

201231133A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

**遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に
関する調査研究**

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宇佐美 真一

平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に関する調査研究班 研究班名簿 -----	1
II. 総括研究報告	
遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に関する調査研究班 -----	5
宇佐美 真一	
III. 分担研究報告	
1. 日本人におけるGJB2遺伝子保因者頻度に関する研究 -----	23
伊藤 壽一、松尾 洋孝	
2. 耳小骨奇形の臨床的観察 -----	28
鈴木 衛	
3. 日小耳症・外耳道閉鎖症の遺伝子変異と補聴下の両耳聴に関する研究 ----	34
加我 君孝、松永 達雄	
4. 網羅的解析で偶然ミトコンドリアDNA3243変異が同定された耳小骨奇形症例	39
喜多村 健	
5. インベーターSNP解析法による難聴の遺伝子解析と臨床応用 -----	42
熊川 孝三	
6. 遺伝性難聴の遺伝カウンセリングに関する研究 -----	49
古庄 知己	
7. 岩手医大における過去11年間の中耳奇形手術例 -----	54
佐藤 宏昭	

8. VRAによる両側小耳症や外耳道閉鎖症などの聴覚障害乳幼児の骨導聴力測定に関する研究	57
坂田 英明	
9. <i>GJB2</i> 遺伝子変異による難聴児の人工内耳術後経過とgenotypeの関係に関する研究	61
山嵜 達也	
10. <i>KCNQ4</i> 遺伝子pore helix N末端のnon-truncating変異で中等度難聴を呈した1症例	65
小川 郁	
11. Waardenburg症候群の遺伝子診断に関する研究	69
松永 達雄	
12. 遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に関する調査研究	76
石川 浩太郎	
13. 「難聴遺伝子 <i>COCH</i> のトランスレショナルスタディー」に関する研究	82
池園 哲郎	
14. 当科におけるUsher症候群、遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形例の検討	89
内藤 泰	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	99
V. 研究成果の刊行物・別刷	105

I. 遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に関する調査研究班

研究班名簿

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
 遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に関する調査研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	宇佐美真一	信州大学医学部耳鼻咽喉科	教 授
研究分担者	熊川 孝三	虎の門病院耳鼻咽喉科・聴覚センター	部長・聴覚 センター 長
	東野 哲也	宮崎大学医学部耳鼻咽喉科学講座	教授
	佐藤 宏昭	岩手医科大学耳鼻咽喉科学講座	教授
	長井 今日子	群馬大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科 学講座	助教
	石川 浩太郎	自治医科大学医学部耳鼻咽喉科	講師
	池園 哲郎	埼玉医科大学耳鼻咽喉科	教授
	内藤 泰	神戸市立医療センター中央市民病院 耳鼻咽喉科	副病院長
	福島 邦博	岡山大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科	講師
	岩崎 聡	信州大学医学部附属病院人工聴覚器学講 座	教授
	工 穰	信州大学医学部耳鼻咽喉科	准教授
	松永 達雄	独) 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
	喜多村 健	東京医科歯科大学 医歯学総合研究科耳 鼻咽喉科学	教授

	山嵜 達也	東京大学医学部耳鼻咽喉科	教授
	伊藤 壽一	京都大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科	教授
	小川 郁	慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科	教授
	鈴木 衛	東京医科大学耳鼻咽喉科	教授
	加我 君孝	独) 国立病院機構東京医療センター臨床 研究センター	名誉臨床 研究セン ター長
	坂田 英明	目白大学保健医療学部言語聴覚学科	教授
	松尾 洋孝	防衛医科大学校分子生体制御学講座	講師
	古庄 知己	信州大学医学部附属病院遺伝子診療部	講師

Ⅱ. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に関する調査研究班

研究代表者 宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科・教授）

研究要旨

難聴は音声言語コミュニケーションの際に大きな障害となるため、日常生活や社会生活の質（QOL）の低下を引き起こし、長期に渡って生活面に支障を来たすため、診断法・治療法の開発が期待されている重要な疾患のひとつである。しかしながら、難聴という同一の臨床症状を示す疾患の中に、原因の異なる多くの疾患が混在している状況であるため、効果的な診断法および治療法は未だ確立されておらず、多くの場合発症メカニズムは不明である。本研究では、遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形を対象に All Japan の研究体制で調査研究を行う事により、希少な疾患の臨床実態の把握および DNA サンプル収集を行うとともに、収集された情報を基に、遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形患者の遺伝子バンク・臨床情報データベースを構築し、日本における実態把握（臨床像・随伴症状・治療効果など）を行い、遺伝性難聴・奇形のサブタイプ分類を行うことを目的としている。特に、遺伝子解析により原因遺伝子の特定を進め、遺伝子診断を組み合わせた新しい診断法を確立する事を目的に、臨床情報の収集、DNA サンプルの収集および遺伝子解析を行った。その結果、非常に効率的にサンプルの収集が行われており、現時点で 350 名を超える遺伝性難聴患者の臨床情報および DNA サンプルの集積を行った。また、原因遺伝子解析に関しても効率的に進展しており、*CDH23* 遺伝子、*KCNQ4* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*OTOF* 遺伝子変異を明らかにし報告することができた（Miyagawa et al., 2012, Naito et al., 2013 *in press*, Moteki et al., 2012, Matsunaga et al., 2012）。また、中耳奇形を伴う難聴の原因である *NOG* 遺伝子変異を見出し報告を行った（Usami et al., 2012）。さらに、次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子の網羅的解析により遺伝性難聴の 70%より原因遺伝子変異が見出される事を明らかにし報告を行った（Miyagawa et al., submitted）。また、外リンパ漏を検出する新しい検査手法として、ELISA 法を用いた内耳特異的タンパク質 CTP の検出に関する臨床応用に関する検討を行い、検査の感度・特異度を明らかにすることができた。

研究分担者氏名

熊川孝三（虎の門病院耳鼻咽喉科・聴覚センター・部長、聴覚センター長）、東野哲也（宮崎大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、佐藤宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科・教授）、長井今日子（群馬大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座・助教）、石川浩太郎（自治医科大学医学部耳鼻咽喉科・講師）、池園哲郎（埼玉医科大学耳鼻咽喉科・教授）、内藤 泰（神戸市立医療センター中央市民病院耳鼻咽喉科・副病院長）、福島邦博（岡山大学大学院耳鼻咽喉科・頭頸部外科・講師）、岩崎 聡（信州大学医学部附属病院人工聴覚器学講座・教授）、工 穰（信州大学医学部耳鼻咽喉科・准教授）、松永達雄（（独）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）、喜多村 健（東京医科歯科大学 医歯学総合研究科耳鼻咽喉科・教授）、山唄達也（東京大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、伊藤壽一（京都大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科・教授）、小川 郁（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、鈴木 衛（東京医科大学耳鼻咽喉科・教授）、加我君孝（独）国立病院機構東京医療センター臨床研究センター・名誉臨床研究センター長）、坂田英明（目白大学保健医療学部言語聴覚学科、教授）、松尾洋孝（防衛医科大学校 分子生体制御学講座・講師）、古庄知己（信州大学医学部附属病院遺伝子診療部・講師）

研究協力者

松原洋一（東北大学大学院医学系研究科小児医学講座遺伝病学分野・教授）、岡本牧人（北里大学医学部耳鼻咽喉科学医療系研究科・教授）、暁清文（愛媛大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、中島務（名古屋大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、福田 諭（北海道大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、水田邦博（浜松医科大学耳鼻咽喉科・准教授）、原 晃（筑波大学人間総合科学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科・教授）、渡辺行雄（富山大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、柿木章伸（東京大学医学部耳鼻咽喉科・講師）、肥塚 泉（聖マリアンナ医科大学 耳鼻咽喉科・教授）、高橋克昌（群馬大学医学部耳鼻咽喉科・講師）、工田昌也（広島大学医学部耳鼻咽喉科・講師）、武田憲昭（徳島大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、土井勝美（近畿大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、山下裕司（山口大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、青木光広（岐阜大学医学部耳鼻咽喉科・准教授）、松本希（九州大学医学部耳鼻咽喉科・助教）、阪上雅史（兵庫医科大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、中川尚志（福岡大学医学部耳鼻咽喉科・教授）、我那覇 章（琉球大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学・助教）、竹内万彦（三重大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科学・教授）、隈上秀高（長崎大学医学部耳鼻咽喉科・准教授）、宮之原郁代（鹿児島大学医学部耳鼻咽喉科頭頸部外科学・講師）、坂口博史（京都府立医科大学耳鼻咽喉科・助教）、渡辺知緒（山形大学医学部耳鼻咽喉科・

助教)、笠井美里(順天堂大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸科・講師)、小島博巳(東京慈恵会医科大学耳鼻咽喉科・准教授)、野口佳裕(東京医科歯科大学医学部耳鼻咽喉科・講師)、北尻真一郎(京都大学医学部耳鼻咽喉科・助教)、山下大介(神戸大学医学研究科外科学講座耳鼻咽喉科・外来医長)、阿部聡子(虎の門病院耳鼻咽喉科・非常勤講師)、神田幸彦(長崎大学医学部耳鼻咽喉科・臨床教授)、鎌谷直之(東京女子医科大学医学研究科先端生命医学専攻遺伝子医学分野・客員教授)、萩森伸一(大阪医科大学耳鼻咽喉科・准教授)、松村智裕(日本医科大学生化学分子生物学・助教)、松田圭二(宮崎大学医学部耳鼻咽喉科・准教授)、奥田匠(宮崎大学医学部耳鼻咽喉科・助教)、村田考啓(群馬大学医学部耳鼻咽喉科・助教)、神崎晶(慶應大学医学部耳鼻咽喉科・講師)、茂木英明(信州大学医学部耳鼻咽喉科・助教)、宮川麻衣子(信州大学医学部耳鼻咽喉科・医員)、内藤武彦(信州大学医学部耳鼻咽喉科・医員)、西尾信哉(信州大学医学部耳鼻咽喉科・助教)

A. 研究目的

難聴は音声言語コミュニケーションの際に大きな障害となるため、日常生活や社会生活の質(QOL)の低下を引き起こし、長期に渡って生活面に支障を来たすため、診断法・治療法の開発が期待されている重要な疾患のひとつである。

しかしながら、難聴という同一の臨床

的症状を呈する疾患には、他の症状を伴わない非症候群性難聴、Pendred 症候群や Usher 症候群のように難聴以外の症状を伴う症候群性の難聴、さらにまた、外耳、中耳、内耳奇形などの奇形を伴う難聴や、蝸牛神経の低形成を伴う難聴など、実際には多くの疾患が混在している状況であり、その罹患者頻度、臨床実態に関しても、複数が混在している状況であるため、本邦における難聴患者の実態に関しては明確になっていない。このように、複数の疾患が混在した状況にある原因の一つに、各々の疾患としては罹患者数が少なく希少であるために、大規模集団を用いた解析が行われておらず、実態把握が進んでいないという問題点があった。

本研究では、各々の疾患の罹患者数の把握、臨床像および治療実態の把握、遺伝子解析等を組み合わせた診断・治療法の開発を行うことを目的に、All Japan の研究体制で全国から試料・臨床情報を収集するとともに、治療効果および介入法の検討を行い、遺伝子診断を組み合わせた新しい診断法および診療ガイドラインの作成を目的としている(図1)。

特に、本研究の対象とする疾患の罹患者数は各々8,000~40,000人と推測される希少な疾患であるため、大規模な臨床調査は行われていなかったため、本研究では、研究分担者・研究協力者34施設の連携体制により、希少な疾患の実態把握およびDNAサンプル収集を効率的に実施する計画であり、研究期間を通じて遺

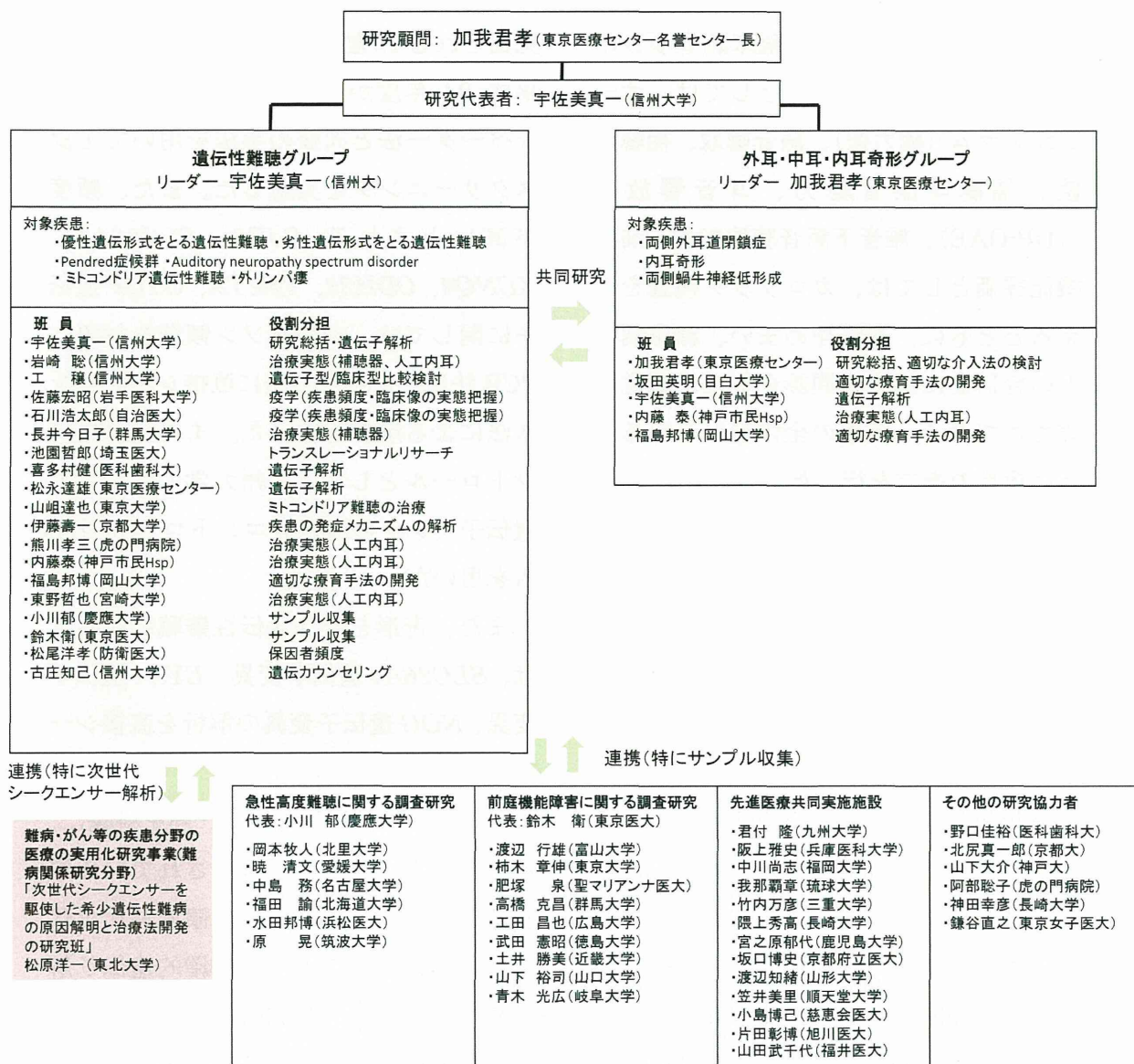


図1 研究推進体制

罹患者数、臨床像および治療実態の把握、遺伝子解析等を組み合わせた診断・治療法の開発を行うことを目的に、All Japanの研究体制で全国から試料・臨床情報を収集し、遺伝子診断を組み合わせた新しい診断法および診療ガイドラインの作成を目的としている。

伝子診断を組み合わせた新しい診断方法の確立と治療に関するガイドラインの策定を行うことを目的とした。

また、近年の遺伝子解析技術の発達により、遺伝子診断により重症度や予後の予測が可能である事が明らかとなってきた。本研究では遺伝子解析を組み合わせた診断手法を確立することで、適切な治

療を選択するオーダーメイド医療の基盤確立を目指す。

B. 研究方法

(1) 遺伝性難聴患者の実態把握のための調査項目の検討

平成24年度は、全国の共同研究施設が統一したフォーマットでの臨床情報の収集

を実施することを目的に臨床調査項目の検討を行った。調査項目としては、オーディオグラム（聴力像）、語音聴取、補聴閾値、補聴時語音聴力、耳音響放射（DP-OAE）、雑音下語音聴取能を、前庭機能評価としては、カロリック検査を加えるとともに、耳鳴やめまい、糖尿病などの合併症に関する問診を加え、聴覚障害だけでなく、疾患の全体像が分かるように項目の選定を行った。

(2) 臨床情報の収集およびDNAバンクの構築

患者選定基準を満たす患者を対象に、十分な説明の上、書面で同意を得て臨床情報調査項目の調査を行い、患者の実態把握を行った。また、遺伝子解析を行うための採血を行い臨床情報と併せてデータベースに登録しバンクの構築を行った。当初の研究計画では、初年度で200名分のサンプルおよび臨床情報の収集を実施する計画であったが、非常に効率的にサンプルの収集が行われている状況であり、現時点で350名を超える遺伝性難聴患者の臨床情報およびDNAサンプルの集積がなされている状況である。

(3) 遺伝性難聴患者および奇形を伴う難聴の原因遺伝子解析

遺伝性難聴の原因遺伝子解析に関しては、非症候群性の遺伝性難聴原因遺伝子として報告されている57遺伝子のうち、日本人難聴患者において比較的高頻度で

見出される13遺伝子46変異に関しては、平成24年度から健康保険収載されたインベーター法と同様の手法を用いて1次スクリーニングを実施した。また、頻度が高いとされる *GJB2*、*SLC26A4*、*KCNQ4*、*CDH23*、*TECTA*、*OTOF* 遺伝子に関しては、全エクソン領域を対象にPCR法による増幅の後に直接シーケンス法による解析を行った。また、対象コントロールとしては信州大学の管理する遺伝子バンクの健常者コントロール200名を用いた。

また、奇形を伴う遺伝性難聴に関しては、*SLC26A4* 遺伝子変異、*EYA1* 遺伝子変異、*NOG* 遺伝子変異の解析を直接シーケンス法により行った。

また、収集された症例の一部を対象に、難聴と関連することが報告されている原因遺伝子の全てのエクソン領域を次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行った。具体的には、Agilent社のSureSelectシステムを用い、難聴の原因として同定されている54遺伝子の全エクソン領域をターゲットとしたRNAライブラリをカスタム合成し、断片化したゲノムDNAとハイブリット形成させた後に、RNAライブラリに付加したビオチンタグをストレプトアビジン磁性化ビーズを用いて回収した。回収後のサンプルをPCR法で増幅した後に、Agilent社のBioAnalyser2100システムを用いて定量した。調整されたライブラリを用いてIllumina社のHiSeq2000システムを用

いて超並列シーケンス解析を行った。解析後のデータはQCを行った後にBWAを用いてヒトゲノム配列(hg19)にマッピングを行い、GATK toolsを用いて変異の検出を行った。次世代シーケンス解析により認められた変異に関しては、その周辺領域をPCR法を用いて増幅し、直接シーケンス法を用いて確認を行った。

(4)原因遺伝子による難聴のサブタイプ分類

前述の遺伝子解析により原因遺伝子変異の明らかとなった症例を対象に、遺伝子変異の種類毎に臨床像のとりまとめを行い、難聴およびその他の臨床症状の特徴を明らかにするサブタイプ分類を行い、疾患の臨床的特徴と遺伝子変異の相関に関して詳細な検討を行った。

(5)サブタイプに応じた適切な介入法に関する研究

前述の、原因遺伝子変異の明らかとなった症例のうち、研究分担者の医療機関の耳鼻咽喉科でフォローアップしている患者に関しては、補聴器・人工内耳の装用効果、語音弁別閾値検査などの介入効果に関する調査を行いタイプごとに取りまとめを行い適切な介入法を明確にする。

(6)ELISA法による高感度外リンパ瘦検出法の確立および臨床応用

従来、Western Blottingで外リンパ特異的タンパク質CTPの検出を行っていたが、

より高感度で検出可能なELISA法を用いた検出法の検討を行った。また、分担研究機関を中心に120例(10例×12施設)の臨床試験を行い検査の有効性に関する検討を行った。

(倫理面への配慮)

・当該ヒト遺伝子解析研究に関しては信州大学医学部および各施設の遺伝子解析倫理委員会で承認を得ている。また、実施に当たりヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針を遵守している。(平成20年7月25日 承認番号254)

・遺伝子解析に際しては、研究協力者に対する十分な説明の後、書面で同意を得てから解析を行っている。また、サンプルにはID番号を付加して匿名化することで個人情報の漏洩を防止する手順を遵守して行っている。

・動物実験に関しては各施設の動物実験の取り扱いに関する規定を遵守し、使用する動物数が最小限となるよう実験計画を工夫するとともに、対象となる動物が不快、苦痛を感じないように最大限の留意を払う。

C. 研究結果

(1)臨床情報の収集およびDNAバンクの構築

平成24年度は、臨床調査項目の検討を行

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

図2 本研究により見出された CDH23 遺伝子変異

本研究により、GJB2、SLC26A4、CDH23、KCNQ4、TECTA、OTOF、NOG など数多くの遺伝子解析がなされ、非常に多数の成果が得られている。一例として日本人難聴患者から見出された CDH23 遺伝子変異を示す (Miyagawa et al., 2013)

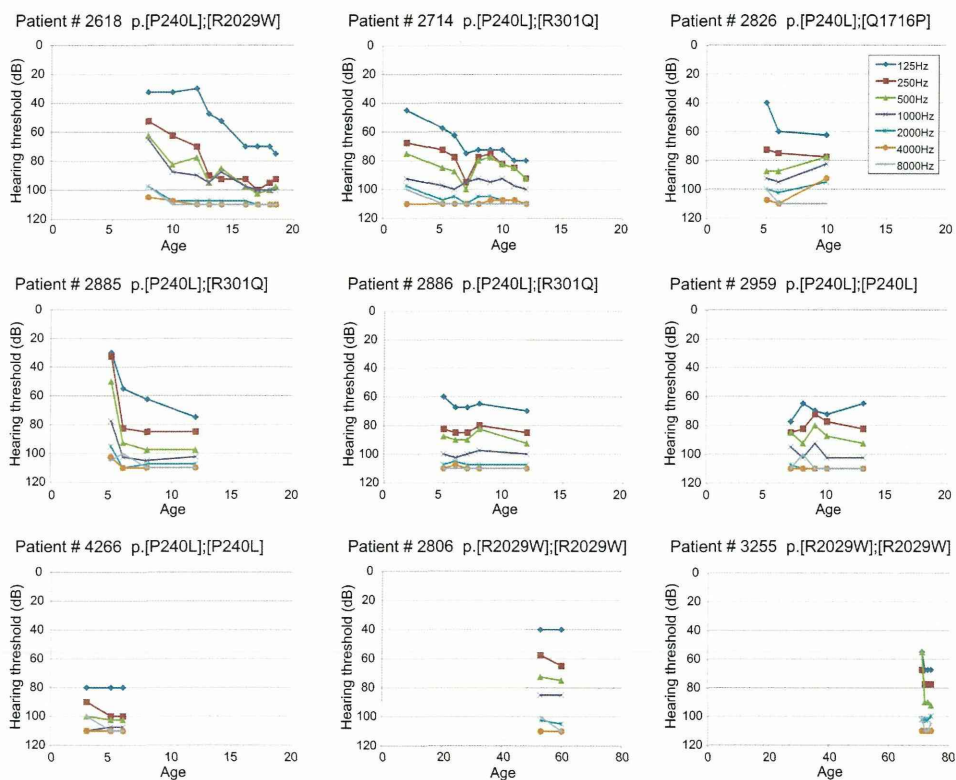


図3 CDH23 遺伝子変異と臨床像

本研究では、遺伝子変異の種類ごとに臨床像のとりまとめを行い、その特徴を明らかにしている。一例として日本人難聴患者から見出された CDH23 遺伝子変異の周波数ごとの難聴の進行の程度を示す。遺伝子変異の組み合わせにより難聴の進行の程度が異なることおよび変異によっては遅発性難聴を示すことを新規に見出した。(Miyagawa et al., 2013)

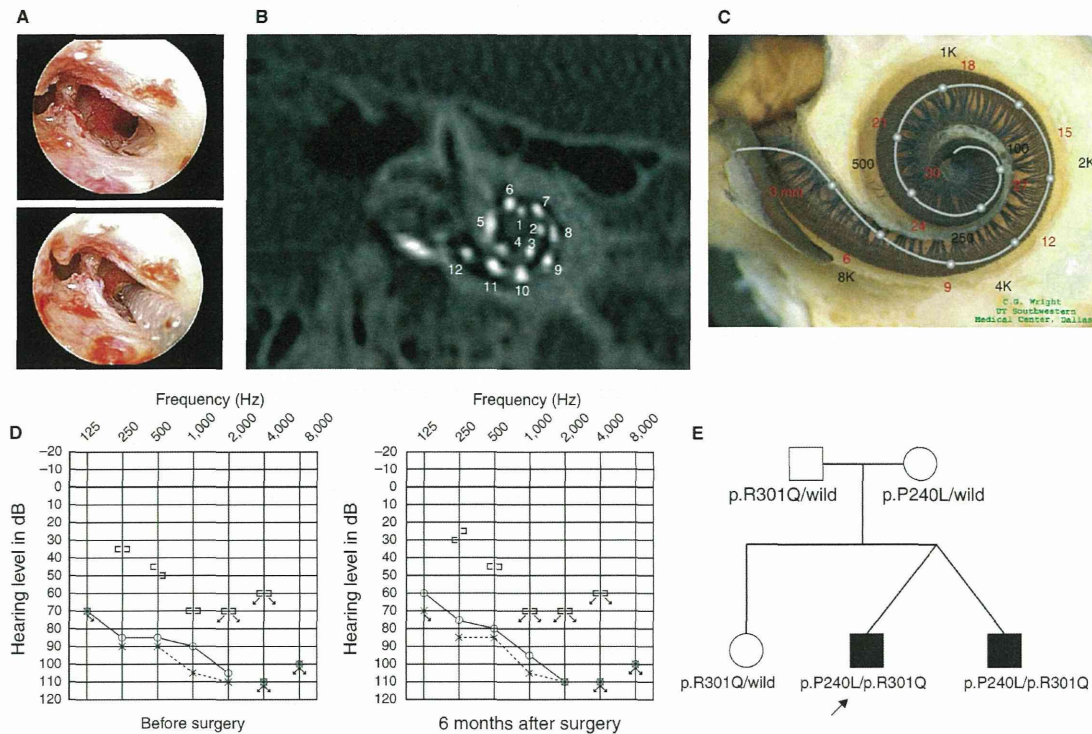


図4 CDH23 遺伝子変異症例に体する残存聴力活用型人工内耳挿入術
 本研究では、遺伝子変異の種類ごとに臨床像のとりまとめを行うとともに、効果的な介入法に関する検討も実施にしている。一例として残存聴力活用型人工内耳を施行した CDH23 遺伝子変異例をしめす。本症例は術後も低音部の残存聴力が損なわれることなく、良好な聴取能が得られたており、実際に遺伝子変異の種類毎に適切な医療の提供が可能となってきた。(Usami et al., 2012)

い全国の共同研究施設が統一したフォーマットでの臨床情報の収集および DNA サンプルの収集を開始した。当初の研究計画では 200 例を目標としていたが、非常に効率的にサンプルの収集が行われており、現時点で 350 名を超える遺伝性難聴患者の臨床情報および DNA サンプルの集積がなされている状況である。また、収集された DNA サンプルと臨床情報を蓄積するデータベースの構築を行った。

(2) 遺伝性難聴患者および奇形を伴う難聴の原因遺伝子解析

原因遺伝子解析に関しても効率的に進

展しており、CDH23 遺伝子、KCNQ4 遺伝子、TECTA 遺伝子、OTOF 遺伝子の変異が見出され論文として報告することができた (Miyagawa et al., 2012, Naito et al., 2013 in press, Moteki et al., 2012, Matsunaga et al., 2012)。

また、中耳奇形を伴う難聴の原因である NOG 遺伝子変異を見出し報告を行った (Usami et al., 2012)。さらに、次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子の網羅的解析により遺伝性難聴の 70%より原因遺伝子変異が見出される事を明らかにし報告を行った (Miyagawa et al., submitted)。このように非常に効率よく

原因遺伝子変異が見出されている状況であり、今後の継続によりさらなる成果が期待できる状況である。

(3)サブタイプに応じた適切な介入法に関する研究

遺伝子変異が見出された症例を対象に、その臨床情報の取りまとめを行った。その結果、*CDH23* 遺伝子変異では、進行性の感音難聴を呈するケースが多く、また低音部分に残存聴力を有するケースが大部分を占める事が明らかとなった(図2、図3: Miyagawa et al., 2012)。信州大学では、高音障害型の感音難聴に対する新しい治療法として、高度医療「残存聴力活用型人工内耳挿入術」を申請し、承認を受けて実施しており、*CDH23* 遺伝子変異による難聴患者に対する治療法として残存聴力活用型人工内耳が有効である事を明らかにし報告した(図4: Usami et al., 2012)。

また、優性遺伝形式を取る遺伝性難聴症例のうち、*TECTA* 遺伝子変異による難聴では障害部位により、高音障害型感音難聴を呈する場合と、皿形の難聴を呈するケースがある遺伝子型—表現型の相関がある事を明らかにした(Moteki et al., 2012)。どちらのタイプの難聴であっても、進行性を呈するが、その重症度は中等度であり人工内耳の適応となるケースは認められなかった。

また、優性遺伝形式を取る遺伝性難聴症例のうち、*KCNQ4* 遺伝子変異による

難聴では高音障害型の難聴を呈するケースが多いが、障害部位により皿形の難聴を呈するケースがある遺伝子型—表現型の相関がある事を明らかにした(Naito et al., in press)。また、日本人難聴患者に比較的多く認められる *c.211delC* 変異に関しては周辺 1Mbase の配列が類似しており創始者効果によるものであることを明らかにした。また、進行性の難聴を呈するが、その重症度は中等度であり人工内耳の適応となるケースは認められなかったが、残存聴力活用型人工内耳の適応となる聴力のケースも認められた。

また、*OTOF* 遺伝子変異のケースでは内有毛細胞からの神経伝達物質の放出が障害されオーディトリニューロパチーを呈する病態が明らかとなっており、通常のオーディトリニューロパチー症例と異なり、神経に障害はなく、人工内耳が効果的である事を報告した(Matsunaga et al., 2012, Iwasa et al submitted)。このように、臨床情報の収集により臨床像の把握および治療実態の把握が進んでいる。また、DNA の収集および遺伝子解析とともに効果的な治療法の確立に関して大きな成果が上がっている状況であり、今後の継続により更なる成果が期待できる状況にある。

(4)ELISA 法による高感度外リンパ瘻検出法の確立および臨床応用

ELISA 法を用いた高感度外リンパ瘻検出法の確立を目的に、外リンパ瘻確実例

(definite-PLF 症例；人工内耳やアブミ骨手術症例) と外リンパ瘻ではない症例 (non-PLF 症例；試験的鼓室開放などの正常中耳、外リンパ瘻を疑わせる所見のない真珠腫や慢性中耳炎など中耳に慢性炎症が存在する症例の中耳洗浄液) 合計 97 検体を用いて ROC 曲線による解析を行い、カットオフ値の検討を実施した。その結果、設定したカットオフラインでは特異度も 90%以上と非常に高く、臨床上の有用性が確認されたため、成果の特許取得を行った。また、株式会社 SRL との共同研究により臨床上の有用性を明らかにするための臨床研究を行っており、本年度中に分担研究機関を中心に 226 例の臨床試験を行った。

D. 考察

本研究では、遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形を対象に All Japan の研究体制で調査研究を行う事により、希少な疾患の臨床実態の把握および DNA サンプル収集を行うとともに、収集された情報を基に、遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形患者の遺伝子バンク・臨床情報データベースを構築し、日本における実態把握（臨床像・随伴症状・治療効果など）を行い、遺伝性難聴・奇形のサブタイプ分類を行うことを目的として検討を行った。その結果、350 名を超える遺伝性難聴患者の臨床情報および DNA サンプルの集積を行った。また、原因遺伝子解析に関しても *CDH23* 遺伝子、*KCNQ4*

遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*OTOF* 遺伝子変異を明らかにした。また、それぞれの遺伝子変異が特徴的な聴力像を有しており、遺伝子診断により聴力像の予測、進行性の予測が可能である事を明らかにした。さらに、*CDH23* 遺伝子変異症例に対する残存聴力活用型人工内耳の有効性および *OTOF* 遺伝子変異症例に対する人工内耳の有効性を明らかにすることができた。このように遺伝子型を同定することで適切な介入法を明らかにすることが可能となっており、今後の検討により、サブタイプに応じた適切な介入手法の選択が可能となる事が期待される。また、外リンパ漏を検出する新しい検査手法として、ELISA 法を用いた内耳特異的タンパク質 CTP の検出に関する臨床応用に関する検討を行い、検査の感度・特異度を明らかにすることができた。外リンパ瘻は従来、手術時に目視で確認する以外の診断手法が無い疾患であったため、本診断手法の確立により低侵襲の検査法を確立することができた。今後、症例を重ね臨床応用を実現する計画である。

E. 結論

本研究により 350 名を超える遺伝性難聴患者の臨床情報および DNA サンプルの集積を行うことができた。また、原因遺伝子解析に関しても効率的に進展しており、*CDH23* 遺伝子、*KCNQ4* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*OTOF* 遺伝子変異を明らかにし報告することができた。また、

中耳奇形を伴う難聴の原因である *NOG* 遺伝子変異を見出し報告を行った。さらに、次世代シーケンサーを用いた難聴遺伝子の網羅的解析により遺伝性難聴の70%より原因遺伝子変異が見出される事を明らかにし報告を行った。また、外リンパ漏を検出する新しい検査手法として、ELISA法を用いた内耳特異的タンパク質CTPの検出に関する臨床応用に関する検討を行い、検査の感度・特異度を明らかにすることができた。

F. 研究発表

論文発表

- Iwasaki S, Nishio S, Moteki H, Takumi Y, Fukushima K, Kasai N, Usami S. Language development in Japanese children who receive cochlear implant and/or hearing aid. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 76: 433-438. 2012
- Iwasaki S, Suzuki H, Moteki H, Miyagawa M, Takumi Y, Usami S. Experience with the Vibrant Soundbridge RW-Coupler for round window Vibroplasty with tympanosclerosis *Acta Otolaryngol*. 132: 676-682. 2012
- Usami S, Nishio S, Nagano M, Abe S, Yamaguchi T, Simultaneous Screening of Multiple Mutations by Invader Assay Improves Molecular Diagnosis of Hereditary Hearing Loss: A Multicenter Study. *PLoS ONE* 7: e31276. 2012
- Usami S, Abe S, Nishio S, Sakurai Y, Kojima H, Tono T, Suzuki N. Mutations in the *NOG* gene are commonly found in congenital stapes ankylosis with symphalangism, but not in otosclerosis. *Clin Genet*. 2012
- Usami S, Miyagawa M, Nishio S, Moteki H, Takumi Y, Suzuki M, Kitano Y, Iwasaki S. Patients with *CDH23* mutations and the 1555A>G mitochondrial mutations are good candidates for electric acoustic stimulation (EAS). *Acta Otolaryngol*. 132: 377-384. 2012
- Moteki H, Nishio S, Hashimoto S, Takumi Y, Iwasaki S, Takeichi N, Fukuda S, Usami S. *TECTA* mutations in Japanese with mid-Frequency hearing loss affected by zona pellucida domain protein secretion. *J Hum Genet*. 57: 587-592. 2012
- Miyagawa M, Nishio S, Usami S. Prevalence and Clinical Features of Hearing Loss Patients with *CDH23* Mutations: A Large Cohort Study. *PLoS ONE*. 7: e40366. 2012
- Oguchi T, Suzuki N, Hashimoto S, Chaudhry G.A, Chaudhry F.A, Usami S, Ottersen O.P. Inner hair cells of mice express the glutamine transporter *SAT1*. *Hear Res*. 292: 59-63. 2012
- Ogawa A, Shimizu K, Yoshizaki A, Sato S, Kanda Y, Kumagami H, Takahashi H, Usami S. A case of palmoplantar lichen planus in a patient with congenital sensorineural deafness. *Clin Exp Dermatol*. in press 2012
- Yoshimura H, Iwasaki S, Kanda Y, Nakanishi H, Murata T, Iwasa Y, Nishio S, Takumi Y, Usami S. An Usher syndrome type 1 patient diagnosed before the appearance of visual symptoms by *MYO7A* mutation analysis. *Int J Ped Otorhinolar*. in press 2012
- 宮川麻衣子、茂木英明、工 穰、宇佐美真一：人工内耳埋め込み術を行った *CDH23* 遺伝子変異による難聴症例 *耳鼻喉* 84: 59-63. 2012
- 宇佐美真一：難聴遺伝子はどこまで解明されたのか *JOHNS* 28: 292-293. 2012
- 宇佐美真一：両側性特発性感音難聴 *JOHNS* 28: 775-778. 2012
- 宇佐美真一：残存聴力活用型人工内耳 (EAS: electric acoustic stimulation) ~低侵襲手術、聴力保存成績、術後聴取能、遺伝的背景について~ *耳鼻臨床* 132: 3-12. 2012
- 宇佐美真一編 「きこえと遺伝子2—難聴の遺伝子診断 ケーススタディ集—」 金原出版 (東京都) 2012
- Kataoka Y, Ikezono T, Fukushima K, Yuen K, Maeda Y, Sugaya A, Nishizaki K. Cochlin-tomoprotein (CTP) detection test

- identified perilymph leakage preoperatively in revision stapes surgery. *Auris Nasus Larynx*. 2012 Oct 17. [Epub ahead of print]
17. Shiiba K, Shindo S, Ikezono T, Sekine K, Matsumura T, Sekiguchi S, Yagi T, Okubo K. Cochlin expression in the rat perilymph during postnatal development. *Acta Otolaryngol*. 2012 Nov;132(11):1134-9.
 18. 福田 潤弥, 合田 正和, 藤本 知佐, 池園 哲郎, 中川 尚志, 日比野 浩, 北村 嘉章, 阿部 晃治, 田村 公一, 武田 憲 : 昭
Perilymphatic oozer が疑われた CTP 陽性の耳性髄液漏症例 *Otology Japan* 22 卷 3 号 Page274-279
 19. 新藤 晋, 池園 哲郎 : 疾患と病態生理 外リンパ瘻 JOHNS(0910-6820)28 卷 5 号 Page823-826
 20. Nakano A, Arimoto Y, Matsunaga T. Cochlear nerve deficiency and associated clinical features in patients with bilateral and unilateral hearing loss. *Otol Neurotol* (in press)
 21. Masuda S, Usui S, Matsunaga T. High prevalence of inner-ear and/or internal auditory canal malformations in children with unilateral sensorineural hearing loss. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* (in press)
 22. Matsunaga T, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I. *Acta Otolaryngol* (in press)
 23. Taiji H, Morimoto N, Matsunaga T. Unilateral cochlear nerve hypoplasia in children with mild to moderate hearing loss. *Acta Otolaryngol*. 2012;132(11):1160-7
 24. Matsunaga T, Mutai H, Kunishima S, Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Kataoka Y, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K. A prevalent founder mutation and genotype-phenotype correlations of OTOF in Japanese patients with auditory neuropathy. *Clin Genet* 2012;82:425-432
 25. Minami SB, Masuda S, Usui S, Mutai H, Matsunaga T. Comorbidity of GJB2 and WFS1 mutations in one family. *Gene*. 2012;501(2):193-197. Erratum in: *Gene*. 2012;504(2):313.
 26. Sun G, Fujii M, Matsunaga T. Functional Interaction between Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Spiral Ligament Fibrocytes (SLFs). *J Neurosci Res* 2012 90(9):1713-22.
 27. Namba K, Mutai H, Kaneko H, Hashimoto S, Matsunaga T. In silico modeling of the pore region of a KCNQ4 missense mutant from a patient with hearing loss. *BMC Research Notes* 2012 Mar 15;5:145
 28. Fujinami Y, Mutai H, Mizutari K, Nakagawa S, Matsunaga T. A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea. *J Pharmcol Sci* 118,363-372:2012
 29. 仲野敦子, 有本友季子, 松永達雄, 工藤典代: Otoferlin 遺伝子変異が確認された小児難聴症例の検討 *Otol Jpn* 22(1):47-52, 2012
 30. 仲野敦子, 有本有季子, 松永達雄, 工藤典代: 側頭骨CTで両側蝸牛神経管狭窄を認めた小児難聴症例の検討. *日耳鼻会報* 115(9)849-854,2012
 31. Sumi T, Watanabe I, Tsunoda A, Nishio A, Komatsuzaki A, Kitamura K: Longitudinal study of 29 patients with Meniere's disease with follow-up of 10 years or more (In commemoration of Professor Emeritus Isamu Watanabe). *Acta Otolaryngol*. 2011 Nov 6. [Epub], *Acta Otolaryngol* 132: 10-5, 2012
 32. Takahashi N, Tsunoda A, Shirakura S, Kitamura K: Anatomical feature of the middle cranial fossa in fetal periods: possible etiology of superior canal dehiscence syndrome. *Acta Otolaryngol*. 2011 Dec 27. [Epub], *Acta Otolaryngol* 132: 385-90, 2012
 33. Kato T, Nishigaki Y, Noguchi Y, Fuku N, Ito T, Mikami E, Kitamura K and Tanaka M: Extended screening for major mitochondrial DNA point mutations in patients with hereditary hearing loss. *J Hum Genet*, (13 September 2012) | doi:10.1038/jhg.2012.109 [OnlineP]
 34. Kato T, Fuku N, Noguchi Y, Murakami H, Miyachi M, Kimura Y, Tanaka M and Kitamura K: Mitochondrial DNA haplogroup associated with hereditary hearing loss in a Japanese population. *Acta Otolaryngol*. 132: 1178-82, 2012
 35. Yamasoba T, Miller JM, Ulfendal M. Altschuler RA. Frontier in the treatment of hearing loss. *LePrell CG, Henderson D, Fay*

RR, Popper AN (eds) Noise-induced hearing loss: Scientific advances. Springer Handbook of Auditory Research 40. pp. 339-367, 2012.

学会発表

1. 岩佐陽一郎:日本人高度感音難聴患者における OTOF 遺伝子変異の頻度の検討, 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2012.5.10-12. 朱鷺メッセ
2. 吉村豪兼:先天性高度感音難聴小児例における MYO7A 遺伝子解析, 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2012.5.10-12. 朱鷺メッセ
3. 宇佐美真一: 難聴のパーソナル医療: 遺伝子診断から人工内耳まで, 第 36 回 日本遺伝カウンセリング学会 2012.6.8-6.10. 信州大学
4. Miyagawa M, Nishio S, Fukuoka H, Tsukada K, Usami S.: Mutation spectrum and clinical characteristics of hearing loss patients caused by SLC26A4 mutations: a large cohort study. 27th Barany Society Meeting 2012.6.10-13. Uppsala, Sweden
5. 吉村豪兼、福島邦博、岩崎聡、工 穰、宇佐美真一: CDH23 遺伝子変異が同定された Usher 症候群タイプ 1 症例, 第 7 回 日本小児耳鼻咽喉科学会総会 2012.6.21-22. 岡山
6. 矢野卓也、小林有美子、佐藤宏明、宇佐美真一: MYO15A 遺伝子変異を認めた両側高度感音難聴の 1 症例. 第 74 回耳鼻咽喉科臨床学会 2012.7.5~6. 東京ドームホテル
7. Usami S, Miyagawa M, Naito T, Nishio S, Takumi Y, Iwasaki S: The genetic background of the patients with cochlear implantation. Collegium 2012. 2012.8.26-30 ローマ
8. Usami S: Genetic testing in SNHL 6th Instructional workshop and consensus in auditory implants. 2012.8.30-9.2. スロバキア
9. 西尾信哉、宮川麻衣子、内藤武彦、宇佐美真一: 次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析 (1) ~方法論および変異検出アルゴリズムについて~. 第 22 回日本耳科学会総会. 2012.10.4~6. 名古屋国際会議場
10. 宮川麻衣子、内藤武彦、西尾信哉、宇佐美真一: 次世代シーケンサーによる難聴の遺伝子解析 (2) ~見出された原因遺伝子および表現型について~ 第 22 回日本耳科学会総会. 2012.10.4~6. 名古屋国際会議場
11. 矢野卓也、西尾信哉、宇佐美真一: ミトコンドリア遺伝子全領域シーケンスによる難聴の遺伝子解析. 第 22 回日本耳科学会総会 2012.10.4~6. 名古屋国際会議場
12. 吉村豪兼、岩崎聡、西尾信哉、工 穰、宇佐美真一、熊川孝三、東野哲也、佐藤宏昭、長井今日子、武市紀人、石川浩太郎、池園哲郎、内藤泰、福島邦博、中西啓: Usher 症候群タイプ 1 症例における原因遺伝子解析. 第 22 回日本耳科学会総会 2012.10.4~6. 名古屋国際会議場
13. 内藤武彦、西尾信哉、岩佐陽一郎、茂木英明、石川浩太郎、市村恵一、宇佐美真一: 難聴患者における KCNQ4 遺伝子遺伝子解析: genotype-phenotype 相関解析 第 22 回日本耳科学会総会 2012.10.4~6. 名古屋国際会議場
14. 宮川麻衣子、茂木英明、工 穰、宇佐美真一: 信州大学における難聴遺伝子診療外来の現況 第 57 回日本聴覚医学会総会 2012.10.11~12. 京都国際会館
15. 工 穰、岩佐陽一郎、吉村豪兼、矢野卓也、内藤武彦、宮川麻衣子、茂木英明、西尾信哉、宇佐美真一: 保険収載となった「先天性難聴の遺伝子診断」の現況について 第 57 回日本聴覚医学会総会 2012.10.11~12 京都国際会館
16. 岩佐陽一郎、西尾信哉、吉村豪兼、宇佐美真一、神田幸彦、阿部聡子、熊川孝三、内藤泰: 高度・重度感音難聴患者における OTOF 遺伝子変異解析. 第 57 回日本聴覚医学会総会 2012.10.11~12. 京都国際会館
17. 吉村豪兼、福岡久邦、塚田景大、工 穰、宇佐美真一: Usher 症候群タイプ 1 の原因遺伝子と前庭機能評価についての検討. 第 71 回日本めまい平衡医学会総 2012.11.28~30. 学術総合センター (東京)
18. Matsunaga T, Mutai H, Suzuki N, Morita N, Masuda S. Genetic diagnosis of Waardenburg syndrome type I by molecular analysis of PAX3 in Japanese patients. The annual meeting of the Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum. 2012 年 8 月 26-29 日 Rome, Italy
19. Shimizu A, Torii C, Suzuki N, Mutai H, Kudoh J, Kosaki R, Matsunaga T, Kosaki K: Rapid and efficient mutation detection in the hundreds of target genes by bench-top next generation sequencer with custom target capture method. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASHG) 2012 年 11 月 6-10 日 San Francisco, California, USA
20. 松永達雄: Auditory Neuropathy の遺伝