

遺伝性難聴および外耳、中耳、内耳奇形に関する調査研究 分担研究課題：遺伝性難聴の遺伝カウンセリングに関する研究

研究分担者 古庄知己 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

研究要旨

信州大学医学部附属病院では、平成19年4月より、耳鼻科難聴グループに遺伝子診療部が協力する形で、耳鼻科・難聴遺伝子診療外来を行っている。月2～3回、プライバシーが守られる人工内耳室において、耳鼻科臨床遺伝専門医・指導医（研究代表者）、難聴外来担当医、遺伝子診療部臨床遺伝専門医・指導医（小児科医、研究分担者）が、1ケースあたり約1時間をかけて対応している。主に、遺伝子検査（インベータ法による既報告変異スクリーニングを中心に）結果が出た患者・家族に対して、①難聴の経過、状態、その理解や受け止め方を聴取する（宇佐美）。②遺伝子検査結果の説明、病態の理解、治療方針の整理を行う（宇佐美）。③DNA、遺伝子に関する一般的な事項から患者・家族固有の遺伝的状态と現実的な対応法の整理まで、「遺伝」に関する詳しい説明をする（古庄）、という流れである。外来開設以来7年間で、209家系225人に対し、遺伝カウンセリングを行った。インベータ法によるスクリーニングにより遺伝子変異が検出されたのは64家系76人（家系内発端者ベースでのスクリーニングの検出率は30.6%）であり、*GJB2*遺伝子変異が最多（29家系33人）であった。候補遺伝子スクリーニングにより変異が検出されたのは5家系7人であった。遺伝子変異が検出されなかった患者のなかには、常染色体優性遺伝形式が想定される29家系31人、先天性CMV感染症4人、臨床症状、染色体検査、およびマイクロアレイCGHで明らかにされたRussell-Silver症候群1人、他、耳硬化症2家系2人があった。難聴診療・研究に精通した耳鼻科専門医と症候群の診療・研究に精通した非耳鼻科臨床遺伝専門医が連携を取り合い、協力して対応する本外来の診療体制は有意義であると考えられる。

A. 研究目的

遺伝医療の目標は、①遺伝性・先天性疾患を持つ人々が、最新の情報を十分提供された上で、自身の身体的特徴を受け止め、必要な医療的（診断、治療、リハビリテーション）・社会的支援（教育、福祉）を受けることにより、できる限り健康的に生活すること、②本人やその家族が、疾患に関する

遺伝的リスクを理解し、将来設計や妊娠・出産などの家族計画について自律的な選択ができること、である。遺伝カウンセリングは、遺伝医療を実践するための診療的基盤であり、以下のように定義される。

「遺伝カウンセリングとは、臨床遺伝専門医を中心に認定遺伝カウンセラー、担当医、看護・心理職種が協力して、自身また

は家族の遺伝に関する問題を抱えるクライアントを対象に、臨床情報の収集に基づき正確な診断と発症・再発リスク評価を行い、わかりやすく遺伝に関する状況の整理と疾患に関する情報提供を行うこと、同時にクライアントが遺伝に関連した様々な負担にその人らしく向き合い、現実的な意思決定（家族性腫瘍の遺伝学的検査やそれに基づく治療・予防のように医学的有用性が認識されているものもあれば、出生前診断や神経難病の発症前診断のように本人・家族の心理社会的有用性に基づいて検討されるものもある）を行っていけるよう継続的な心理社会的支援を行うこと、を含んだ診療行為である。」（古庄・福嶋，2009）

信州大学医学部附属病院では、平成19年4月より、耳鼻科難聴グループに遺伝子診療部が協力する形で、耳鼻科遺伝性難聴外来を行っている。月2～3回、プライバシーが守られる人工内耳室において、宇佐美（臨床遺伝専門医・指導医）、難聴外来担当医、古庄（小児科医、臨床遺伝専門医・指導医）が、1ケースあたり約1時間をかけて、対応している。主に、遺伝子検査（インベータ法による既報告変異スクリーニングを中心に）結果が出た患者・家族に対して、①難聴の経過、状態、その理解や受け止め方を聴取する（宇佐美）。②遺伝子検査結果の説明、病態の理解、治療方針の整理を行う（宇佐美）。③DNA、遺伝子に関する一般的な事項から患者・家族固有の遺伝的状态と現実的な対応法の整理まで、「遺伝」に関する詳しい説明をする（古庄）、という流れである。

平成24年度からは、インベータ法による既報告変異スクリーニングおよび結果説明の際の遺伝カウンセリングが保険収載されたので、再診料金に加えて、遺伝カウンセリング加算をとって診療している。

本分担研究では、これまで同外来で対応したケースの概要を明らかにする。

B. 研究方法

平成25年2月末日までに、209家系225人に対し、遺伝カウンセリングを行った。これらのケースの概要を診療録より調査した。

C. 研究結果

15歳未満の小児が127人、15歳以上が98人であった。

インベータ法によるスクリーニングにより遺伝子変異が検出されたのは64家系76人であった（家系内発端者ベースでのスクリーニングの検出率は30.6%）。その内訳は、*GJB2*変異が29家系33人で最多、次いでミトコンドリア3243変異が16家系17人、*SLC26A4*変異が11家系12人、ミトコンドリア1555変異が6家系13人、ミトコンドリア8296変異が2家系2人であった。

候補遺伝子スクリーニングにより変異が検出されたのは5家系5人であった。内訳は、Auditory neuropathy（*OTOF*遺伝子）、*TECTA*遺伝子、CHARGE症候群（*CHD7*遺伝子）、Usher症候群（*MYO7A*遺伝子）、Jervell and Lange-Nielsen 症候群（*KCNQ1*遺伝子）、*COCH*遺伝子いずれも1家系ずつであった。

129家系130人において、インベータ法によるスクリーニングは陰性であった。このなかに、常染色体優性遺伝形式が想定される29家系31人が含まれていた。また、劣性遺伝難聴の遺伝子変異をヘテロ接合体で有するケースがあった。*GJB2*遺伝子のヘテロ接合性変異は6家系6人において、*SLC26A4*遺伝子のヘテロ接合性変異は1家系1人において検出された。4人が臍帯PCR解析により、先天性CMV感染と診断された。

4人の小児患者では、精神運動発達遅滞±成長障害を呈し、臨床奇形学的診察（研究分担者が同日に対応）の後に、染色体検査（G分染法）、マイクロアレイCGH解析が行われた。うち1人において、染色体均衡型構造異常と11p15の微細重複が検出され、臨床症状と合わせてRussell-Silver症候群と確定した。

他、遺伝子変異は特定しえなかったが症候群性が疑われるケースとして、耳硬化症2家系2人、Alström症候群1家系1人、Oculoauriculovertebral spectrum 1家系1人などがあった。

D. 考察

当院では、本邦最大規模の遺伝性難聴の遺伝カウンセリングを行っている。多数かつ多彩なケースを適切にマネジメントし、質の高い情報提供、心理的支援を行っているのは、以下のような背景を有しているからと考えられる。

① 新生児聴覚スクリーニングに始まり、早期の専門医療機関受診、補聴器装用、そ

して必要者には人工内耳挿入術という先天難聴児への治療・支援が耳鼻科の中核的診療として行われていること。

- ② インベータ法による遺伝子変異スクリーニングシステムの開発、候補遺伝子変異スクリーニングによる解析、さらに、次世代シーケンスを用いた網羅的解析と、原因検索・病態解明のための基礎的研究体制が充実している。
- ③ 遺伝子診療部が、小児期から成人期に至るまであらゆる症候群の臨床的診断、健康管理に精通していること。

保険収載されたインベータ法による遺伝子検査の変異検出率は過去6年間と平成25年～26年の1年間で全く同等（家系内発端者ベースでのスクリーニングの検出率は30.6%）であった。小児の孤発例においては*GJB2*遺伝子変異や*SLC26A4*変異が引き続き高い頻度で見出された。本法の有用性が最も示される患者カテゴリーであると考えられる。

他方、成人の常染色体優性遺伝形式が想定される家系においてはインベータ法による遺伝子検査で変異が検出されることはなかった。しかしながら、一見類似の受け継ぎ方を呈するミトコンドリア1555変異や3243変異などを除外するためには本法によるスクリーニングは必須であると考えられる。今後は、研究として継続される次世代シーケンスによる家系解析の成果が期待される。

小児の孤発例においては、先天性CMV感

感染症、奇形症候群が入ってくる可能性があり、インベータ法による遺伝子検査で変異が検出されない場合には、臍帯を用いたCMVのPCR解析、奇形症候群の診断法を熟知した小児科出身の臨床遺伝専門医による診察や追加検査（染色体検査、マイクロアレイCGH解析など）を考慮する必要がある。

当院では、小児の孤発例においては、ルーチンで臍帯CMVのPCR解析が行われ、またインベータ法による遺伝子検査結果説明時には小児科出身の臨床遺伝専門医（分担者）が必ず関与しているため、もれなく適切な診断ができる体制をとっている。

難聴児・者の原因検索は、第一義的にその診療に生かすことが求められている。インベータ法による遺伝子検査が保険収載されたという事実がそのことを物語っている。最もよい例は*GJB2*遺伝子変異や*SLC26A4*変異による高度難聴を有する児への活用である。新生児聴覚スクリーニングによる超早期発見および遺伝子検査による早期確定診断により、両親の納得も得ながら、かつ、児にとって最適なテンポで補聴器から人工内耳そして積極的ハビリテーションに向かうことができる。当院（信州）においては、難聴児支援と原因遺伝子解析研究に情熱を持って取り組む耳鼻科チームの存在を基盤に、セミナー開催、難聴児支援センターに見る県の支援、そして、難聴診療・研究に精通した耳鼻科専門医と症候群の診療・研究に精通した非耳鼻科臨床遺伝専門医による難聴遺伝子診療外来の存在により、理想的な「難聴児への遺伝子診療」が成立して

いる。

また、インベータ法による遺伝子検査が真に有用なツールとして発展していくためには、変異が検出されない場合の対応のあり方がきわめて重要である。よりよい難聴診療や研究につなげながら、患者・家族への満足度を確保することを考えていく必要がある。当院難聴遺伝子診療外来では、耳鼻科医による難聴への現実的対応法に関するアドバイス、臨床遺伝医による経験的再発率説明（両親健聴で1人先天性高度難聴なら次子の再発率は1/10であり、難聴児の次世代の再発率は1/20、新生児聴覚スクリーニングの有用性を含め）、解析遺伝子を増やした追加研究の導入、さらに、臨床奇形学的診察と症候群としての原因検索（染色体検査、マイクロアレイCGH解析）などを提案するなかで、変異陰性例に対しても高い満足度と診療・研究的発展性を保つように心掛けている。

E. 結論

当院遺伝性難聴外来における7年間の遺伝カウンセリング状況の概要を示した。難聴診療・研究に精通した耳鼻科専門医と症候群の診療・研究に精通した非耳鼻科臨床遺伝専門医が連携を取り合い、協力して対応する本外来の診療体制は有意義であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kosho T (corresponding author),

Mizumoto S, Sugahara K.
Carbohydrate
(N-acetylgalactosamine 4-O)
sulfotransferase 14 (CHST14). In:
Handbook of glycosyltransferases
and related genes (Taniguchi N,
Honke K, Fukuda M, Narimatsu H,
Yamaguchi Y, Angata T, eds),
Springer (in press).

Shimizu K, Wakui K, **Kosho T**
(corresponding author),
Okamoto N, Mizuno S, Itomi K,
Hattori S, Nishio K, Samura O,
Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oishi
T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H,
Fukushima Y. Microarray and
FISH-based genotype-phenotype
analysis of 22 Japanese patients
with Wolf-Hirschhorn syndrome.
Am J Med Genet Part A [Epub
ahead of print].

Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada
Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma
T, Mizuno S, Kawame H,
Fukushima Y, Nakamura T,
Kosho T (corresponding
author). Surgical intervention for
esophageal atresia in patients with
trisomy 18. Am J Med Genet Part A
164(2): 324-330, 2014.

Kosho T (corresponding author),

Kuniba H, Tanikawa Y, Hashimoto
Y, Sakurai H. Natural history and
parental experience of children
with trisomy 18 based on a
questionnaire given to a Japanese
trisomy 18 parental support group.
Am J Med Genet Part A 161A(7):
1531-1542, 2013.

Kosho T (corresponding author),

Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y,
Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H,
Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki
Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S,
Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N,
Mizuno S, Kaname T, Naritomi K,
Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y,
Miyatake S, Mizuguchi T, Saitzu H,
Miyake N, Matsumoto N. Clinical
correlations of mutations affecting
six components of the SWI/SNF
complex: detailed description of 21
patients and a review of the
literature. Am J Med Genet Part A
161A(6): 1221-1237, 2013.

Tsurusaki Y, **Kosho T (equal**
contribution, corresponding
author), Hatasaki K, Narumi Y,
Wakui K, Fukushima Y, Doi H,
Saitzu H, Miyake N, Matsumoto N.
Exome sequencing in a family with
an X-linked lethal malformation
syndrome: clinical consequences of

- hemizygous truncating OFD1 mutations in male patients. *Clin Genet* 83(2): 135-144, 2013.
- Kosho T.** Discovery and delineation of dermatan 4-*O*-sulfotransferase-1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos syndrome. In: *Current Genetics in Dermatology* (Oiso N, Kawada A, eds), InTech, Croatia, pp73-86, 2013.
- Miyake N, Kosho T, Matsumoto N. Ehlers-danlos syndrome associated with glycosaminoglycan abnormalities. *Adv Exp Med Biol.* 2014;802:145-59, 2014.
- Sugiura K, Takeichi T, Tanahashi K, Ito Y, **Kosho T**, Saida K, Uhara H, Okuyama R, Akiyama M. Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by CYP4F22 mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. *J Dermatol Sci*, 2013 [Epub ahead of print].
- Nitta H, Unoki M, Ichiyanagi K, **Kosho T**, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Francastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Japanese and Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. *J Hum Genet* 58(7): 455-460, 2013.
- Tanaka K, Sekijima Y, Yoshida K, Tamai M, **Kosho T**, Sakurai A, Wakui K, Ikeda S, Fukushima Y. Follow-up nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset hereditary neurological diseases in Japan. *J Hum Genet.* 58(8): 560-563, 2013.
- Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, **Kosho T**, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A, Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet Part A* 161(9): 2234-2243, 2013.
- Higashimoto K, Jozaki K, **Kosho T**, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet*

- [Epub ahead of print].
- Kondo E, Nishimura T, Kosho T (corresponding author), Inaba Y, Mitsuhashi S, Ishida T, Baba A, Koike K, Nishino I, Nonaka I, Furukawa T, Saito K. Recessive RYR1 mutations in a patient with severe congenital nemaline myopathy with ophthalmoplegia identified through massively parallel sequencing. *Am J Med Genet Part A* 158A(4): 772-778, 2012.
- Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T (corresponding author), Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Koike K. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet Part A* 158A(4): 861-868, 2012.
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K, Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saito H, Miyake N, Matsumoto N. Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44(4): 376-378, 2012.
- Takezawa Y, Kosho T, Matsuda K, Taira C, Ito Y, Hidaka E, Sugano M, Narumi Y, Mizuuchi A, Kobara H, Wakui K, Okumura N, Fukushima Y, Honda T. [Case with intrauterine fetus death: interphase fluorescence in situ hybridization using buccal cells is useful for examining chromosomal abnormalities when placental villus not available]. *Rinsho Byori* 60(1): 32-36, 2012.
- Narumi Y, Shiohara M, Wakui K, Hama A, Kojima S, Yoshikawa K, Amano Y, Kosho T, Fukushima Y. Myelodysplastic syndrome in a child with 15q24 deletion syndrome. *Am J Med Genet Part A* 158A(2): 412-416, 2012.
- 古庄知己 : 遺伝カウンセリングロールプレイ実習～全人的医学教育としての取り組み～. *日本遺伝カウンセリング学会誌* 34(1) : 20, 2013.
- 古庄知己 : デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群の発見と疾患概念の確立. *日本遺伝カウンセリング学会誌*

- 34(1): 21-29, 2013.
- 古庄知己 : 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部の取り組み～小児科出身の臨床遺伝科医として思うこと. 日本遺伝カウンセリング学会誌 (in press)
- 古庄知己 : 18トリソミー児の調査を通じて. ネオネイタルケア 26(5), 2013.
- 古庄知己 : 遺伝カウンセリングロールプレイ実習～全人的医学教育としての取り組み～. 日本遺伝カウンセリング学会誌 34(1) : 20, 2013.
- 古庄知己 : その他の遺伝性大動脈瘤・大動脈解離—血管型エーラスダンロス症候群. 最新医学別冊 新しい診断と治療のABC(42) 大動脈瘤・大動脈解離, 鈴木亨, 永井良三 (編) 85-92, 2013.
- 古庄知己 : グリコサミノグリカンの異常と新型 Ehlers-Danlos 症候群 (古庄型). 病理と臨床 31(8): 852-860, 2013.
- 古庄知己 : 18トリソミー症候群. 小児科臨床増刊号『臨床医が知っておきたい先天異常』 66 : 55-60, 2013.
- 古庄知己 : 4p-症候群, 5p-症候群. 周産期医学特集『染色体異常と先天異常症候群の診療ガイド』 43(3): 363-367, 2013.
- 古庄知己, 福嶋義光 : 遺伝カウンセリングのノウハウ. 臨牀と研究 89 巻 5 号 : 635-640, 2012 (5月).
- 古庄知己 : 結合組織疾患—Marfan 症候群と Ehlers-Danlos 症候群. 内分泌・糖尿病・代謝内科 34 (3) : 210-220, 2012.
- 古庄知己 : エーラスダンロス症候群. X IV 結合組織異常. 先天代謝異常症候群 第 2 版, pp721-726, 日本臨牀社, 大阪, 2012 (2012/12/20)
- 古庄知己 : Marfan 症候群, Ehlers-Danlos 症候群. 五十嵐隆 (責任編集), 小児疾患の診断治療基準 第 4 版, pp850-853, 東京医学社, 東京, 2012 (2012/11/1)
- 古庄知己 : 新生児領域における出生前診断の進歩. Fetal & Neonatal Medicine 4(3) : 34-39, 2012.
- 古庄知己. きこえと遺伝子 2 (宇佐美真一編), 金原出版, 2012.
- 古庄知己. エーラスダンロス症候群. 別冊日本臨牀・新領域別症候群シリーズ No.20・先天異常症候群第2版 (下), 日本臨牀社, 721-726, 2012.

2. 学会発表

一般演題

古庄知己, 三宅紀子, 福嶋義光, 松本直通 :

D4ST1 欠損に基づく Ehlers-Danlos 症候群の遺伝子解析状況. 第 36 回日本小児遺伝学会 (平成 25 年 4 月 18 日 於 エソール広島, 広島).

古庄知己, 三宅紀子, 福嶋義光 : デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群の発見. 第 116 回日本小児科学会学術集会 (平

成 25 年 4 月 19 日 於 広島).

古庄 知己、石川 真澄、黄瀬 恵美子、鳴海 洋子、関島 良樹、櫻井 晃洋、丸山 孝子、佐藤 瞳、水内 麻子、山下 浩美、玉井 真理子、河村 理恵、涌井 敬子、福嶋 義光：遺伝性・先天性疾患に関する横断的診療連携体制の構築：信州大学医学部附属病院遺伝子診療部の挑戦。第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（平成 25 年 6 月 20 日～23 日 於 信州大学医学部附属病院、松本）。

古庄知己、岳鳳鳴、坂翔太、積田奈々、笠原優子、岡田尚巳、水本秀二、小林身哉、中山淳、三宅紀子、野村義宏、江良択実、籀持淳、石川真澄、涌井敬子、福嶋義光、松本直通、菅原一幸、佐々木克典、武田伸一：デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素（D4ST1）欠損による Ehlers-Danlos 症候群（DDEDS）の疾患モデルの構築と検証。日本人類遺伝学会第 58 回大会（2013/11/21-23 於：江陽グランドホテル）。

Kosho T, Yue F, Saka S, Tsumita N, Kasahara Y, Okada T, Mizumoto S, Kobayashi M, Nakayama J, Miyake N, Nomura Y, Era T, Hatamochi A, Fukushima Y, Matsumoto N, Sugahara K, Sasaki K, Takeda S: Establishment and Validation of iPS Cells and Knockout Mice for dermatan 4-O-sulfotransferase 1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos

Syndrome (DDEDS). American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, Oct 22-26, 2013.

古庄知己、清水健司、岡本伸彦、三宅紀子、大橋博文、松本直通、福嶋義光：D4ST1 欠損に基づく Ehlers-Danlos 症候群の診断基準および健康管理指針の構築。第 35 回日本小児遺伝学会（平成 24 年 4 月 19 日 於 久留米大学筑水会館、久留米）。

古庄知己、鳴海洋子、関島良樹、櫻井晃洋、福嶋義光、水内麻子、山下浩美、玉井真理子、成田伸代、高橋淳、加藤博之、坂本明之、林田美江、越川めぐみ、出浦美智恵、矢野卓也、唐木千穂：「新・重症関節型エーラスダンロス症候群」3 症例の診療状況。第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会（平成 24 年 6 月 9 日～10 日 於 信州大学医学部附属病院、松本）。

古庄知己、福嶋義光、三宅紀子、松本直通、水本修二、菅原一幸、坂翔太、野村義宏、岳鳳鳴、佐々木克典、中山淳、岡田尚巳、武田伸一：デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 の欠損による新型 Ehlers-Danlos 症候群の発見、疾患概念の確立、遺伝子治療の開発。第 110 回信州整形外科懇談会（平成 24 年 8 月 18 日 於 信州大学医学部附属病院）。

古庄知己、水本秀二、小林身哉、藤田芳和、中山淳、三宅紀子、野村義宏、籀持淳、

福嶋義光、菅原一幸、松本直通：デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素 (D4ST1) 欠損による Ehlers-Danlos 症候群 (DD-EDS) の病態探索. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 (2012/10/25-27 於：京王プラザホテル).

Kosho T, Mizumoto S, Kobayashi M, Fujita Y, Nakayama J, Miyake N, Nomura Y, Hatamochi A, Fukushima Y, Sugahara K, Matsumoto N: Pathophysiological features of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 (D4ST1)-deficient Ehlers-Danlos syndrome (DD-EDS). American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting, San Francisco, Nov 6-10, 2012.

招待講演

古庄知己：「デルマタン 4-O-硫酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群 (DDEDS) の発見」第 11 回東北小児成長フォーラム (2014/1/30 於 ホテルメトロポリタン仙台) .

古庄知己：「小児科領域における遺伝学の進歩」松本市小児科医会 (2014/1/25 於 松本館丸ノ内ホール).

古庄知己：「遺伝性・先天性疾患を持つ人々を診療し、支援する側から日本の出生前診断を考える～18 トリソミーの臨床研究と信州 NIPT ワーキングの取り組みを通じて～」 第 156 回染色

体研究会 (2013/12/14 於 東京医科大学病院).

古庄知己：「新型出生前検査の実際と問題点～18 トリソミーに関する最新の知見を含めて～」 第 249 回長野県周産期カンファレンス (2013/11/6 於 信州大学医学部附属病院).

古庄知己：「信州での PWS ケア～信州 PWS プロジェクト～」 Meet the Specialists (2013/9/15 於 六本木アカデミーヒルズ).

古庄知己：「18 トリソミーの会アンケート調査結果論文化までの道のり」 18 トリソミーの会公開シンポジウム in 滋賀 (2013/7/14 於 ピアザ淡海 滋賀県立県民交流センター).

古庄知己：「信州大学医学部附属病院遺伝子診療部の取り組み～小児科出身の遺伝科医としての関わりと思い」古庄知己 シンポジウム 2 「出生前診断新時代を迎えて」 第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 (平成 25 年 6 月 22 日 於 川崎市産業振興会館、川崎).

古庄知己：「EDS 研究の現状」2013 年度 JEFA 総会 (2013/5/25 於 日本医科大学).

古庄知己：「整形外科疾患は遺伝性・先天性疾患の宝庫～代表的疾患から古庄型 EDS まで～」信州大学医学部整形外科学教室・整形外科セミナー (平成 24 年 9 月 3 日 於 信州大学医学部附属病院). 古庄知己「EDS の臨床～基本

的なこと、新しいこと～」2012 年度
JEFA 総会 (2012/6/30、於 横浜市浦
舟地域ケアプラザ)。

古庄知己：「デルマタン硫酸 4-O-硫酸基転
移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エー
ラスダンロス症候群の発見および疾患
概念の確立」第 36 回日本遺伝カウ
ンセリング学会学術集会・市民公開シ
ンポジウム (平成 24 年 6 月 9 日～10 日
於 信州大学医学部附属病院、松本)。

古庄知己：「デルマタン硫酸 4-O-硫酸基転
移酵素 (D4ST-1) 欠損による新型エー
ラスダンロス症候群の発見および疾患
概念の確立～根治療法の開発をめざし
て～」古庄知己 国立精神・神経医療
研究センター神経研究所 所内セミナ
ー (平成 24 年 4 月 20 日 於 研究所
3 号館セミナールーム、小平)。

受賞

古庄知己：平成 25 年度日本医師会医学研
究奨励賞「デルマタン 4-O-硫酸基転
移酵素-1 欠損に基づくエーラスダンロス
症候群の病態解明と治療法の開発」(平
成 25 年 11 月 1 日 於 日本医師会館)。

古庄知己、三宅紀子、福嶋義光：第 116 回
日本小児科学会学術集会最優秀演題賞
(広島県知事賞)「デルマタン 4-O-硫
酸基転移酵素-1 欠損に基づく新型エー
ラスダンロス症候群の発見」(平成 25
年 4 月 19 日 於 広島)

古庄知己、三宅紀子、福嶋義光、松本直通：
D4ST1 欠損に基づく Ehlers-Danlos 症

候群の遺伝子解析状況。第 36 回日本小
児遺伝学会 (平成 25 年 4 月 18 日 於
エソール広島、広島)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

- [1] Yoshida H, Takahashi H, Kanda Y, Usami S. Long term speech perception after cochlear implant in pediatric patients with *GJB2* mutations. *Auris Nasus Larynx* 40(5): 435-439. 2013
- [2] Ganaha A, Kaname T, Yanagi K, Naritomi K, Tono T, Usami S, Suzuki M. Pathogenic substitution of IVS15+5G>A in *SLC26A4* in patients of Okinawa Islands with enlarged vestibular aqueduct syndrome or Pendred syndrome. *BioMed Central* 14(56): 2-10. 2013
- [3] Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Yano T, Kumakawa K, Abe S, Ishikawa K, Kojima H, Namba A, Oshikawa C, Usami S. Comprehensive Genetic Screening of *KCNQ4* in a Large Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss Cohort: Genotype-Phenotype Correlations and a Founder Mutation. *PLoS ONE* 8(5): e63231. 2013
- [4] Miyagawa M, Naito T, Nishio S, Kamatani N, Usami S. Targeted exon sequencing successfully discovers rare causative genes and clarifies the molecular epidemiology of Japanese deafness patients. *PLoS ONE* 8(8): e71381. 2013
- [5] Miyagawa M, Nishio S, Ikeda T, Fukushima K, Usami S. Massively parallel DNA sequencing successfully identifies new causative mutations in deafness genes in patients with cochlear implantation and EAS. *PLoS ONE* 8(10): e75793. 2013
- [6] Iwasa Y, Nishio S, Yoshimura H, Kanda Y, Kumakawa K, Abe S, Naito Y, Nagai K, Usami S. *OTOF* mutation screening in Japanese severe to profound recessive hearing loss patients. *BMC Med Genet* 14(1): 95. 2013
- [7] Yano T, Ichinose A, Nishio S, Kobayasi Y, Sato H, Usami S. A Novel Mutation of *MYO15A* Associated with Hearing Loss in a Japanese Family. *J Clin Case REP* 3(12):2-4. 2013
- [8] 西尾信哉、宇佐美真一 難聴の遺伝子診断と次世代シーケンス解析. *医学のあゆみ* 245(5): 393-400. 2013
- [9] Yano T, Nishio S, Usami S, deafness gene study consortium. Frequency of mitochondrial mutation in non-syndromic hearing loss as well as possibly responsible variants found by whole mitochondrial genome screening. *J Hum Genet* 59: 100-106. 2014
- [10] Yoshimura Y, Iwasaki S, Nishio S, Kumakawa K, Tono T, Kobayasi Y, Sato H,

- Nagai K, Ishikawa K, Ikezono T, Naito Y, Fukushima K, Oshikawa C, Kimitsuki T, Nakanishi H, Usami S. Massively Parallel DNA Sequencing Facilitates Diagnosis of Patients with Usher Syndrome Type 1 PLoS ONE 9: e90688. 2014
- [11] Yoshimura H, Takumi Y, Nishio S, Suzuki N, iwasa Y, Usami S. Deafness Gene Expression Patterns in the Mouse Cochlea Found by Microarray Analysis. PLoS ONE9:e92547. 2014
- [12] Ishikawa K, Naito T, Nishio S, Iwasa Y, Nakamura K, Usami S, Ichimura K. A Japanese family showing high-frequency hearing loss with *KCNQ4* and *TECTA* mutations. Acta Otolaryngol 2014 in press.
- [13] Miyagawa M, Nishio S, Usami S. Mutation spectrum and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients caused by *SLC26A4* mutations in the Japanese: a large cohort study. J Hum Genet 2014 in press.
- [14] Kimura Y, Kubo S, Koda H, Shigemoto K, Sawabe M, Kitamura K. RNA analysis of inner ear cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) archival human temporal bone section using laser microdissection. A technical report. Hear Res 302:26-31, 2013
- [15] Nishio A, Noguchi Y, Sato T, Naruse T, Kimura A, Takagi A, Kitamura K. A DFNA5 Mutation Found in Japanese Families with Autosomal Dominant Hereditary Hearing Loss. Ann Hum Genet(in press)
- [16] 本田圭司、野口佳裕、加藤智史、奥野秀次、喜多村 健：網羅的解析により診断された耳小骨奇形を合併したミトコンドリア 3243 変異例. Otol Jpn 23:227-32, 2013
- [17] 野口佳裕、伊藤卓、川島慶之、西尾綾子、本田圭司、喜多村 健：前庭水管拡大症を伴う SLC26A4、ATP6V1B1、SIX1 変異例の聴平衡覚所見の検討. Equilibrium Res 72:97-106, 2013
- [18] Ito T, Li X, Kurima K, Choi BY, Wangemann P, Griffith AJ.: Slc26a4-insufficiency causes fluctuating hearing loss and stria vascularis dysfunction. Neurobiol Dis. 2014(in press).
- [19] Ito T, Choi BY, King KA, Zalewski CK, Muskett J, Chattaraj P, Shawker T, Reynolds JC, Butman JA, Brewer CC, Wangemann P, Alper SL, Griffith AJ.: SLC26A4 genotypes and phenotypes associated with enlargement of the vestibular aqueduct. Cell Physiol Biochem. 2011;28:545-52.
- [20] Choi BY, Kim HM, Ito T, Lee KY, Li X, Monahan K, Wen Y, Wilson E, Kurima K, Saunders TL, Petralia RS, Wangemann P, Friedman TB, Griffith AJ.: Mouse model

- of enlarged vestibular aqueducts defines temporal requirement of Slc26a4 expression for hearing acquisition. *J Clin Invest*. 2011 Nov;121:4516-25.
- [21] 熊川孝三、三澤建、松田絵美、真岩智道、鈴木久美子、加藤央、武田英彦：新生児聴覚スクリーニングの偽陽性率を減らすための試行制度の検討。*Audiology Japan* 56:163-170, 2013.
- [22] 三澤建、熊川孝三、加藤央、武田英彦：人工内耳埋め込み術を施行した蝸牛型耳硬化症および van der Hoeve 症候群の長期成績と当院における治療戦略。*Otol Japan* 23:841-87, 2013.
- [23] 今井直子、熊川孝三、安達のどか、浅沼総、大橋博文、坂田英明、山嵜達也、宇佐美真一：GJB2 変異例における進行性難聴の特徴と遺伝子型の検討。*小児耳鼻咽喉科* 34:352-359, 2013.
- [24] 新藤 晋、杉崎 一樹、伊藤 彰紀、柴崎 修、水野 正浩、松田 帆、井上 智恵、加瀬 康弘、池園 哲郎：新しい半規管機能検査法 -video Head Impulse Test- *Equilibrium Research* 73(1) 2014 in press.
- [25] 池園 哲郎：難治性めまいへのアプローチ 外リンパ瘻 診断基準の改定と臨床所見の特徴 *Equilibrium Research* 72(4):215-221 2013.08
- [26] 池園哲郎：【耳鼻咽喉科領域の外傷】外傷性外リンパ瘻 *ENTONI* 155:17-22 2013.07
- [27] 池園哲郎：外リンパ瘻 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 85(5):242-247, 2013.4
- [28] Nishiyama N, Kawano A, Kawaguchi S, Shirai K, Suzuki M: Cochlear implantation in a patient with Epstein syndrome. *Auris Nasus Larynx* 40:409-412, 2013
- [29] Ikeya J, Kawano A, Nishiyama N, Kawaguchi S, Hagiwara A, Suzuki M: Long-term complications after cochlear implantation. *Auris Nasus Larynx* 40: 525-529, 2013
- [30] 河野 淳、西山信宏、河口幸江、白井杏湖、富澤文子、芥野由美子、野波尚子、鈴木 衛、齋藤友介：0歳時受診難聴児の現状と対応－聴覚・人工内耳センター開設3年間の経過。 *Audiology Japan* 56: : 73-81, 2013
- [31] Kaga K: *Vertigo and Balance Disorders in Children*. Springer, Germany, 2014.2
- [32] Kaga K, Asato H(Ed): *Microtia and Atresia Combined Approach by Plastic and Otolologic Surgery*. KARGER, Switzerland, 2013
- [33] 加我君孝編：新生児・幼小児の難聴。診断と治療社、東京、2014.2
- [34] Minami S, Kaga K, Matsunaga T., et al : GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns. *Gene* 2013; 532:41-45
- [35] 木戸口正典、南修司郎、竹腰英樹、加我君孝：鼓室に逸脱する内頸動脈走行異常を合

- 併する人工内耳手術の経験. *Otology Japan* 2013.7.25; 23(3):243-247
- [36] 加我君孝、新正由紀子、関口香代子、内山勉、坂田英明：新生児聴覚スクリーニング.
日本マス・スクリーニング学会誌 2013.6.1 ; 23(1) : 25-38
- [37] 加我君孝：新生児聴覚スクリーニングと小児の人工内耳と脳の可塑性. コミュニケーション障害学 日本コミュニケーション障害学会 2013;30(3):171-177
- [38] 加我君孝編：新生児・幼児の耳音響放射と ABR. 診断と治療社、東京、2012
- [39] 加我君孝編：新耳鼻咽喉科学. 南山堂、東京、2013.1
- [40] 加我君孝、竹腰英樹、加地展之、朝戸裕貴：両側小耳症・外耳道閉鎖症に対する手術—2つの耳の形と機能を再建する—. 都耳鼻会報 2012, No.138, pp50-56
- [41] 増田毅、加我君孝：両側内耳奇形児の平衡機能と運動の発達について. *Equilibrium Res.*2012、71(4):270-75
- [42] 加我君孝：中耳・内耳・中枢聴覚伝導路の発達. *チャイルドヘルス* 2012,
15(10):696-700
- [43] Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T. Diverse spectrum of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: A cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013;8(1):172
- [44] Minami SB, Mutai H, Nakano A, Arimoto, Y, Taiji H, Morimoto N, Sakata H, Adachi N, Masuda S, Sakamoto H, Yoshida H, Tanaka F, Sugiuchi T, Kaga K, Matsunaga T. GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns. *Gene* 2013; 532(1):41-45
- [45] Okamoto Y, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Sugiuchi T, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Ogahara N, Takagi A, Taiji H, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T. Subgroups of enlarged vestibular aqueduct in relation with *SLC26A4* mutations and hearing loss. *Laryngoscope* 2013[Epub ahead of print]
- [45] Takiguchi Y, Sun G, Ogawa K, Matsunaga T. Long-lasting changes in the cochlear K⁺ recycling structures after acute energy failure. *Neurosci Res* 2013;77(1-2):33-41
- [46] Matsunaga T, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. Genetic analysis of PAX3 for diagnosis of Waardenburg syndrome type I. *Acta Otolaryngol* 2013;133(4):345-351
- [47] Watabe T, Matsunaga T, Namba K, Mutai H, Inoue Y, Ogawa K. Moderate hearing loss associated with a novel KCNQ4 non-truncating mutation located near the

- N-terminus of the pore helix. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 432(3): 475-479
- [48] Nakano A, Arimoto Y, Matsunaga T. Cochlear nerve deficiency and associated clinical features in patients with bilateral and unilateral hearing loss. *Otol Neurotol* 2013; 34(3): 554-558
- [49] 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* 2013; 77: 228-232
- [50] Arimoto Y, Namba K, Nakano A, Matsunaga T. Chronic constipation recognized as a sign of a SOX10 mutation in a patient with Waardenburg syndrome. *Gene*(in press)
- [51] Fujioka M, Okamoto Y, Shinden S, Okano HJ, Okano H, Ogawa K, Matsunaga T. Pharmacological inhibition of cochlear mitochondrial respiratory chain induces secondary inflammation in the lateral wall: a potential therapeutic target for sensorineural hearing loss. *PLOS ONE* (in press)
- [52] 鴨頭輝、狩野章太郎、山嵜達也. 視床-正常機能各論 聴覚. *Clinical Neuroscience* 31 : 66-67, 2013
- [53] Makizumi Y, Kashio A, Sakamoto T, Karino S, Kakigi A, Iwasaki S, Yamasoba T. Cochlear implantation in a patient with osteogenesis imperfecta. *Auris Nasus Larynx*. 40:510-3, 2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Comprehensive Genetic Screening of *KCNQ4* in a Large Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss Cohort: Genotype-Phenotype Correlations and a Founder Mutation

Takehiko Naito¹, Shin-ya Nishio¹, Yoh-ichiro Iwasa¹, Takuya Yano¹, Kozo Kumakawa², Satoko Abe², Kotaro Ishikawa³, Hiromi Kojima⁴, Atsushi Namba⁵, Chie Oshikawa⁶, Shin-ichi Usami^{1*}

1 Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan, **2** Department of Otolaryngology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan, **3** Department of Otorhinolaryngology, Jichi Medical University, Tochigi, Japan, **4** Department of Otorhinolaryngology, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan, **5** Department of Otorhinolaryngology, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan, **6** Department of Otorhinolaryngology, Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, Japan

Abstract

The present study of *KCNQ4* mutations was carried out to 1) determine the prevalence by unbiased population-based genetic screening, 2) clarify the mutation spectrum and genotype/phenotype correlations, and 3) summarize clinical characteristics. In addition, a review of the reported mutations was performed for better understanding of this deafness gene. The screening using 287 probands from unbiased Japanese autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (ADNSHL) families identified 19 families with 7 different disease causing mutations, indicating that the frequency is 6.62% (19/287). While the majority were private mutations, one particular recurrent mutation, c.211delC, was observed in 13 unrelated families. Haplotype analysis in the vicinity of c.211delC suggests existence of a common ancestor. The majority of the patients showed all frequency, but high-frequency predominant, sensorineural hearing loss. The present study adds a new typical audiogram configuration characterized by mid-frequency predominant hearing loss caused by the p.V230E mutation. A variant at the N-terminal site (c. 211delC) showed typical ski-slope type audiogram configuration. Concerning clinical features, onset age was from 3 to 40 years old, and mostly in the teens, and hearing loss was gradually progressive. Progressive nature is a common feature of patients with *KCNQ4* mutations regardless of the mutation type. In conclusion, *KCNQ4* mutations are frequent among ADNSHL patients, and therefore screening of the gene and molecular confirmation of these mutations have become important in the diagnosis of these conditions.

Citation: Naito T, Nishio S-y, Iwasa Y-i, Yano T, Kumakawa K, et al. (2013) Comprehensive Genetic Screening of *KCNQ4* in a Large Autosomal Dominant Nonsyndromic Hearing Loss Cohort: Genotype-Phenotype Correlations and a Founder Mutation. PLoS ONE 8(5): e63231. doi:10.1371/journal.pone.0063231

Editor: Klaus Brusgaard, Odense University hospital, Denmark

Received: October 22, 2012; **Accepted:** April 2, 2013; **Published:** May 23, 2013

Copyright: © 2013 Naito 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/>) (S.U.), by the Acute Profound Deafness Research Committee of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (<http://www.mhlw.go.jp/english/>) (S.U.), 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/>) (S.U.), 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/>) (S.U.). 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

Autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (ADNSHL) is extremely heterogeneous. To date, more than 60 DFNA loci have been identified and 27 genes for DFNA have been identified (Van Camp G, Smith RJH. Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org>). Genetic testing has become crucial for precise diagnosis, progression estimation, and selection of ideal intervention. However, due to such genetic heterogeneity and lack of recurrent mutations, routine genetic testing for ADNSHL has lagged. Linkage analysis is a powerful tool to identify a responsible gene for ADNSHL, but in the usual clinical setting, only a limited number of samples are available and this is insufficient for linkage analysis. Among ADNSHL genes, several are frequent, for example, *WFS1*, *KCNQ4*, *COCH*, *GJB2*, *MYO1A*,

and *TECTA* [1]. Based on the number of reported mutations, the *KCNQ4* gene (responsible gene for DFNA2) is known to be one of the most frequent responsible genes for ADNSHL [1]. *KCNQ4*, a member of the voltage-gated potassium channel family, plays a role in potassium recycling in the inner ear [2]. In this 695-amino acid protein there are six transmembrane domains and a hydrophobic P-loop region, which is between the transmembrane domains S5 and S6 (residues 259 to 296). A channel pore, containing a potassium ion-selective filter, is formed by the P-loop domain. Channel function of this selectivity filter is eliminated by pore region mutations [2]. DFNA2-associated hearing loss has been reported to be typically late onset high frequency-involved and progressive over time, as opposed to early onset and severe loss in recessive forms [3]. To date, more than ten pathologic mutations have been identified in *KCNQ4* and they are mostly

missense mutations with a dominant-negative mechanism [3]. It was a matter of interest to know the prevalence of *KCNQ4* mutations to be found through unbiased population-based genetic screening. In this study, we performed the screening in a comprehensive manner to establish the mutation spectrum and genotype/phenotype correlations associated with this type of ADNSHL. Also, we were interested to know whether there are any recurrent mutations. In addition, we reviewed the reported mutations for better understanding of this deafness gene. We found that *KCNQ4* is frequent among ADNSHL patients, and therefore an important causative gene to be screened.

Materials and Methods

Subjects and clinical evaluation

The subjects participating in this study were 287 probands, each from an independent Japanese ADNSHL family. Whether or not progression was present was based on anamnestic evaluation. None of the subjects had any other associated neurological signs, visual dysfunction or diabetes mellitus. The control group was 252 unrelated Japanese individuals with normal hearing evaluated by auditory testing. The average threshold in the conversation frequencies (0.5 kHz, 1 kHz, 2 kHz) was calculated for the better ear, and severity of hearing loss was noted to be normal (-19 dB) in 24 subjects, mild (20–39 dB) in 69 subjects, moderate (40–69 dB) in 132 subjects, severe (70–94 dB) in 23 subjects, and profound (≥ 95 dB) in 24 subjects. Subjects with high frequency hearing loss only at 4 kHz and 8 kHz were classified as normal because they had normal hearing at 0.5, 1 and 2 kHz. Hearing loss severity was not obtained for 15 subjects. All probands' pure-tone thresholds were recorded on the frequencies of 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, and 8000 Hz.

Ethics Statement

All subjects or next of kin, caretakers, or guardians on the behalf of the minors/children gave prior written informed consent for participation in the project, and the Ethical Committee of Shinshu University approved the study and the consent procedure.

Mutation analysis

All fourteen exons and flanking intronic sequences of the *KCNQ4* gene were amplified by polymerase chain reaction PCR. Primers were designed to flank all of the exon-intron boundaries through use of the Primer3 web based server. Each genomic DNA sample (40 ng) was amplified using Multiplex PCR Assay Kit (Takara, Shiga, Japan) for 5 min at 95°C, followed by 40 three-step cycles of 94°C for 30 s, 60–67.6°C for 90 s, and 72°C for 90 s, with a final extension at 72°C for 10 min, ending with a holding period at 4°C in a Perkin-Elmer thermal cycler. The PCR products varied in size at about 100–400 bp, and they were treated with 0.1 ul exonuclease I (Amersham) and 1 ul shrimp alkaline phosphatase (Amersham) and by incubation at 37°C for 30 min, and inactivation at 80°C for 15 min. After the products were purified, we performed standard cycle sequencing reaction with ABI Big Dye terminators in an ABI 3100 autosequencer (Applied Biosystems).

Computer analysis to predict the effect of missense variants on the protein function was performed with wANNOVAR (<http://wannovar.usc.edu>) including the functional prediction software listed below. PhyloP (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/phyloP4way/>), Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT; <http://sift.jcvi.org/>), Polymorphism Phenotyping (PolyPhen2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), LRT

(http://www.genetics.wustl.edu/jflab/lrt_query.html), and MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>).

Haplotype analysis

Haplotype pattern within the 1Mbp region surrounding position c.211, where the frequent Japanese mutation c.211delC was found, was analyzed using a set of 48 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (21 sites upstream and 27 sites downstream). Haplotype analysis was performed by the direct sequencing method described above.

Statistical analysis of progression of hearing loss

Each subject's ages at the time of examination and their pure tone thresholds were plotted for detailed progression analysis with 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 Hz, respectively. The average progressive rates of hearing loss (db/year) were calculated by linear regression lines, and analysis of difference of the rates was performed using analysis of covariance (ANCOVA) with SPSS ver19 software.

Results

Mutation analysis

Direct DNA sequencing identified 8 possible disease-causing mutations among 20 autosomal dominant families (Table 1). There were one deletion mutation (c.211delC), one insertion mutation (c.229_230insGC), and 6 missense mutations (p.F182L, p.V230E, p.W276S, p.P291S, p.P291L, p.R297S) (Table 1). These included 5 novel and three previously reported pathologic mutations: c.211delC, p.F182L, and p.W276S (Table 1, Fig. 1). However, we excluded p.F182L as it is unlikely to be pathologic, according to the prediction program (Table 1). p.F182L was also found in a control sample with normal audiogram (Table 1). Therefore, 7 pathologic mutations from 19 families were found in a total of 287 ADNSHL families in this study (Fig. S1). Concerning the domains in which the 7 mutations were localized, 2 mutations were found in the N-terminal cytoplasmic domain, one mutation in the S4–S5 linker domain, 3 mutations in the pore region and the P-loop region, and one mutation in the S-6 transmembrane domain (Table 1, Fig. 1).

Frequency of *KCNQ4* mutations

The frequency of *KCNQ4* mutations found in ADNSHL families in this study was 6.62% (19/287). The most prevalent mutation was c.211delC, at 4.53% (13/287) and it accounted for 68.4% (13/19) of all *KCNQ4* mutations.

Haplotype analysis

Haplotype pattern within the 1Mbp region surrounding the position of the most frequent mutation c.211delC, was characterized using a set of 48 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (21 sites upstream and 27 sites downstream). All patients from 6 families with c.211delC showed an exactly identical pattern in the allele with c.211delC, though the other allele showed a variety of haplotype patterns (Fig. 2).

Clinical characteristics

Table 2 summarizes clinical characteristics of 36 patients from 19 families with hearing loss caused by the *KCNQ4* mutations, including age at their first visit to the ENT clinic, onset age (age of awareness), audiogram configuration, progression of hearing loss, tinnitus, and vestibular symptoms. The ages at first clinic visits were from 0 to 78 years. Ages of onset (awareness age) ranged