

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861543

研究課題名(和文) 突発性難聴と酸化ストレスの関係に関する検討

研究課題名(英文) Relationship of sudden sensorineural hearing loss and oxidative stress.

研究代表者

鬼頭 良輔 (KITOH, RYOSUKE)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：80419358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：突発性難聴は特定疾患(難病)に含まれ、患者のQOLを著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。信州大学医学部耳鼻咽喉科の管理する難治性内耳疾患の遺伝子バンクに集積された突発性難聴患者のサンプル192例(患者群)およびコントロール群を対象に、過去に騒音性難聴や心筋梗塞、動脈硬化との関連が報告されている酸化ストレス関連遺伝子の遺伝子多型(31遺伝子39SNPs)を中心に、患者群とコントロール群とでの遺伝相関解析を行い、酸化ストレス関連遺伝子であるSOD1が突発性難聴の発症に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：To assess the gene association with sudden sensorineural hearing loss (SSNHL), we analyzed the 192 DNA samples from SSNHL patients registered in the intractable inner ear disease gene bank and performed genotyping of the candidate genes, 39 SNPs from 31 genes. As a result SOD1 rs499857 could be associated with susceptibility to SSNHL in the Japanese population.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：突発性難聴 酸化ストレス 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

突発性難聴は特定疾患（難病）に含まれ、患者の QOL を著しく低下させるため疾患の克服が期待されている疾患である。従来から様々なアプローチの研究がされているが、未だに発症メカニズムをはじめ不明な点が多い。現在までに循環障害やウイルス感染など複数の機序が推測されている。

活性酸素種は動脈硬化をはじめとした循環障害、リンパ球の成熟を抑制することによる免疫機能の低下等に関与することが報告されており、直接的な内耳障害のみならず、内耳での循環障害や感染などを介して突発性難聴を引き起こす原因となっている可能性が考えられる。また、近年多くの疾患や老化と活性酸素との関連が多数報告されている。内耳障害に関しても、動物実験において活性酸素による有毛細胞の障害や、騒音・耳毒性薬物による内耳障害への関与が報告されており、また加齢による内耳活性酸素の増加などが報告されている。さらには抗酸化剤の投与がこうした内耳障害に対する保護作用を示すという報告もあり、活性酸素種が内耳障害に関連していることを支持する。

我々は臨床的アプローチとして、突発性難聴と活性酸素種の関連を明らかにする目的で、呈色クロモゲン法を用いて血中の過酸化物を測定した。その結果、1) 突発性難聴症例では治療前の測定にて酸化ストレス度は有意に高く、全身的な高酸化ストレス状態が発症に何らかの影響を及ぼしている可能性が推測された。2) 治療前の酸化ストレス度と治療効果との間には関連性が認められ、治療効果を予測する因子となる可能性が考えられた。3) 治療後の酸化ストレス度については治療前と比較して低下する傾向を認めた。しかし治療効果と治療後の酸化ストレス度の間には有意な関連性は認めなかったことを見出し報告した。

2. 研究の目的

本研究では、原因・病態不明である突発性難聴の発症機序を明らかにすることを目的に、1) 突発性難聴患者 300 名を対象に酸化ストレス関連遺伝子多型を用いた遺伝相関解析を行い、突発性難聴と酸化ストレスの関係について明らかにする。また、2) 突発性難聴患者の臨床像および血中酸化ストレスと突発性難聴の発症について、遺伝子型ごとに検討を行う。特に、血中酸化ストレス度に関しては、治療効果との相関が認められていることより、バイオマーカーとしての有用性についても検討を行う。候補遺伝子関連解析および血中酸化ストレス度測定のアプローチを組み合わせ、突発性難聴と酸化ストレスの関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

信州大学医学部耳鼻咽喉科の管理する難治性内耳疾患の遺伝子バンクに集積された突発性難聴患者のサンプル（患者群）およびコントロール群を対象に、過去に騒音性難聴や心筋梗塞、動脈硬化との関連が報告されている酸化ストレス関連遺伝子の遺伝子多型を中心に、患者群とコントロール群とでの遺伝相関解析を行い、突発性難聴発症と酸化ストレスとの関連について検討をおこなった。また、公開されている日本人コントロールの遺伝子頻度情報（GWAS database や JSNPs database）を利用し、検出力を上げて解析を実施した。

遺伝子型の決定には Applide Biosystems 社の Taq Man Genotyping Assays および Step One Plus 装置を用い、既知の SNP に対するプローブ（TaqMan Probe）を挟む領域を、PCR で増幅する際に、Probe に付着している蛍光部分が切断され発色することを利用して簡便かつ高い精度でタイピング解析を実施した。

4. 研究成果

1) 突発性難聴の発症に関連する遺伝的要因の解明に関する研究

突発性難聴の発症に関与する遺伝的要因を明らかにすることを目的に、難治性聴覚障害遺伝子バンクに集積された 192 例のサンプルを用いて、候補遺伝子関連解析を実施した。候補遺伝子の絞り込みには、HapMap Japan のアリル頻度情報および信州大学で収集した健常コントロールのアリル頻度データを用いた。解析は、酸化ストレス関連遺伝子である、*SOD1*、*SOD2*、*GCLM*、*CYBA*、*PON1*、*MPO*、*CAT*、*GSTP1*、*GSR*、*NOS3* の 10 遺伝子の 13 遺伝子多型に関して検討を行った。

その結果、酸化ストレス関連遺伝子である *SOD1* 遺伝子の多型（rs4998557）に関して、患者群とコントロールの間で有意差を認めた。また、臨床的特徴でさらに細分化を行い、聴力閾値が 60dB 以上と重症度が高い症例に絞ると、さらに有意差が拡大する傾向にあり、重症例の発症に特に *SOD1* 遺伝子が関与する可能性を明らかにした（表 1）。

また、有意差はみとめなかったものの、重症度に関連のある遺伝的因子として、*SOD2*（rs4880）では minor homo、hetero で重症度が高い、*GSR*（rs3779647）では minor homo、hetero で重症度が高い、*GSTP1*（rs1695）では major homo で重症度が高い、*CAT*（rs769217）では major homo で重症度が高い傾向にあることが明らかとなった（いずれもカイ二乗検定における p-value が 0.1 以下）。

2) 突発性難聴の治療効果に関連する遺伝的要因の解明に関する研究

突発性難聴の治療には主として副腎皮質ステロイド、ビタミン B12 製剤、ATP が用い

られる。突発性難聴の治療効果に酸化ストレスがどのように関与するかを明らかにすることを目的に、突発性難聴（新鮮例）を対象に呈色クロモゲン法を用いて、血中の酸化ストレスの量および、抗酸化物質量の定量を実施した。その結果、突発性難聴症例では、治療前の血中酸化ストレス度が有意に高く、全身的な高酸化ストレス状態が発症に関連する可能性がある。治療前の酸化ストレス度と治療効果の間には相関が認められ、治療効果を予測する因子となり得る。治療後の酸化ストレス度は治療前と比較して低下する傾向を認めた。治療後の酸化ストレス度と治療効果の間には相関を認めない。ことを明らかにし、治療前の酸化ストレス状態が治療効果に影響を及ぼす因子であることが明らかとなった。

酸化ストレス度が治療効果に影響を及ぼすことが明らかとなってきたため、治療効果に関与する遺伝的要因を明らかにすることを目的に、難治性聴覚障害遺伝子バンクに集積された192例のサンプルを用いて、候補遺伝子関連解析を実施した。候補遺伝子の絞り込みには、HapMap Japanのアリル頻度情報および信州大学で収集した健常コントロールのアリル頻度データを用いた。解析は、発症に影響を及ぼす因子の検討の際に用いたのと同様に酸化ストレス関連遺伝子である、*SOD1*、*SOD2*、*GCLM*、*CYBA*、*PON1*、*MPO*、*CAT*、*GSTP1*、*GSR*、*NOS3*の10遺伝子の13遺伝子多型に関して検討を行った。

その結果、*GSR* 遺伝子の多型（rs2251780およびrs3779647）、*NOS3* 遺伝子の多型（rs1799983）と治療効果の間に関連性を認めた。

表1 *SOD1* 遺伝子多型と臨床像の関係

Table 6. Genotype distribution and clinical data.

	Genotype	p value					
		Allele frequency		Dominant	Recessive		
rs4998557	GG	GA	AA				
Initial PTA	60 dB >	9	24	10	0.991	0.891	0.903
	60 dB <	25	49	44	0.077	0.008	0.897
Tinnitus	positive	32	69	53	0.113	0.023	0.812
	negative	4	14	3	0.652	0.301	0.771
Vertigo	positive	14	34	20	0.504	0.375	0.833
	negative	20	48	33	0.203	0.097	0.68
rs1041740	CC	CT	TT				
Initial PTA	60 dB >	17	20	6	0.347	0.603	0.359
	60 dB <	67	38	13	0.162	0.951	0.074
Tinnitus	positive	83	52	18	0.307	0.866	0.149
	negative	10	8	3	0.869	0.671	0.957
Vertigo	positive	28	24	7	0.983	0.888	0.951
	negative	54	36	12	0.477	0.884	0.304

3) 突発性難聴の治療効果に関連するステロイドホルモン受容体遺伝子に関する研究

突発性難聴の治療にもっとも高頻度で用いられる薬剤が副腎皮質ステロイドであることより、ステロイドホルモンの受容体関連遺伝子の多型も、突発性難聴の治療効果に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、治療効果に関与するステロイドホルモン受容体遺伝子の影響を明らかにすることを目的に、難治性聴覚障害遺伝子バンクに集積され

た192例のサンプルを用いて、候補遺伝子関連解析を実施した。候補遺伝子の絞り込みには、HapMap Japanのアリル頻度情報および信州大学で収集した健常コントロールのアリル頻度データを用いた。解析は、ステロイドホルモン受容体遺伝子である、*NR3C1*、*NR3C2*、*ESR1*の3遺伝子の3遺伝子多型に関して検討を行った。

その結果、*NR3C1* 遺伝子の多型(rs4912910)のminor homoの症例では、major homoおよびheteroの症例と比較して有意に治療効果が良好であることが明らかとなった。一方、*NR3C2* 遺伝子多型(rs2070951)、*ESR1* 遺伝子多型(rs2234693)に関しては、治療効果との相関を認めなかった。

以上の結果より、突発性難聴の発症とその重症度および治療効果に酸化ストレス度および酸化ストレス関連遺伝子多型が関与することを明らかにすることができた。本研究の成果は論文として取りまとめて報告を行った(Kito et al., Acta Otolaryngol. 2016;136(5):465-9.)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Kitoh R, Nishio SY, Ogawa K, Okamoto M, Kitamura K, Gyo K, Sato H, Nakashima T, Fukuda S, Fukushima K, Hara A, Yamasoba T, Usami S. *SOD1* gene polymorphisms in sudden sensorineural hearing loss. Acta Otolaryngol. 2016;136(5):465-9. 査読有 doi: 10.3109/00016489.2015.1116047.

Kitoh R, Moteki H, Nishio S, Shinden S, Kanzaki S, Iwasaki S, Ogawa K, Usami S. The effects of cochlear implantation in Japanese single-sided deafness patients: five case reports. Acta Otolaryngol. 2016;136(5):460-4. 査読有 doi: 10.3109/00016489.2015.1116046.

西尾信哉、鬼頭良輔、宇佐美真一. 突発性難聴の遺伝的背景. MB ENTONI. 2015;183:58-67. 査読無

鬼頭良輔、森健太郎、宇佐美真一. 突発性難聴に対するステロイド鼓室内投与症例の検討. 耳鼻臨床. 2015;108(4):267-272. 査読有

[学会発表](計 4 件)

鬼頭良輔、西尾信哉、池園哲郎、石川浩太郎、岩崎聡、岡本牧人、小川郁、加我

君孝、熊川孝三、小橋元、坂田英明、佐藤宏昭、佐野肇、曾根三千彦、高橋晴雄、武田英彦、東野哲也、内藤泰、中川尚志、西崎和則、野口佳裕、羽藤直人、原 晃、福田諭、松永達雄、山嵜達也、宇佐美真二。臨床情報調査票を用いた突発性難聴の疫学調査～難治性聴覚障害に関する調査研究班。第 60 回 日本聴覚医学会総会・学術講演会。2015.10.21-23。京王プラザホテル、東京

鬼頭良輔、茂木英明、宇佐美真一、岩崎聡。一側性高度感音難聴に対して人工内耳埋め込み術を施行した 2 症例～術後経過と使用状況の関連性について。第 25 回日本耳科学会。2015.10.7-10。長崎ブリックホール

鬼頭良輔、森健太郎、岩崎聡、宇佐美真一。一側性高度観音難聴に対して人工内耳埋め込み術を施行した 2 症例。第 59 回日本聴覚医学会。海峡メッセ下関。2014.11.27-28

鬼頭良輔、塚田景大、茂木英明、西尾信哉、工 穰、岩崎聡、宇佐美真一。一側性難聴・人工内耳装用患者に関する音源定位検査の検討。第 58 回 日本聴覚医学会・学術講演会。2013.10.24-25。松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 良輔 (KITOH, Ryosuke)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号：80419358

(4) 研究協力者

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号：70467166

宇佐美 真一 (USAMI, Shin-ichi)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：10184996