kimberling, R.A. Lewis, et al., Clinical diagnosis of the Usher syndromes, *Am. J. Med. Genet.* 50 (1994) 32–38.
- [2] C.G. Moller, W.J. Kimberling, S.L. Davenport, I. Priluck, V. White, K. Biscione-Halterman, et al., Usher syndrome: an otoneurologic study, *Laryngoscope* 99 (1989) 73–79.
- [3] W.J. Kimberling, M.S. Hildebrand, A.E. Shearer, M.L. Jensen, J.A. Halder, K. Trzupke, et al., Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children, *Genet. Med.* 12 (2010) 512–516.
- [4] D. Weil, S. Blanchard, J. Kaplan, P. Guilford, F. Gibson, J. Walsh, et al., Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B, *Nature* 374 (1995) 60–61.
- [5] E. Verpy, M. Leibovici, I. Zwaenepoel, X.Z. Liu, A. Gal, N. Salem, et al., A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C, *Nat. Genet.* 26 (2000) 51–55.
- [6] J.M. Bork, L.M. Peters, S. Riazuddin, S.L. Bernstein, Z.M. Ahmed, S.L. Ness, et al., Usher syndrome 1D and nonsyndromic autosomal recessive deafness DFNB12 are caused by allelic mutations of the novel cadherin-like gene *CDH23*, *Am. J. Hum. Genet.* 68 (2001) 26–37.
- [7] Z.M. Ahmed, S. Riazuddin, S.L. Bernstein, Z. Ahmed, S. Khan, A.J. Griffith, et al., Mutations of the protocadherin gene *PCDH15* cause Usher syndrome type 1F, *Am. J. Hum. Genet.* 69 (2001) 25–34.
- [8] M. Mustapha, E. Chouery, D. Torchard-Pagnez, S. Nouaille, A. Khrais, F.N. Sayegh, et al., A novel locus for Usher syndrome type I, *USH1G*, maps to chromosome 17q24–25, *Hum. Genet.* 110 (2002) 348–350.
- [9] D. Vozzi, A. Aaspollu, E. Athanasakis, A. Berto, A. Fabretto, D. Licastro, et al., Molecular epidemiology of Usher syndrome in Italy, *Mol. Vis.* 17 (2011) 1662–1668.
- [10] H. Nakanishi, M. Ohtsubo, S. Iwasaki, Y. Hotta, Y. Takizawa, K. Hosono, et al., Mutation analysis of the *MYO7A* and *CDH23* genes in Japanese patients with Usher syndrome type 1, *J. Hum. Genet.* 55 (2010) 796–800.
- [11] X.Z. Liu, J. Walsh, Y. Tamagawa, K. Kitamura, M. Nishizawa, K.P. Steel, et al., Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene, *Nat. Genet.* 17 (1997) 268–269.
- [12] S. Riazuddin, S. Nazli, Z.M. Ahmed, Y. Yang, F. Zulfiqar, R.S. Shaikh, et al., Mutation spectrum of *MYO7A* and evaluation of a novel nonsyndromic deafness *DFNB2* allele with residual function, *Hum. Mutat.* 29 (2008) 502–511.
- [13] D.X. Yan, Z. Liu, Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome, *J. Hum. Genet.* 55 (2010) 327–335.
- [14] J.M. Schultz, R. Bhatti, A.C. Madeo, A. Turrieff, J.A. Muskett, C.K. Zaleski, et al., Allelic hierarchy of *CDH23* mutations causing non-syndromic deafness *DFNB2* or Usher syndrome *USH1D* in compound heterozygotes, *J. Med. Genet.* 48 (2011) 767–775.
- [15] A. Kumar, M. Babu, W.J. Kimberling, C.P. Venkatesh, Genetic analysis of a four generation Indian family with Usher syndrome: a novel insertion mutation in *MYO7A*, *Mol. Vis.* 10 (2004) 910–916.
- [16] F.P. Cremers, W.J. Kimberling, M. Kulm, A.P. de Brouwer, E. van Wijk, H. te Brinke, et al., Development of a genotyping microarray for Usher syndrome, *J. Med. Genet.* 44 (2007) 153–160.
- [17] C. Najera, M. Beneyto, J. Blanca, E. Aller, A. Fontcuberta, J.M. Millan, et al., Mutations in myosin VIIA (*MYO7A*) and usherin (*USH2A*) in Spanish patients with Usher syndrome types I and II, respectively, *Hum. Mutat.* 20 (2002) 76–77.
- [18] A.R. Janecke, M. Meins, M. Sadeghi, K. Grundmann, E. Apfelstedt-Sylla, E. Zrenner, et al., Twelve novel myosin VIIA mutations in 34 patients with Usher syndrome type I: confirmation of genetic heterogeneity, *Hum. Mutat.* 13 (1999) 133–140.
- [19] A.K. Bhadrawaj, J.P. Kasztejna, S. Huq, E.L. Berson, T.P. Dryja, Evaluation of the myosin VIIA gene and visual function in patients with Usher syndrome type I, *Exp. Eye Res.* 71 (2000) 173–181.
- [20] S. Usami, M. Wagatsuma, H. Fukuoka, H. Suzuki, K. Tsukada, S. Nishio, et al., The responsible genes in Japanese deafness patients and clinical application using Invader assay, *Acta Otolaryngol.* 128 (2008) 446–454.

- [21] X.Z. Liu, S.I. Angeli, K. Rajput, D. Yan, A.V. Hodges, A. Eshraghi, et al., Cochlear implantation in individuals with Usher type 1 syndrome, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 72 (2008) 841–847.
- [22] Z. Brownstein, T. Ben-Yosef, O. Dagan, M. Frydman, D. Abeliovich, M. Sagi, et al., The R245X mutation of PCDH15 in Ashkenazi Jewish children diagnosed with nonsyndromic hearing loss foreshadows retinitis pigmentosa, *Pediatr. Res.* 55 (2004) 995–1000.
- [23] A.F. Snik, M.J. Makhdoum, A.M. Vermeulen, J.P. Brokx, P. van den Broek, The relation between age at the time of cochlear implantation and long-term speech perception abilities in congenitally deaf subjects, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 41 (1997) 121–131.
- [24] J.M. Millan, E. Aller, T. Jaijo, F. Blanco-Kelly, A. Gimenez-Pardo, C. Ayuso, An update on the genetics of usher syndrome, *J. Ophthalmol.* 2011 (2011) 417217.
- [25] A.V. Cideciyan, S.G. Jacobson, T.S. Aleman, D. Gu, S.E. Pearce-Kelling, A. Sumaroka, et al., In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5233–5238.

Prevalence and Clinical Features of Hearing Loss Patients with *CDH23* Mutations: A Large Cohort Study

Maiko Miyagawa, Shin-ya Nishio, Shin-ichi Usami*

Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan

Abstract

Screening for gene mutations in *CDH23*, which has many exons, has lagged even though it is likely to be an important cause for hearing loss patients. To assess the importance of *CDH23* mutations in non-syndromic hearing loss, two-step screening was applied and clinical characteristics of the patients with *CDH23* mutations were examined in this study. As a first screening, we performed Sanger sequencing using 304 probands compatible with recessive inheritance to find the pathologic mutations. Twenty-six possible mutations were detected to be pathologic in the first screening. For the second screening, using the probes for these 26 mutations, a large cohort of probands ($n=1396$) was screened using Taqman amplification-based mutation analysis followed by Sanger sequencing. The hearing loss in a total of 52 families (10 homozygous, 13 compound heterozygous, and 29 heterozygous) was found to be caused by the *CDH23* mutations. The majority of the patients showed congenital, high frequency involved, progressive hearing loss. Interestingly, some particular mutations cause late onset moderate hearing loss. The present study is the first to demonstrate the prevalence of *CDH23* mutations among non-syndromic hearing loss patients and indicated that mutations of the *CDH23* gene are an important cause of non-syndromic hearing loss.

Citation: Miyagawa M, Nishio S-y, Usami S-i (2012) Prevalence and Clinical Features of Hearing Loss Patients with *CDH23* Mutations: A Large Cohort Study. PLoS ONE 7(8): e40366. doi:10.1371/journal.pone.0040366

Editor: Iris Schrijver, Stanford University School of Medicine, United States of America

Received: January 22, 2012; **Accepted:** June 4, 2012; **Published:** August 10, 2012

Copyright: © 2012 Miyagawa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a Health and Labour Sciences Research Grant for Comprehensive Research on Disability Health and Welfare from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (<http://www.mhlw.go.jp/english/>) (SU), by the Acute Profound Deafness Research Committee of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (<http://www.mhlw.go.jp/english/>) (SU), by a Health and Labour Sciences Research Grant for Research on Specific Diseases (Vestibular Disorders) from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (<http://www.mhlw.go.jp/english/>) (SU), and by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (<http://www.mext.go.jp/english/>) (SU). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: usami@shinshu-u.ac.jp

Introduction

Mutations in the *CDH23* (NM_22124) gene are known to be responsible for both Usher syndrome type ID (USH1D) and non-syndromic hearing loss (DFNB12) [1,2]. Molecular confirmation of *CDH23* mutations has become important in the diagnosis of these conditions.

This gene encodes cadherin 23, a protein of 3354 amino acids with 27 extracellular (EC) domains, a single transmembrane domain and a short cytoplasmic domain. Cadherin-specific amino acid motifs such as DRE, DXNDN, and DXD, that are highly conserved in sequence and spacing and required for cadherin dimerization and calcium binding were found in each extracellular domain [3].

The cadherin 23 protein is known to be an important composition of the tip link that maintains the arrangement of stereocilia [4].

More than 50 mutations have been reported for the Usher phenotype (USH1D) and 24 mutations reported for the non-syndromic hearing loss phenotype (DFNB12) [1,2,5–7]. As suggested by genotype–phenotype correlation study, Usher 1D, which has congenital profound hearing impairment, vestibular dysfunction, and retinitis pigmentosa, is usually associated with nonsense mutations, whereas DFNB12, which has a milder phenotype, is associated with missense mutations [1,2,5–8].

We previously reported that four pathologic mutations were identified in 5 out of 64 Japanese families compatible with autosomal recessive inheritance, suggesting that *CDH23*-caused deafness may be commonly found among non-syndromic hearing loss patients [6]. *GJB2* has been shown to be a common gene involved in congenital hearing impairment. *SLC26A4* is also frequently involved among those patients. *GJB2* and *SLC26A4* are comparatively small making Sanger sequencing relatively easy. The latter is also associated with the typical inner ear anomaly, enlarged vestibular aqueduct. Therefore, screening is relatively easy and many studies have focused on just these two genes. Clinical molecular diagnosis has been dramatically improved for these genes. However, screening strategy of other hearing loss genes is difficult and Sanger sequencing of the candidate genes, such as *CDH23*, with many exons is time consuming. Consequently, only a few reports are available for the mutation spectrum of *CDH23*.

In the present study, we performed Sanger sequencing using 304 patients whose pedigrees are compatible with recessive inheritance to find additional pathologic mutations. Also, to find the novel pathologic mutations and to clarify the frequency and clinical characteristics of patients with *CDH23* mutations, a large cohort of probands from unrelated families ($n=1396$) was screened using TaqMan amplification-based mutation analysis of the variants observed in the initial 304 patients.

Table 1. Possible pathologic variants found in this study.

Amino acid change	Nucleotide change	EXON	Domain	Evolutionary conservation	The highly conserved calcium-binding elements	Number in probands (n = 1396)			Allele frequency in patients (in 2792 allele)	Allele frequency in control (in 384 allele)	Allele frequency in HL patients based on a Next generation sequencing database (in 432 allele)	Allele frequency in controls based on a Next generation sequencing database (in 144 allele)	PolyPhen 2 score*	SIFT Score*	Reference
						compound									
						homozygote	heterozygote	heterozygote							
p.P240L	c.719C>T	7	EC3	7	-	7	12	19	1.612	0.260	0.63	0.67	0.999	0.06	Wagatsuma et al.
p.R301Q	c.902G>A	9	EC3	7	DRE	-	3	-	0.107	0.260	0	0	1.000	0	Wagatsuma et al.
p.E956K	c.2866G>A	25	EC9	7	DRE	-	1	2	0.107	0	0.21	0	1.000	0.04	this study
p.T1368M	c.4103C>T	32	EC13	7	-	-	1	-	0.036	0	0	0	1.000	0	this study
p.R1417W	c.4249C>T	35	EC13	5	-	1	-	2	0.143	0	0.25	0	0.998	0.19	Wagatsuma et al.
p.D1626A	c.4877A>C	39	EC15	7	DXNDN	-	1	-	0.036	0	0	0	0.999	0.01	this study
p.Q1716P	c.5147A>C	39	EC16	7	-	-	3	-	0.107	0	0	0	0.957	0.3	Wagatsuma et al.
p.R2029W	c.6085C>T	46	EC19	7	DRE	2	2	6	0.430	0	0	0	0.999	0.01	Wagatsuma et al.
p.N2287K	c.6861T>G	50	EC21	7	DXNDN	-	2	-	0.072	0	0	0	0.971	0	this study
p.E2438K	c.7312G>A	52	EC23	6	-	-	1	-	0.036	0	0	0	0.986	1	this study

*Computer analysis to predict the effect of missense variants on *CDH23* protein function was performed with Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT; <http://sift.jcvi.org/>), and Polymorphism Phenotyping (PolyPhen2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).
doi:10.1371/journal.pone.0040366.t001

Table 2. Variants with uncertain pathogenicity found in this study.

Amino acid change	Nucleotide change	EXON	Domain	Evolutionary conservation	The highly conserved calcium-binding elements	Number in probands (n = 1396)			Allele frequency in patients (in 2792 allele)	Allele frequency in control (in 384 allele)	Allele frequency in HL patients based on a Next generation sequencing database (in 432 allele)	Allele frequency in controls based on a Next generation sequencing database (in 144 allele)	PolyPhen 2 score***	SIFT Score***	Reference
						compound homozygote	heterozygote	heterozygote							
p.D160N	c.478G>A	4	EC2	7	DXD	-	-	2	0.072	0.260	0	0	1.000	0	this study
p.V803I	c.2407G>A	23	EC8	7	-	-	-	3	0.107	0	0	0	0.761	0.41	this study
p.S1415I	c.4244G>T	35	EC13	7	-	-	-	1	0.036	0	0	0	0.840	0.06	this study
p.A1443G *	c.4328C>G	35	EC14	7	-	1*	-	2	0.143	0	0.2	0	0.944	0.06	this study
p.R1588W **	c.4762C>T	38	EC15	7	-	4**	-	18	0.931	0.260	2.22	0	1.000	0.01	Wagatsuma et al.
p.V1711I	c.5131G>A	40	EC16	7	-	-	-	2	0.072	0	0	0	0.970	0.12	Wagatsuma et al.
p.V1807M	c.5419G>A	42	EC17	5	-	-	1	-	N/A	0.260	0	0	0.054	0.22	this study
p.S1876N	c.5627G>A	43	EC18	5	-	-	-	6	0.215	0	0	0	0.981	0.26	Wagatsuma et al.
p.V1908I	c.5722G>A	44	EC9	5	-	-	-	12	0.430	0.260	1.09	0.53	0.948	1	Wagatsuma et al.
p.A2130V	c.6389C>T	48	EC20	6	-	-	-	1	0.036	0	0	0	0.999	0.24	this study
p.R2171C	c.6511C>T	48	EC20	7	DXNDNR	-	-	1	0.036	0.521	0	0	0.999	0.11	Wagatsuma et al.
p.Q2227P	c.6680A>C	48	EC21	6	-	-	-	1	0.036	0.260	0	0	0.930	0.2	Wagatsuma et al.
p.L2473P	c.7418T>C	53	EC23	7	-	-	-	1	0.036	0	0	0	0.999	0	Wagatsuma et al.
p.I2669V	c.8005A>G	56	EC25	5	-	-	-	1	0.036	0	0	0	0.134	0.7	Wagatsuma et al.
p.F2801V	c.8401T>G	59	EC26	5	-	-	-	1	0.036	0.781	1.52	1.27	0.800	0.01	Wagatsuma et al.
p.G2912S	c.8734G>A	61	EC27	7	-	-	-	1	0.036	0	0.23	0	0.996	0	this study
p.R3175C	c.9523C>T	68	CYTO	7	-	-	-	1	0.036	0.260	0	0	0.886	0.01	Wagatsuma et al.

*not confirmed by segregation study.

**one normal hearing subject with homozygotes.

***Computer analysis to predict the effect of missense variants on *CDH23* protein function was performed with Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT; <http://sift.jcvi.org/>), and Polymorphism Phenotyping (PolyPhen2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

N/A: TaqMan probe not available.

doi:10.1371/journal.pone.0040366.t002