



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	遺伝子解析をしたAuditory Neuropathy症例の歪成分耳音響放射(DP0AE)の経過 [全文の要約]
Author(s)	北尾, 恭子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2294 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12553号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66034
Type	doctoral thesis
File Information	Kyoko_Kitao_summary.pdf



学 位 論 文(要約)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

北尾 恭子

Kyoko Kitao

学 位 論 文(要約)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

北尾 恭子

Kyoko Kitao

目 次

緒言	2 頁
略語表	13 頁
対象・方法	14 頁
結果	17 頁
考察	20 頁
総括及び結論、今後の展望	22 頁
謝辞	24 頁
引用文献	25 頁

【緒言】

① 論文の背景

難聴について

難聴には外耳～中耳内で音の伝わりが障害されて起こる伝音難聴と、内耳から聴覚中枢までの聴覚経路の障害において起こる感音難聴、その 2 つが組み合わさった混合難聴の 3 種類に大別される。

感音難聴は、内耳に原因がある内耳性難聴と、内耳以降聴覚中枢までの経路に障害がある後迷路性難聴に分類される。後迷路性難聴とは、聴神経腫瘍や中枢性難聴など、聴神経より中枢側に原因を持つ病態と定義されている。

内耳性難聴ではその障害部位が、有毛細胞、らせん神経節、蝸牛外側壁線維細胞の障害や、蝸牛内リンパのカリウムイオンリサイクリング障害によるものなど多岐にわたる。

内耳性難聴の原因には、加齢性、遺伝性、騒音性、突発性、外リンパ漏、メニエール病などが挙げられる。中でも、小児の先天性感音難聴の原因としては、遺伝性難聴(後述)が約半分を占めると言われている。

感音難聴を評価するのに頻用される検査には、標準純音聴力検査、耳音響放射 Otoacoustic Emission (OAE) (後述)、聴性脳幹反応 Auditory Brain Response (ABR)がある。

遺伝性難聴について

遺伝性難聴とは、遺伝子突然変異により引き起こされる難聴である。出生 500-1000 人に 1 人の頻度で発生する。小児先天性難聴の約半数が遺伝性と言われている¹。遺伝性難聴は、随伴症候を伴う症候群性難聴、他に身体症候を伴わない非症候群性難聴に大別され、また遺伝形式には常染色体優性・劣性、伴性(主に X 連鎖性)、ミトコンドリア性がある。難聴の原因遺伝子は、非症候群性難聴の原因だけでも数十種類、症候群性難聴の原因まで含めると数百種類が知られる。この事実は、正常な聴力の発達、すなわち外・中・内耳の形態形成と細胞分化、内リンパ液性状の維持、音刺激の有毛細胞における受容と興奮、蝸牛神経への情報伝達と中枢神経系への伝導等の各機構の構築に、多様な細胞腫およびそれらが発現するさまざまな遺伝子が重要な役割を果たすことを反映している。

今回の研究に関連する遺伝子異常と、その遺伝子が発現する蝸牛内の細胞について表 1、図 1 にまとめた。

原因遺伝子変異	難聴の病態
<i>OTOF</i>	内有毛細胞シナプス小胞放出障害 ²
<i>GJB2</i>	蝸牛内ギャップジャンクション機能不全によるカリウムイオンリサイクリングの障害 ³
<i>OPA1</i>	蝸牛神経の萎縮 ⁴
<i>CDH23</i>	内有毛細胞聴毛の形成不全 ⁵

表 1 難聴原因遺伝子とその病態

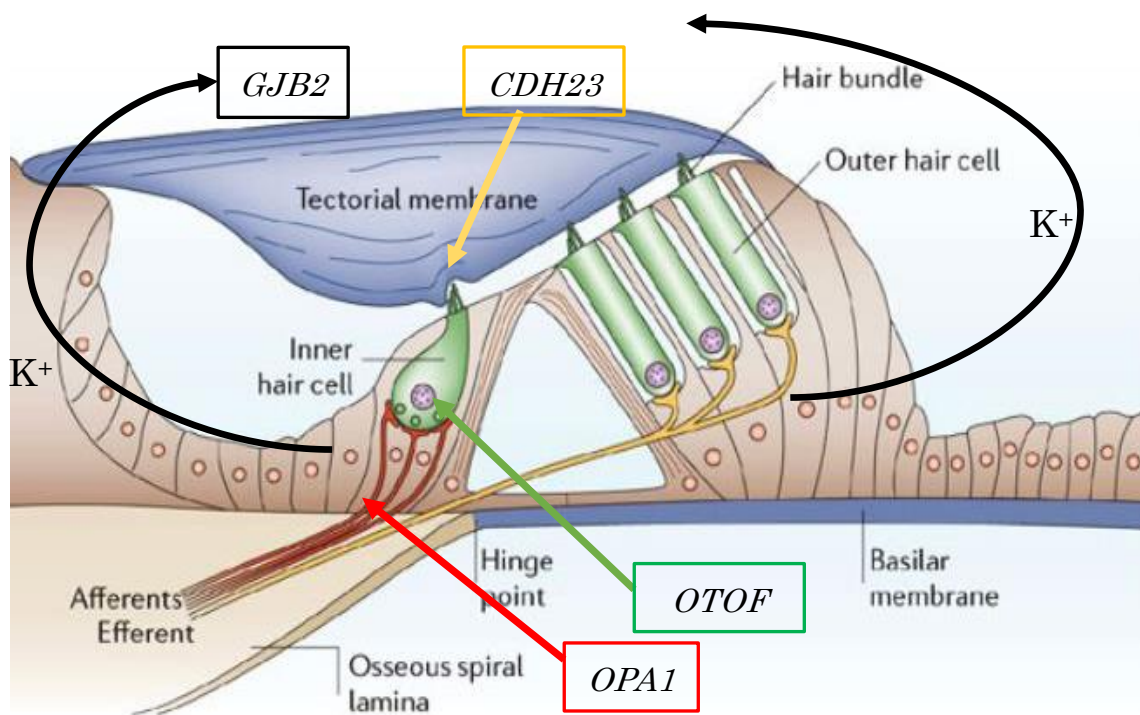


図 1 遺伝子変異とその蝸牛内障害部位（文献 6, 7 より改変して引用）

耳音響放射（Otoacoustic Emission; OAE）について⁸

音刺激により、外有毛細胞表面に生えている聴毛が曲がり、脱分極・過分極を起こすことから外有毛細胞体の短縮と伸長を起こし、これが蝸牛基底版の振動を引き起こす（図 2）ことで内リンパ流を刺激して発生する音のことを耳音響放射という。外有毛細胞の自発的な運動能に由来し、なにも音刺激がなくても狭帯域の音響が放射自発性耳音響放射（Spontaneous Otoacoustic Emission: SOAE）と、クリックなどの短音で刺激、その後 20ms 程度にわたり外耳道内の音響を測定する Transient Evoked Otoacoustic Emission : TEOAE、DPOAE（後述）の 3 種類がある。

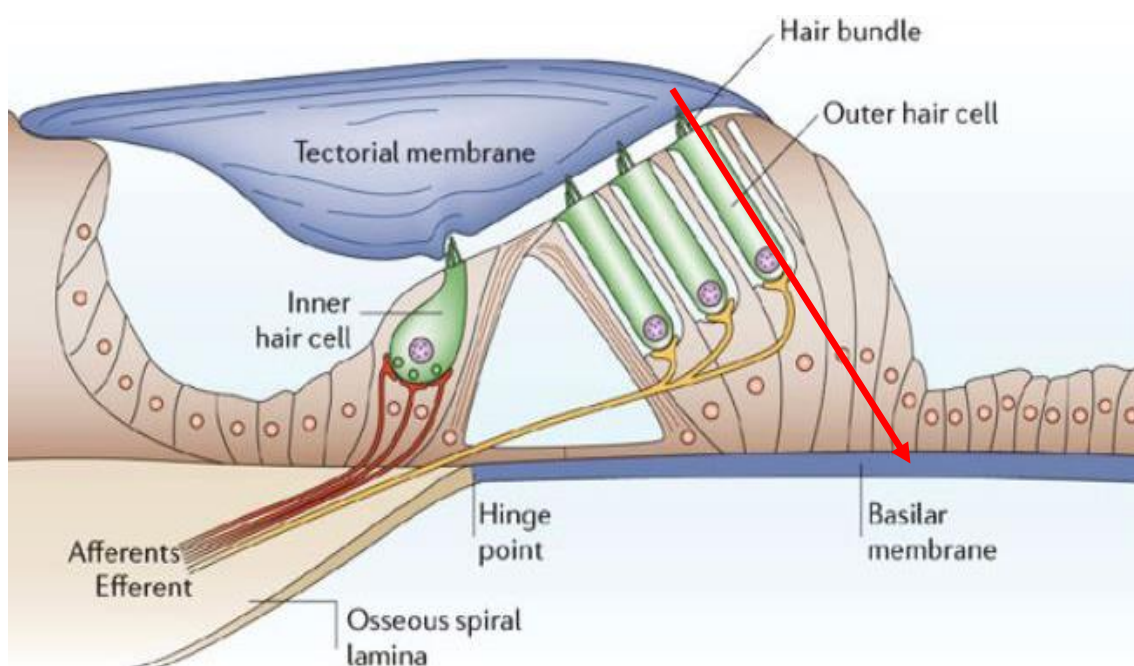


図 2 OAE の機序

音刺激→外有毛細胞の聴毛→外有毛細胞体→基底版の振動へとつながる。

歪成分耳音響放射(Distortion Product Otoacoustic Emission; DPOAE) 検査について (図 3,図 4) ⁹

前述の OAE の一種、歪 (ひずみ) 成分耳音響放射を用いて、周波数の異なる 2 音(f_1 、 f_2)を同時に聞かせ、逆行性に発生した音を拾う検査で、蝸牛機能が正常であれば蝸牛基板振動の増幅において歪(刺激音の周波数の整数倍の和と差の成分)が発生し記録される。この歪成分を DP レベルと言う。この DP レベルが測定周波数 1kHz において 4.3dB 以上、2kHz で 5.0dB 以上、4kHz で 2.9dB 以上であれば各周波数における聴力レベルは 30dB 以下で、正常聴力と推定できるとしている¹⁰。この DP レベルが測定環境下のノイズ成分のレベルを超えている場合に、通常の設定で使用する 30-40dB 程度の軽度感音難聴の鑑別ができる。耳栓を外耳道に挿入し音刺激を与えるだけで一定の周波数・音圧での聴力が測定可能であるため、小児の聴覚スクリーニングや新生児聴覚スクリーニングで日常的に行われている検査である。OAE の検査法として日常臨床では DPOAE が一般的に行われており、本研究でも記録データ数の多かった DPOAE を用いた。

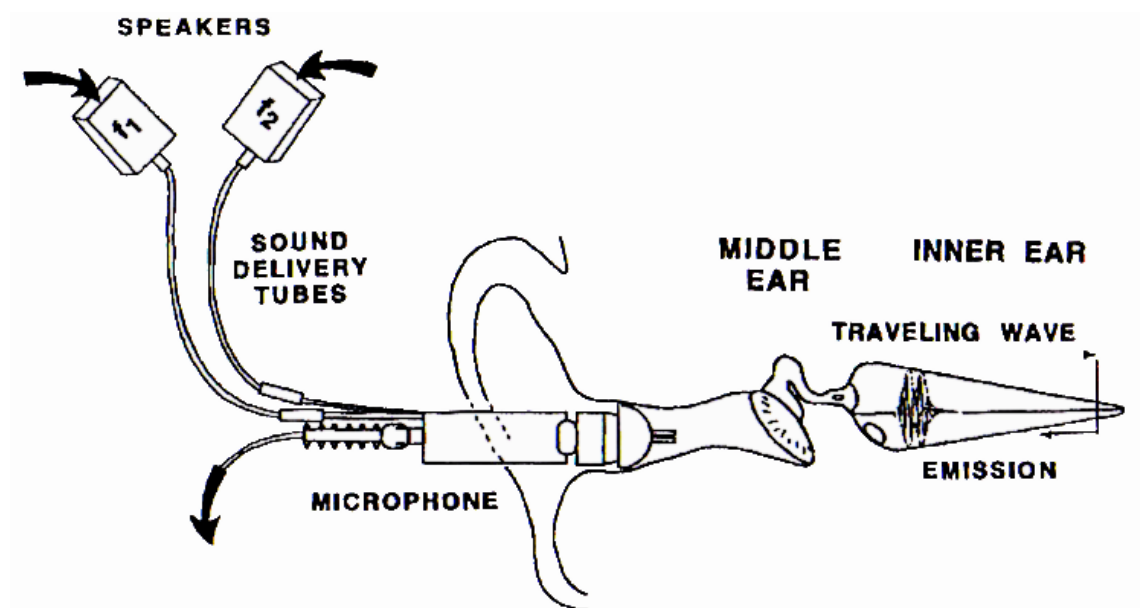


図 3 DPOAE の仕組み (文献 11 より改変して引用)

DPOAE は f_1 、 f_2 の 2 音を同時に聞かせて (左上の→) 発生してきた音を拾う (左下の→) 検査である。



図 4 DPOAE 測定機器の一種 (GSI-70 system®, Rion Co. Ltd., Tokyo, Japan) (文献 12 より改変して引用)

聴性脳幹反応 (Auditory Brain Response; ABR)について

ある一定の音を聞かせ、聴覚経路を通り脳幹から出てくる脳波を解析して、その脳幹反応が出るかで聞こえているかどうかを調べる検査である。生後間もなくでも検査できる。感音難聴の障害部位を明らかにするためにも行なわれる。その他、脳死の判定にも使われている。

音刺激を与えてから 1/100 秒以内に 5～7 個の波形が現れるが、I 波は蝸牛神経、II 波は蝸牛神経核、III 波はオリーブ核、IV 波は外側毛帯、V 波は下丘に対応しているとされている (図 5)¹³。音刺激から I～V 波の現れる時間が遅れたり、波形が出現しないことで聴覚経路のどこに異常があるかを診断する検査である。

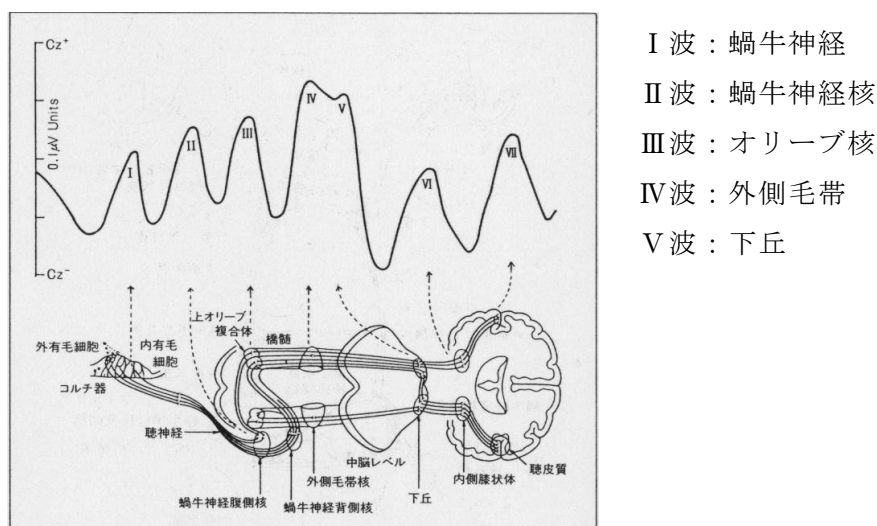


図 5 ABR の反応経路 (文献 14 より改変して引用)

Auditory Neuropathy (AN) について～その障害部位と遺伝子

AN とは、1996 年に初めて報告された OAE 正常、ABR で無反応あるいは高度の閾値上昇を呈する聴覚障害の疾患概念である^{15,16}。一般的な感音難聴と異なり、標準純音聴力検査結果では軽度難聴と診断されるのに言葉の聞き取りが困難であるなど、検査結果と解離した臨床像をとることがあるため、診断・治療していくにあたり病態解明が求められている聴覚障害の一つである。世界での AN の頻度は、先天性感音難聴罹患児の中で 5-10%を占め、出生数あたり約 7 千人に 1 人とされている¹⁷⁻²⁰。厚生労働省人口動態統計による日本人の出生数が 2015 年 100 万 8 千人であったことから計算すると、同率と考えた場合日本人の先天性 AN 症例は年間 50-200 人発生すると考えられる。AN の原因には、遺伝性が 42%、毒性、肥満、免疫や感染などによるものが 10%、残りの 48%が原因不明と言われている²¹。AN には症候性と非症候性がある。身体症状を合併するのが症候性、他の身体症状を伴わないのが非症候性である。非症候群性 AN の原因遺伝子としては *GJB2*、*PJVK*、*OTOF*、*DIAPH3* などが同定されている²²⁻²⁶。日本人においては、先天性または早期発症で臨床症状からは原因がわからず遺伝子検査を行った AN 患者の中で *OTOF* 遺伝子変異が 56.5%(13/23)と最多を占める。症候群性の原因遺伝子としては Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA)(後述)の *OPA1* 遺伝子、Charcot-Marie-Tooth Disease (CMT 病)(後述)の *MPZ* 遺伝子や *NF-L* 遺伝子などが挙げられる²⁸⁻³⁰。

AN の原因は、①蝸牛内有毛細胞のシナプス小胞放出障害によるもの、②シナプス後の蝸牛神経終末の興奮障害によるもの、③蝸牛神経自体の伝導障害によるもの(図 6)に大別される。AN の原因遺伝子としては、*OTOF* 遺伝子が主に①、*OPA1* 遺伝子が②、CMT 病が③の病態を呈することが判明している^{2,4,31}。*CDH23* については機序は確定はしていないものの①により AN を呈すると考えられる。

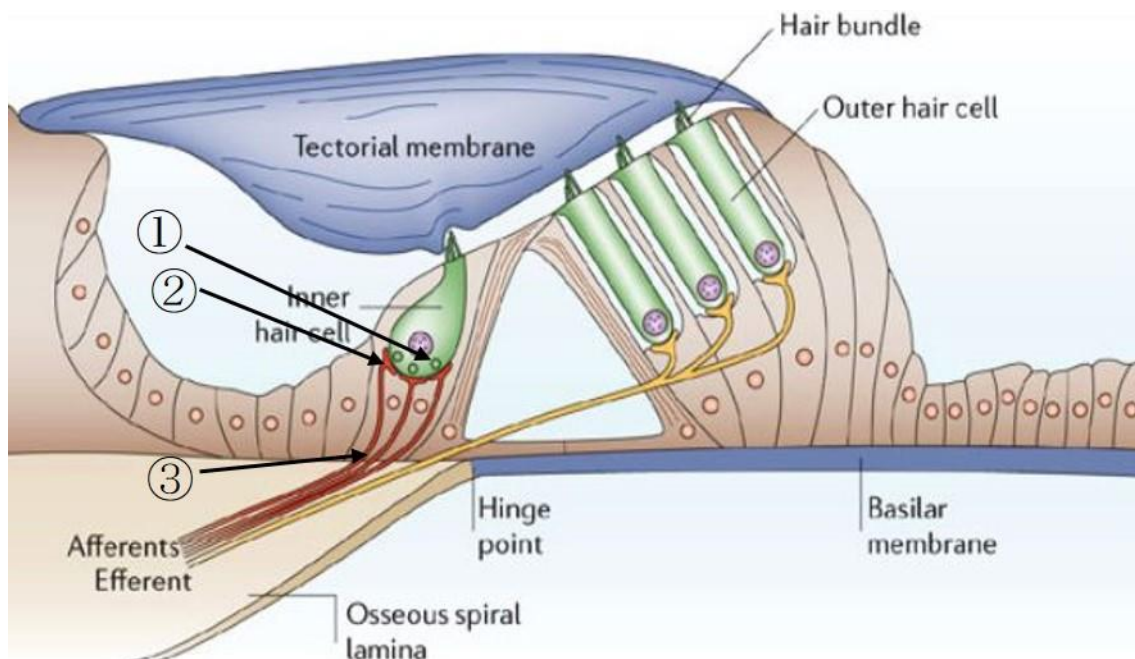


図 6 AN の病態

- ① pre-synaptic : 内有毛細胞のシナプス小胞放出障害
- ② post-synaptic : 神経終末の興奮障害
- ③ post-synaptic : 蝸牛神経の伝導障害

先天性 AN では、高度から重度難聴となる例が多く、補聴器による補聴が困難で、人工内耳が必要となる症例が多い。AN による高度難聴症例の場合、聴覚経路の障害部位が上記のようにそれぞれ一部に限局している。人工内耳はその障害部位より中枢側にある聴神経に強大な信号を伝える仕組みのため、その効果は良好であることが報告されていて、遺伝子診断が人工内耳の適応を決定する際に重要な情報となる可能性を持つ（文献 32 から改変）。

OTOFについて

*OTOF*変異は、常染色体劣性遺伝形式の非症候群性難聴の原因遺伝子である²⁴。*AN*の原因遺伝子として初めて報告された遺伝子である³³。細胞膜蛋白質オトフェリンをコードする遺伝子であり、オトフェリンは、マウスにおいて胎生期は外有毛細胞、内有毛細胞の両方に発現しているが、生後は内有毛細胞のみで発現されてシナプス小胞の放出に働く²。*OTOF*変異では内有毛細胞からの神経伝達物質の放出が阻害されて難聴が生じる。この場合、外有毛細胞の機能は維持されているために *OAE* は正常反応を呈するが、*ABR* では高度難聴となり、結果の解離が認められる *AN* を示すと考えられている³²。日本人においては、*OTOF*変異の中でも p.R1939Q 変異が最も検出頻度が高い²⁷。

Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA), *OPA1*

常染色体優性遺伝形式で視神経萎縮を呈する遺伝性疾患の一つ^{34,35}で、視神経以外にも難聴、失調、末梢神経障害、外眼筋麻痺、痙性対麻痺など多彩な神経症状を合併することがある。原因遺伝子は *OPA1* 変異で、この *OPA1* 遺伝子は、Optic Atrophy Type 1 遺伝子の略称であり、神経変性疾患及び 1 型優性遺伝型視神経萎縮症の原因遺伝子である。常染色体優性遺伝で、その遺伝子産物である *OPA1* 蛋白はミトコンドリア同士の融合を司り³⁶、つまりはミトコンドリアの品質管理に働く遺伝子と言える。この変異により、蝸牛神経障害が原因の *AN* を引き起こし進行性の難聴と前庭障害を出現させる^{4,37}。

Charcot-Marie-Tooth Disease (CMT 病)

下腿と足の筋萎縮と感覚障害を特徴とし、進行すると上肢や手にも障害を生じる、神経原性の筋萎縮症である³⁸。遺伝子異常により、神経が正常に機能するために必要なタンパク質が発現しなくなり、神経の軸索もしくは髄鞘（ミエリン鞘）に異常が生じ、症状が出現すると考えられている。難聴を伴うこともあるが、これは聴神経の萎縮が原因で起こる³¹。つまり外有毛細胞の機能は正常のままであり *OAE* は正常となるが *ABR* は聴神経の障害により異常となることで、*AN* の病態を呈すると考えられる。

② テーマに関連して、何がわかっていて何がわかっていないのか

ANにおいて、診断時正常であったOAEの結果が時間を経ると反応がなくなり一般的な内耳性難聴と同様の検査結果となることが小児例で報告されており^{39, 40}、先天性ANの1/3でOAEが消失しているという報告もある⁴¹。OAEの反応が低下していく理由としては、一部の文献では補聴器装用による音響外傷の影響^{16, 42-44}との説がある。

生後時間が経ってから初回検査を行ってOAEの反応が出なくなっているとANではなく内耳性難聴と診断される。このようなANに外有毛細胞障害が加わり内耳性難聴となった症例は、聴覚経路における障害部位が2か所以上になるわけで、ANの病態を持たない内耳性難聴の症例とは異なる臨床像を呈すると考えられる。具体的には、標準純音聴力検査が同程度のANのない内耳性難聴症例と比べると語音聴力検査の結果や言語発達、補聴器装用効果などの効果が異なると予想される。つまり、診断の時期を逃すとANの診断自体ができなくなり、実際の聴力と解離した言葉の聞き取りの悪さについての適切な精査・治療が進めにくくなる可能性がある。また、今まで感音難聴と診断されていた症例の中にもANが隠れている可能性が十分考えられ、ANと診断するためにはそれらを見つけ出す方法や診断時期などについて研究を行い病態解明していくことが重要であると考えられるが、その発生頻度の低さから、AN患者においてOAEが異常となる頻度やOAEの経過について報告された報告は今までなかった。

今回我々が研究を行った東京医療センター臨床研究センターでは、遺伝性難聴の研究を積極的に行っており、研究室内で一部の遺伝子の検査を直接行うことも可能な設備が整っている。他施設から当施設へ血液検体を送ってもらうことで現在全国的に施行されている遺伝性難聴の保険診療範囲内での検査のみならず研究目的にその他の難聴遺伝子の検索も可能であることから、全国の多施設から感音難聴の遺伝子診断依頼で症例（遠方の場合はその検体）が送られてくる施設である。他施設と共同研究という形をとり症例を集められることから、先天性難聴症例の遺伝子診断、そこから得られたデータを用いた研究が盛んであり、有病率の低いANに関しても、Starrと同年にANの症例報告を行った加我君孝医師（同施設名誉センター長、東京大学名誉教授）が現在も外来診療にあたっていることから全国から多くのANの症例が集まっており、当施設で遺伝子解析を行ったANの臨床研究を行うことでANの病態解明を進めたいと考えた。

③ この研究では何を明らかにしようとするのか

今回我々は、遺伝子解析を行った AN40 症例強の DPOAE がどのような経過をたどるかについて原因別に検討した。今までの AN の報告は多くとも 20 例弱^{45,46}で、40 症例以上の多数例を検討した報告は類を見ず、意義のある新
知 見 を 得 ら れ る と 考 え ら れ た 。

【略語表】

ABR Auditory brainstem response

ADOA Autosomal Dominant Optic Atrophy

AN Auditory Neuropathy

CMT 病 Charcot-Marie-Tooth disease

DPOAE Distortion Product Otoacoustic Emission

OAE Otoacoustic Emission

【対象】

本研究は東京医療センター及び他の共同研究施設の倫理委員会の承認を得て、検討の前に各対象者（小児の場合はその両親）十分なインフォームド・コンセントを得て行われた。対象は、OAE が正常だが同時期に測定した ABR にて重度難聴または無反応で AN と診断され、AN の原因として遺伝性が疑われる、または症状などからは他に明らかな原因を認めず、遺伝子検査が実施された約 40 症例である。今回の症例には症候群性難聴（全て ADOA）も含まれている。AN 診断時が 10 歳未満の例を小児 AN 群、18 歳以上のものを成人 AN 群と分類した。

【方法】

遺伝子解析

遺伝子解析は東京医療センター感覚器センター聴覚平衡覚研究部で行われた。末梢血から抽出された DNA を用いて全例 GJB2 遺伝子、A1555G および A3243G ミトコンドリア DNA 変異、OTOF 遺伝子を調べた。これらの変異がなかった症例で 2kHz、4kHz の閾値が 250Hz、500Hz の閾値を上回る高音障害型の難聴を呈した症例には CDH23 遺伝子、視神経障害を呈した症例には OPA1 遺伝子の解析を追加で行った。GJB2、OTOF、CDH23、OPA1 遺伝子はサンガー法、A1555G および A3243G ミトコンドリア DNA 変異は RFLP-PCR 法で行い、方法の詳細は過去の論文を踏襲した^{23, 47-51}。

常染色体劣性遺伝の 2 アレル変異症例、常染色体優性遺伝である OPA1 遺伝子のヘテロ変異など原因が明らかなものは原因確定群、変異を認めないか常染色体劣性遺伝子の 1 アレル変異のみを呈した症例を原因未確定群と定義し分類した。それぞれの変異の見られた対立遺伝子の由来を確認するために、可能な限り両親の家系解析も行った。

臨床所見：以下の検査結果を診療録(カルテ)から後ろ向きに集計した。

画像検査：MRI,CT にて、蝸牛神経の異常、内耳奇形や聴神経腫瘍などを除外した。

ABR：今回は、一般耳鼻咽喉科臨床で汎用されている方法として、V 波がそれぞれの刺激音圧で出現するか否かで聴力測定を行った。高度または重度難聴を呈していた患者のみを対象として採用した。

OAE：本研究では、OAE の中でも、本研究参加施設において最も多くの施設で行われていた DPOAE の測定結果を用いた。今回の結果である OAE の経時的変化をわかりやすく表すために、本研究では測定した機器のそれぞれ

の測定周波数に対し、ノイズレベルより DP レベルが上回っている場合を「反応あり」とし、各耳において「反応あり」の測定部位が全体の測定部位数に占める割合を「反応率」として算出した。例えば、3 周波数のみ測定する機種においては、2kHz が反応あり、3kHz と 4kHz が反応なしの場合は、反応率 33%と計算した（図 7）。この反応率をグラフ化し、経過中に反応率が 100%のまま経過したものを不変、反応率が 1-99%まで低下したものを低下、反応率が 0%になったものを消失、と定義した。

統計学的解析については、GraphPad Prism 5®（MDF 社、東京）を用いて行い、評価としては、Unpaired t test を用い、 $p < 0.01$ を有意差ありとして判定した。

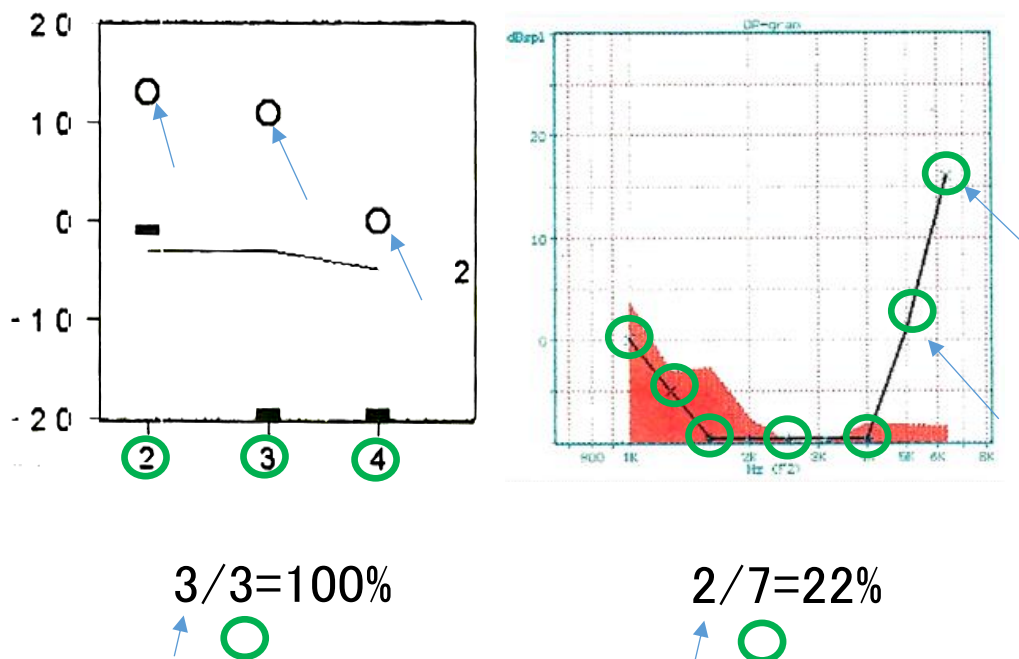


図 7 DPOAE 反応率の計算方法

「反応あり」測定点の数↑ / 全体の測定点の数○ = 反応率

【結果】

遺伝子解析結果

遺伝子解析で原因確定した症例が約半数、原因未確定が残りの約半数であった。*OTOF* biallelic mutations が最多、次いで今回の遺伝子検査では変異が検出されなかった遺伝子変異未検出であった。*CDH23* biallelic mutations、*GJB2* biallelic mutations、*OPA1* monoallelic mutation も検出された。成人 Auditory Neuropathy 群の原因として確定していたものは *OPA1* heterozygous mutations が最多、次いで *OTOF* biallelic mutations であり、原因未確定、遺伝子変異未検出も認めた。

DPOAE の経過

小児で DPOAE を 2 回以上測定した耳について DPOAE の経過を検討した。測定を 2 回以上行った症例において、経過中に OAE が低下したものが最多で、次いで OAE が消失したもの、不変だったものと続いた。これらを合わせると、悪化（低下または消失）したものが多数を占めた。反応消失例の年齢は、出生から 1 歳までに DPOAE が消失しなかった例は認めなかったが、1-2 歳で消失したものが今回の結果の中では最多で、その後の年齢でも 8 歳までの間に反応が消失した例を確認できた。

成人群全体で 2 回以上測定した DPOAE の経過を検討した。一部で DPOAE は不変であり、その他の大部分で DPOAE の反応は低下していた。わずかに DPOAE の消失も見られた。多くの成人 AN 症例において DPOAE の低下を認めたにもかかわらず、大部分は、反応率が 66%を超えていた。

原因遺伝子ごとの DPOAE の経過の比較

小児群原因遺伝子別の解析結果で症例数の多かった *OTOF* biallelic mutation 群と、遺伝子変異未検出群とで DPOAE の経過を比較した。小児 *OTOF* biallelic mutation 群では、2 回以上計測した約 20 耳のうち、反応低下が約半数、反応消失が一部を占め、この反応低下、消失したものを合わせると大部分が経過中に DPOAE の反応率が悪化したが、一部では経過中に低下しなかった。遺伝子変異未検出群では、反応が低下したものが多く、一部は反応消失し、これらを合わせると反応が低下または消失したものがほとんどを占めた。

この 2 群において、DPOAE が消失した症例における DPOAE が消失した時点の年齢を比較すると、*OTOF* 原因群の DPOAE 消失時の平均年齢に対して遺伝子変異未検出群の DPOAE 消失時の平均年齢は高く、DPOAE は *OTOF* 原因群において早期に消失していた。

そのほか、原因が確定された *GJB2* 変異例は半数が 2 歳時点で消失、残りが反応低下、*CDH23* はいずれも反応低下、*OPA1* 小児群はいずれも不変であった。原因未確定であった *OTOF* heterozygous mutations 群では多くが反応低下していた。

成人群では原因遺伝子解析結果別では明らかな傾向は判明しなかった。原因が判明した症例では *OPA1* が最多であったが、すべてで DPOAE は不変か反応率が 81%を超えているわずかな DPOAE の低下のみだった。成人の遺伝子変異未検出群で、一部では DPOAE の消失を認めたが、その他は不変、低下とばらつきがあった。*OTOF* biallelic mutations の一部で DPOAE は不変、残りは軽度の低下を呈した。

補聴器装用と OAE の変化

補聴器装用と OAE の関係を知るために *OTOF* biallelic mutation 群と遺伝子変異未検出群について、補聴器装用前後での OAE の経過を比較した。*OTOF* biallelic mutation 群の中で補聴器装用開始後に OAE の反応が低下したものが大部分を占め、補聴器装用開始後も OAE が不変だったのは一部であった。

遺伝子変異未検出群では、2 回以上 DPOAE を計測した測定期間中に補聴器装用開始となっていた症例で補聴器装用前に DPOAE の反応が低下したものが一部あったが、大部分は補聴器装用中に DPOAE の反応が低下した。

【考察】

AN の診断について

今回検討した AN 症例では経時的変化で DPOAE の反応が低下していく症例が小児例・成人例ともに多数存在し、小児例において反応が消失する症例が一部あることが判明した。DPOAE 消失の時間的経過から考えると先天性 AN 患児は 2 歳時点から一部で AN に外有毛細胞障害が加わった病態となる可能性が明らかになった。これらの症例はその時点の聴覚検査のみでは内耳性難聴と診断されるが、元来の AN の病態(蝸牛神経や内有毛細胞の障害)も併せて持つため同レベルの純音聴力検査の結果を示す内耳障害のみの難聴症例と比べると語音聴力検査の結果や、言語発達、補聴器装用効果が悪いと予想される。逆にこのような臨床的特徴を呈する小児難聴症例では、DPOAE が異常であっても AN に外有毛細胞障害が加わった病態である可能性を疑うべきである。このような症例を鑑別する方法の一つとしては *OTOF* など AN の原因遺伝子を解析する検査などがある。

成人群の DPOAE の経過

成人群においては、DPOAE が軽度低下するという傾向があった。成人群の DPOAE は、診断時点で高齢の症例も多いことから、発症後かなり長期間、正常聴力が維持されていると考えられるが、経過中、反応が低下する症例もあるとの報告もある^{57,58}。今回の評価方法においては軽度な反応低下は見られたものの、重度の反応低下を呈する症例は一部であるとわかった。これには、成人群の原因の最多を占めた *OPA1* 変異の病態が関係しており、小児との病態の違いが反映されていると考えられた。*OPA1* の病態は神経病変であり、外有毛細胞の機能を反映する DPOAE と直接関係が少ないため、*OPA1* 症例では DPOAE の軽度な低下しか認めなかったと考えられた。

原因遺伝子別 DPOAE の経過

小児例において 2 歳までに DPOAE 反応の完全消失となるものが *OTOF* biallelic 群の一部に認められた。原因不明群には 2 歳までの完全消失がなかった。このため *OTOF* biallelic 群のほうが遺伝子変異未検出群より早期に反応消失の傾向があると考えられ、*OTOF* 遺伝子が DPOAE 早期完全消失と関係していると考えられた。しかし、*OTOF* biallelic 群でも反応率が低下しない症例も認めたため、DPOAE の経過には他の要因も関係していることが推定された。*OTOF* 変異で DPOAE の経過が早期に低下しやすい理由としては、胎生期に外有毛細胞でオトフェリンが発現しないと、外有毛細

胞の運動能が障害されやすくなり、生後に騒音などの比較的良好な環境要因に対して脆弱になるという仮説を考える。一方、*OTOF* 変異以外にも DPOAE の脆弱性に関係する遺伝的体質があるため、そのタイプによって DPOAE が早期低下する例としない例に分かれる可能性がある。これらの検証には AN のモデルマウスである *OTOF* 変異マウスなどにおける音響負荷などの動物実験、AN 症例における OAE の経過と関連する一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism : SNP) の解析が有効と考えられる。これらの研究では *OTOF* biallelic mutations 群内での OAE 早期消失例と OAE が不変だった症例の比較を行うことができると考える。

DPOAE 低下の原因としては、前述の通り過去の報告^{16, 42-44}では補聴器装用の影響が考えられていた。補聴器装用をしないというコントロール群は小児の言語発達を考えると設定できないことから、補聴器と DPOAE の因果関係は検討できない。今回の症例でも対照がないためその因果関係は不明であったが、補聴器装用前後での OAE の変化を比較した。補聴器装用開始後に OAE の反応が低下している症例は *OTOF* biallelic mutations 群、遺伝子変異未検出群の大部分であったものの、補聴器装用開始前から OAE が低下しているものや、補聴器装用後数年たっても OAE が不変のものなどがあり、過去の報告と異なる結果であったことから、DPOAE は補聴器装用と関係なく低下する可能性が考えられた。補聴器装用と DPOAE の低下の関係性を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

【総括】

- ・ANの小児例、成人例ともに大部分で経過中にDPOAEの反応が低下または消失していた。
 - ・小児群において、2歳までに一部の症例が反応消失していた。
- ・小児例において、*OTOF* biallelic mutations 群は遺伝子変異未検出群より早期に反応消失する傾向があると考えられた。*OTOF* biallelic mutations 群にもDPOAEの反応が保たれるままの症例も存在したことから、DPOAEが反応低下または消失する現象のメカニズムとして、ANの原因遺伝子だけではなくそれに加えて遺伝的背景など他の要因を伴う可能性が示唆された。
 - ・補聴器の装用はDPOAEの低下の明らかな要因とは言えなかった。
- ・成人症例のほとんどにおいては、遺伝的原因にかかわらず、DPOAEは軽度の低下を呈した。

【結論】

今回の研究の結果、難聴の一つの疾患概念であるANの病態解明にとって、DPOAEが低下や消失する頻度が高率であること、2歳以前にDPOAEが消失してしまい一般的な内耳性感音難聴と同じ検査結果になってしまう症例があることがわかった。また、原因別検討において*OTOF* 遺伝子変異がDPOAE早期消失に進む何らかの原因を有しているのではないかと、ただそれだけではなく他要因との関連も疑われると考えられた。以上の有用な新知見を得ることができた。

【今後の展望】

この結果をもとに、臨床データから得られた仮説を基礎実験で証明するべく、*OTOF* biallelic mutations 患者の、難聴の原因ではない部分の塩基配列を解析し臨床経過との共通点を見つけること、加齢性難聴の原因となる変異を持つマウスと持たないマウスをベースにそれぞれ*OTOF*ノックアウトマウスを作製し、対象マウスと比較しながらDPOAEを継時的に測定することで、原因別のDPOAEの経過を基礎実験で証明したり、原因遺伝子以外の要因などがDPOAEの経過に与える影響などを解明するという研究が展開されうると考えられた。これらの新実験などから、さらにANの病態解明に役立たせていくことができると考えている。今後の課題としては、今回が後ろ向き研究であったことから、前向き研究として出生時から同時期に同間隔でDPOAEの経過を追う大規模臨床試験の実施なども望まれる。

謝辞

このような機会を与えてくださった北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野 福田諭教授、独立行政法人東京医療センター臨床研究センター聴覚平衡覚研究部部長 松永達雄先生、元独立行政法人東京医療センター臨床研究センター聴覚平衡覚研究部部長（現、永寿総合病院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍センターセンター長） 藤井正人先生、防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座専任講師 水足邦雄先生に厚く御礼を申し上げます。学ばせていただいたさまざまなことを、今後活かしていきたいと思います。

また、同臨床研究センター聴覚平衡覚研究部の皆様にも大変お世話になりました。特に、中川進研究員、務台英樹研究員、難波一徳研究員には、実験に関するさまざまなことを丁寧にご指導いただき、感謝申し上げます。

北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科分野の大学院卒業生、教員の諸先輩の先生方にはさまざまなことにおいて教えて頂き感謝申し上げます。特に准教授 本間明宏先生、助教 水町貴諭先生には学位論文作成にあたり多大なるサポートをいただき厚く御礼を申し上げます。

さらに、耳鼻咽喉科・頭頸部外科の医局員からも多大なるサポートを頂きました。

実験結果についての議論、国内での発表の場を与えて頂いたことを感謝しております。

2016 年 11 月

北尾 恭子

引用文献

1. Morton, C. C. , & Nance, W. E. Newborn hearing screening – a silent revolution. *N. Engl. J. Med.* 354, 2151-2164 (2006).
2. Roux, I. , Safieddine, S. , Nouvian, R. , Grati, M. , Simmler, M. C. , Bahloul, A. , Perfettini, I. , Le, Gall, M. , Rostaing, P. , Hamard, G. , Triller, A. , Avan, P. , Moser, T. , & Petit, C. Otoferlin, Defective in a Human Deafness Form, Is Essential for Exocytosis at the Auditory Ribbon Synapse. *Cell* 127, 277-289 (2006).
3. Kikuchi, T. , Kimura, R. S. , Paul, D. L. , & Adams, J. C. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anat. Embryol.* 191, 101-118 (1995).
4. Amati-Bonneau, P. , Guichet, A. , Olichon, A. , Chevrollier, A. , Viala, F. , Miot, S. , Ayuso, C. , Odent, S. , Arrouet, C. , Verny, C. , Calmels, M. N. , Simard, G. , Belenguer, P. , Wang, J. , Puel, J. L. , Hamel, C. , Malthiery, Y. , Bonneau, D. , Lenaers, G. , & Reynier, P. OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann. Neurol.* 58, 958-963 (2005).
5. Siemens, J. , Lillo, C. , Dumont R. A. , Reynolds, A. , Williams, D.S. , Gillespie, P. G. , & Müller, U. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 428, 950-955 (2004).
6. 宇佐美 真一. 編. 遺伝子変異と難聴. In, きこえと遺伝子 金原出版, 東京, 2006, 3.
7. Fettiplace, R. , & Hackney, C. M. The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 19-29 (2006).
8. Kemp, D. T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J. Acoust. Soc. Am.* 64, 1386 - 1391 (1978).
9. 原田 竜彦. 聴覚領域の検査 耳音響放射. *JOHNS* 29, 1479-1481 (2013).
10. 千田 英二. 聴力評価法としての歪成分耳音響放射. *耳耳鼻*. 101, 1335-1347 (1998).
11. Lonsbury-Martin, B. L. , Whitehead, M. L. , & Martin, G. K. . Clinical applications of otoacoustic emissions. *J. Speech. Hear. Res.* 34, 964-981 (1991).
12. EAR DIAGNOSTICS INC.
<http://www.eardiagnosics.com.ph/products/audiometric-equipment/>

oae-abr-assr-system/

13. Stockard, J.J. , Stockard, J. E. , & Sharbrough, F. W. Detection and localization of occult lesions with brainstem auditory responses. *Mayo. Clin. Proc.* 52, 761-769 (1977).
14. 聴性脳幹反応 (Auditory Brain-stem Response ; ABR)
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/hos/kensa/nou/ABR.htm>
15. Kaga, K. , Nakamura, M. , Shiogami, M. , Tsuzuku, T. , Yamada, K. , & Shindo, M. Auditory nerve disease of both ears revealed by auditory brainstem responses, electrocochleography and otoacoustic emissions. *Scand. Audiol.* 25, 233-238 (1996).
16. Starr, A., Picton, T.W., Sininger, Y., Hood, L.J., & Berlin, C.I. Auditory neuropathy. *Brain* 119, 741-753 (1996).
17. Zhang, Q.J. , Han, B. , Lan, L. , Zong, L. , Shi, W. , Wang, H. Y. , Xie, L. Y. , Wang, H. , Zhao, C. , Zhang, C. , Yin, Z. F. , Wang, D.Y. , Petit, C. , Guan, J. , & Wang, Q. J. High frequency of OTOF mutations in Chinese infants with congenital auditory neuropathy spectrum disorder. *Clin. Genet.* 90, 238-246 (2016).
18. Sininger, Y. S. Identification of auditory neuropathy in infants and children. In, *Seminars in Hearing.* 23, 193–200 (2002).
19. Rance, G. , & Starr, A. Pathophysiological mechanisms and functional hearing consequences of auditory neuropathy. *Brain* 138, 3141-3158 (2015).
20. Rance, G. , & Starr, A. Auditory neuropathy/dys-synchrony. In, *Seewald R, Tharpe AM, editors. Comprehensive handbook of pediatric audiology.* , Plural Publishing, San Diego, 2011, pp225–242.
21. Starr, A. , Sininger, Y.S. , & Pratt, H. The varieties of auditory neuropathy. *J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.* 11, 215-230 (2000).
22. Chang, M.Y. , Kim, A. R. , Kim, N. K. , Lee, C. , Park, W. Y. , & Choi, B.Y. Refinement of molecular diagnostic protocol of auditory neuropathy spectrum disorder. *Medicine* 94, 1-9 (2015).
23. Cheng, X. , Li, L. , Brashears, S. , Morlet, T. , Berlin, C. , Hood, L. , & Keats, B. Connexin 26 variants and auditory neuropathy/dys-synchrony among children in schools for the deaf. *Am. J. Med. Genet. A.* 139, 13-18 (2005).
24. Yasunaga, S. , Grati, M. , Cohen-Salmon, M. , El-Amraoui, A. ,

- Mustapha, M. , Salem, N. , El-Zir, E. , Loiselet, J. , & Petit, C. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat. Genet.* 21, 363-369 (1999).
25. Delmaghani, S. , del Castillo, F. J. , Michel, V. , Leibovici, M. , Aghaie, A. , Ron, U. , Van, Laer. L. , Ben-Tal, N. , Van, Camp. G. , Weil, D. , Langa, F. , Lathrop, M. , Avan, P. , & Petit, C. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat. Genet.* 38, 770-778 (2006).
26. Shoen, C. J. , Emery, S. B. , Thorne, M. C. , Ammana, H. R. , Sliwerska, E. , Arnett, J. , Hortsch, M. , Hannan, F. , Burmeister, M. , & Lesperance, M. M. Increased activity of Diaphanous homolog 3 (DIAPH3)/ diaphanous causes hearing defects in humans with auditory neuropathy and in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 13396-13401 (2010).
27. 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.* 82, 425-432 (2012).
28. Santarelli, R. Information from cochlear potentials and genetic mutations helps localize the lesion site in auditory neuropathy. *Genome Med.* 2, 91 (2010).
29. Starr, A. , Michalewski, H. J. , Zeng, F. G. , Fujikawa-Brooks, S. , Linthicum, F. , Kim, C. S. , Winnier, D. , & Keats, B. Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene(Tyr145→Ser) .*Brain* 126, 1604-1619 (2003).
30. Butinar, D. , Starr, A. , Zidar, J. , Koutsou, P. , & Christodoulou, K. Auditory nerve is affected in one of two different point mutations of the neurofilament light gene. *Clin. Neurophysiol.* 119, 367-375 (2008).
31. Pauli, R. M. Sensorineural deafness and peripheral neuropathy. *Clin. Genet.* 26, 383-384 (1984).

32. 宇佐美 真一. 編. *OTOF*遺伝子. In, きこえと遺伝子 改訂第2版 金原出版, 東京, 2015, 7.
33. Varga, R. , Kelley, P. M. , Keats, B. J. , Starr, A. , Leal, S. M. , Cohn, E. , & Kimberling, W. J. Non-syndromic recessive auditory neuropathy is the result of mutations in the otoferlin (OTOF) gene. *J. Med. Genet.* 40, 45-50 (2003).
34. Alexander, C. , Votruba, M. , Pesch, U. E. , Thiselton, D. L. , Mayer, S. , Moore, A. , Rodriguez, M. , Kellner, U. , Leo-Kottler, B. , Auburger, G. , Bhattacharya, S. S. , & Wissinger, B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211-215 (2000).
35. Delettre, C. , Lenaers, G. , Griffoin, J. M. , Gigarel, N. , Lorenzo, C. , Belenguer, P. , Pelloquin, L. , Grosgeorge, J. , Turc-Carel, C. , Perret, E. , Astarie-Dequeker, C. , Lasquelléc, L. , Arnaud, B. , Ducommun, B. , Kaplan, J. , & Hamel, C. P. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 207-210 (2000).
36. Olichon, A. , Emorine, L. J. , Descoins, E. , Pelloquin, L. , Brichese, L. , Gas, N. , Guillou, E. , Delettre, C. , Valette, A. , Hamel, C. P. , Ducommun, B. , Lenaers, G. , & Belenguer, P. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS. Lett.* 523,171-176 (2002).
37. Mizutari, K. , Matsunaga, T. , Inoue, Y. , Kaneko, H. , Yagi, H. , Namba, K. , Shimizu, S. , Kaga, K. , & Ogawa, K. Vestibular dysfunction in a Japanese patient with a mutation in the gene OPA1. *J. Neurol. Sci.* 293, 23-28 (2010).
38. Li, J. Inherited neuropathies. *Semin. Neurol.* 32, 204-14 (2012).
39. Mittal, R., Ramesh, A. V., Panwar, S. S., Nilkanthan, A. , Nair, S. , & Mehra, P. R. Auditory neuropathy spectrum disorder : Its prevalence and audiological characteristics in an Indian tertiary care hospital. *Int. J. Ped. Otor.* 76, 1351-1354 (2012).
40. Deltenre, P. , Mansbach, A. L. , Bozet, C. , Christiaens, F. , Barthelemy, P. , Paulissen, D. , & Renglet, T. Auditory Neuropathy with Preserved Cochlear Microphonics and Secondary Loss of

- Otoacoustic Emissions. *Audiology* 38, 187-195 (1999).
41. Starr A. The neurology of auditory neuropathy. In: *Auditory neuropathy: a new perspective on hearing disorders* (Sininger, Y. , Starr, A. , eds.), Singular, San Diego, 2001, pp37 - 49.
 42. Shininger, Y., & Oba, S. Patients with auditory neuropathy : Who are they and what can they hear? In *Auditory Neuropathy: A New Perspective on Hearing Disorders* (Sininger, Y. , Starr, A. , eds.). Singular Thomson Learning, Albany, NY, 2001, pp. 15–35.
 43. Rouillon, I. , Marcolla, A. , Roux, I. , Marlin, S. , Feldmann, D. , Couderc, R. , Jonard, L. , Petit, C. , Denoyelle, F. , Garabédian, E. N. , & Loundon, N. Results of cochlear implantation in two children with mutations in the OTOF gene. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 70, 689-696 (2006).
 44. Mason, J. C. , De, Michele, A. , Stevens, C. , Ruth, R. A. , & Hashisaki, G. T. Cochlear Implantation in Patients With Auditory Neuropathy of Varied Etiologies. *Laryngoscope* 113, 45-49 (2003).
 45. Vignesh, S. S. , Jaya, V. , & Muraleedharan, A. Prevalence and Audiological Characteristics of Auditory Neuropathy Spectrum Disorder in Pediatric Population: A Retrospective Study. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 68, 196-201 (2016).
 46. Kim, S.H. , Choi, H. S. , Han, Y. E. , & Choi, B. Y. Diverse etiologies manifesting auditory neuropathy characteristics from infants with profound hearing loss and clinical implications. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 86, 63-67 (2016).
 47. Matsunaga, T. , Hirota, E. , Bito, S. , Niimi, S. , & Usami, S. Clinical course of hearing and language development in GJB2 and non-GJB2 deafness following habilitation with hearing aids. *Audiol. Neurotol.* 11, 59-68 (2006).
 48. Usami, S. , Abe, S. , Akita, J. , Namba, A. , Shinkawa, H. , Ishii, M. , Iwasaki, S. , Hoshino, T. , Ito, J. , Doi, K. , Kubo, T. , Nakagawa, T. , Komiyama, S. , Tono, T. , & Komune, S. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J. Med. Genet.* 37, 38-40 (2000).
 49. 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.* 8, 172 (2013).
50. Mizutari, K. , Mutai, H. , Namba, K. , Miyanaga, Y. , Nakano, A. , Arimoto, Y. , Masuda, S. , Morimoto, N. , Sakamoto, H. , Kaga, K. , & Matsunaga, T. High prevalence of *CDH23* mutations in patients with congenital high-frequency sporadic or recessively inherited hearing loss. *Orphanet. J. Rare. Dis.* 10, 60 (2015).
 51. Namba, K., Mutai, H., Takiguchi, Y., Yagi, H. , Okuyama, T. , Oba, S. , Yamagishi, R. , Kaneko, H. , Shintani, T. , Kaga, K. , & Matsunaga, T. Molecular impairment mechanisms of novel *OPA1* mutations predicted by molecular modeling in patients with autosomal dominant optic atrophy and auditory neuropathy spectrum disorder. *Otol. Neurotol.* 37, 394-402 (2016).
 52. Wagatsuma, M. , Kitoh, R. , Suzuki, H. , Fukuoka, H. , Takumi, Y. , & Usami, S. Distribution and frequencies of *CDH23* mutations in Japanese patients with non-syndromic hearing loss. *Clin. Genet.* 72, 339-344 (2007).
 53. Abe, S. , Usami, S. , Shinkawa, H. , Kelley, P. M. , & Kimberling, W. J. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J. Med. Genet.* 37, 41-43 (2000).
 54. Fuse, Y. , Doi, K. , Hasegawa, T. , Sugii, A. , Hibino, H. , Kubo, T. Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport* 10, 1853-1857 (1999).
 55. Woo, H. M. , Park, H. J. , Park, M. H. , Kim, B. Y. , Shin, J. W. , Yoo, W. G. , & Koo, S. K. Identification of *CDH23* mutations in Korean families with hearing loss by whole-exome sequencing. *BMC. Med. Genet.* 15, 46 (2014).
 56. Shimizu, S. , Mori, N. , Kishi, M. , Sugata, H. , Tsuda, A. , & Kubota, N. A novel mutation in the *OPA1* gene in a Japanese patient with optic atrophy. *Am. J. Ophthalmol.* 135, 256-257 (2003).
 57. Kaga, K. Auditory nerve disease and auditory neuropathy spectrum disorders. *Auris Nasus Larynx* 43, 10-20 (2015).
 58. Chandan, H. S., & Prabhu, P. Audiological changes over time in

adolescents and young adults with auditory neuropathy spectrum disorder. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 272, 1801-1807 (2015).