

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791803

研究課題名(和文) 老人性難聴に関連する Sirt3 遺伝子多型とミトコンドリア遺伝子多型の検索

研究課題名(英文) Analysis of Sirt3 Gene and Mitochondrial Genome in Japanese Patients with Presbycusis

研究代表者

大塚 尚志(Ohtsuka, Hisashi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：80453299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア遺伝子では12SrRNAを含むOXHOS構成領域での13部位の遺伝子が老人性難聴群において統計学的有意であった。またSirt3遺伝子のSNPでは、聴力との重回帰分析により1部位(rs4758633)が聴力障害と関連する可能性が示唆された。

本年度は日本耳科学会ならびに厚労省班研究班報告会での報告を行い、国内での公表を行った。一般的な大学病院受診患者数の減少により、相対的に対象候補者も減少しており、対象の確保に苦渋した。また、震災による、震災に関連した要因からの影響で研究遂行プロセスに影響するものもいまだ多くあり、さらなる今後の研究体制を再構築していかなければならない。

研究成果の概要(英文)：We found statistically significant associations in patients with presbycusis and in individuals with normal hearing. These data suggest that SIRT3 and IDH2 have the potential to be predisposing factors that can lead to presbycusis in the Japanese population.

研究分野：医歯薬学

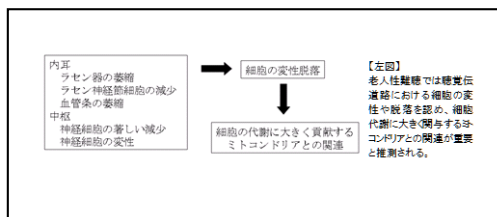
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：老人性難聴 ミトコンドリア Sirt3

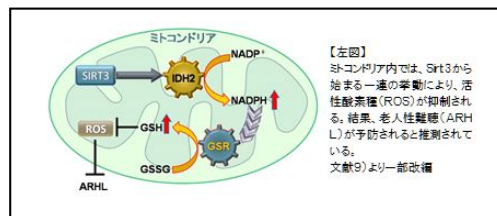
1. 研究開始当初の背景

老人性難聴は、統計学的に先進諸国における高齢者人口の 35%以上が発症しているとされ、我が国においては高齢者人口 2958 万人¹⁰⁾のうち約 **1035 万人が罹患**していると考えられる。老人性難聴は高齢者の社会生活に広く障害を及ぼすことから、超高齢化社会に突入した我が国においては将来的に特に重要な疾患である。

一方、老人性難聴は多様性が大きく、発症時期や聴力障害の程度も様々であり、これはミトコンドリア病に認められる多様性と非常に類似している。一般にミトコンドリアは ATP 合成によりエネルギー代謝に必要不可欠であるが、特に聴覚器すなわち蝸牛組織における有毛細胞や血管条といった組織ではエネルギー消費が激しくミトコンドリア機能の重要性は大きい。



また、ミトコンドリア内に局在し核遺伝子がコードする Sirt3 も同様にミトコンドリアの機能維持や抗老化に重要な役割を持つ。以上から、今回我々は、老人性難聴の病態を解明する 1 つの先駆けとして、ミトコンドリアに焦点を当て、高齢者における Sirt3 ならびに mitDNA 変異と老人性難聴



における聴覚障害との関連を検討することを目的とした。

2. 研究の目的

近年、ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) の変異が病因となる疾患が数多く報告されてきた。糖尿病に感音難聴を随伴する A3243G 変異や、アミノ配糖体への暴露により不可逆的な進行性感音難聴を呈する A1555G 変異など、聴力障害に関連する多くの報告がある¹⁻⁷⁾。しかし現在、老人性難聴と関連が示唆される mtDNA 変異は 961insC のみである⁸⁾。

一般にミトコンドリアは老化に伴い機能低下をきたすことから、アンチエイジング領域でのミトコンドリア説は広く普及している。この説を背景に、2010 年には Sir2 ファミリー (Sirtuin) の Sirt3 がミトコンドリアの機能を高め、モデルマウスでの老人性難聴を予防しうる事が Someya らによって報告された⁹⁾。Sirt3 はミトコンドリアにのみ局在する NAD 依存性脱アセチル化酵素であり、今日の抗老化研究のホットスポットである。

上記の点をふまえ、今回我々は 65 歳以上の高齢者を対象とし、分子生物学的手法を用い Sirt3 遺伝子ならびに mtDNA 遺伝子における塩基多型を中心とした遺伝子変異の検索と臨床耳科学的な視野を含めた比較検討の測定を行うことにより、**ヒトの老人性難聴者に特異的な Sirt3 遺伝子変異ならびに mitDNA 変異を検索・同定し、いまだ明らかでない老人性難聴の病態を把握することを目的とする。**

また、当研究における最終的な目標は、老人性難聴患者に特異的な Sirt3 ならびに mtDNA 変異を見出し、今後広がり続ける遺伝子創薬の開発、さらには加齢に伴う聴力障害に対する確固たる治療の石杖のひとつを築くことである。

文献

1) S. Sawada S, et al. Am. J. Otol.

1997;18:332-335

2) H.C. Lee, et al. J Clin Endocrinol Metab 1997;82:372-374

3) A. Pandya, et al. Am. J. Genet. 1999;65:1803-1806

4) G. Silvestri, et al. NEUROLOGY 2000;54:1693-1696

5) M. Mancuso, et al. Acta Neurol Scand 2004;110:72-74

6) T. Tsuiki, et al. Ann Otol Rhinol Laryngol 1997;106:643-648

7) Kujoth GC., et al. Science 2005;309:481-484

8) Shimamoto K., Ohtsuka H., et al. Iwate Med Assoc 63(5), 263-269, 2011

9) Someya S, et al. Cell. 2010 Nov 24;143(5):802-12.

10) 厚生労働省, 高齢社会白書 (2011). 2011.

11) Ohtsuka, H., et al. Iwate Med Assoc 59, 193-203. 2007.

3. 研究の方法

【研究計画に沿った研究前準備】

本研究遂行においては、岩手医科大学医学部の倫理委員会の承認を得た説明内容ならびに説明文書を用い（申請承認済）耳鼻咽喉科外来を受診された 65 歳以上の個人を対象として行われる。また、対象者の個人情報、プライバシーの厳重な保護が必要不可欠であるため、全ての情報は連結可能匿名化を行ったのち、ネットワーク環境とは隔離されたコンピューター上（起動パスワード付）で情報管理を行う（現在システム構築済）。

平成 24 年度は、STEP1 ならびに STEP2、3 を計画に沿って進めるが、より STEP1 に重点を置いて遂行する。（これまでの経験から、臨床現場での対象確保は平均で一週間に 6 症例であるため、予定対象数確保には少なくとも 15 ヶ月は要すると推測される。）

対象確保と対象情報管理（STEP1）

対象の設定は岩手医科大学耳鼻咽喉科外来を受診した 65 歳以上の老人性難聴を伴う高齢者と伴わない高齢者、それぞれ 192 名、併せて 384 名を対象数とする。

倫理委員会の承認を得た説明内容また説明文書を用いて、当研究がヒト遺伝子研究である旨を十分に理解頂いたうえ、承諾・同意を得られた方のみを対象とする。

インフォームドコンセント内容として、以下の点に承諾頂く。事前に当研究の要旨を十分に理解いただき、氏名、検査結果ならびに

遺伝子情報を含む個人情報には厳重な管理下に置くとともに一切公表をしない旨、また個人情報を除外した情報は統計学的な処理を施行後、個人が特定し得ない形式で当研究の報告として学術誌などで発表する旨、さらに検体に関しては研究の目的以外には使用せず、研究終了と同時に破棄する旨に承諾を頂く。

対象の方には 岩手医科大学耳鼻咽喉科外来および聴力検査室にて聴力検査ならびに上肢末梢静脈より 2cc の採血を施行する。得られた検体は当院内の探索的研究施設内の -81 の冷凍庫にて保管する。また、確保された対象における全ての情報は匿名化の上、ネットワーク環境とは隔離されたコンピューターに保管する。

Sirt3 遺伝子多型解析（STEP2）

Sirt3 遺伝子解析；得られた末梢全血液より、遺伝子を抽出（QIAGEN DNA mini kit®）し、MassARRAY（MassARRAY® Compact Analyzer）を用いて、標的部位の SNP を検出する。なお標的 SNP は HapMap PhaseII を用いて LD、ならびに既存のマウスを用いた報告を考慮して、13SNPs

(rs10081, rs10714, rs1023430, rs3020901, rs3782115, rs3825075, rs3847648, rs4758633, rs11246020, rs12226402, rs12226697, rs17155830, rs74462031) を選択した。なお解析装置は現有設備である（当院共同研究施設内）。

ミトコンドリア遺伝子解析（STEP3）

mtDNA 抽出；得られた末梢全血液より、市販の抽出キット（QIAGEN DNA mini kit®）を用いミトコンドリア遺伝子を抽出する。

PCR；ミトコンドリア遺伝子の全領域を増幅するために、増幅産物長（600bp～980bp）ならびに隣り合う増幅産物同士の重複領域（200bp）を考慮した 24 セットのプライマーを用いた PCR（polymerase chain reaction）法を行う。

シーケンシング；各 24 個の増幅産物をダイレクトシーケンスすることでミトコンドリアフルゲノム配列解析を行う。BDT v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）ならびに Applied Biosystems 3130 Avant Genetic Analyzer にて配列解析を行う。

平成 25 年度は STEP1、STEP2 ならびに STEP3 を継続して行うが、より STEP2、STEP3 に重点を置き、研究を進行させる。

Sirt3 遺伝子、ミトコンドリア遺伝子多型解析（STEP3 続き）

配列アライメント、多型解析；各検体で得られたミトコンドリアのフルゲノム塩基配列情報はマルチプルアライメント解析ソフト ClustalX を用いて配列アライメントを行う。アライメント終了後の配列データを用い SNP の検索ならびに同定を行う。

同定された SNP の出現頻度解析により、臨床耳科学的視点から、健聴高齢者群に比し老人性難聴群に特異的な SNP の同定を行う。

ミトコンドリア遺伝子多型ではアミノ酸置換を伴う非同義置換 SNP(想定数 200 箇所)を基盤としてハプロタイプ解析を行う。聴覚検査像と併せて、聴力障害に関連する可能性のあるハプロタイプの同定を行う。

Sirt3、ミトコンドリア遺伝子での SNP と聴力障害との関連を多重ロジスティック回帰ならびに重回帰分析を用いて解析 (SPSS ver13.0) し、臨床耳科学的ならびに分子生物学的視点から病態解明に迫る。

以上、STEP1、STEP2、STEP3 の研究遂行に必要な設備は当院の耳鼻咽喉科外来、遺伝子解析室(共同研究施設) 探索的研究施設 (P2、P3 完備) の現有施設で対応可能である。

STEP1、STEP2、STEP3 を平成 25 年度中に終了し、国内外での口演・論文発表をおこなう。さらに、報道機関を通して社会へ報告を行い、今後のさらなる研究進展を請う。

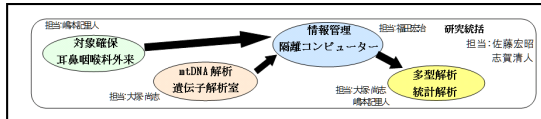
【研究体制】

本研究計画を遂行するための研究体制を以下に記した。

本研究課題では情報管理の点から 1 名の医員(嶋本記里人)が STEP1 を行う。この際、検体情報の匿名化も同時に行う。

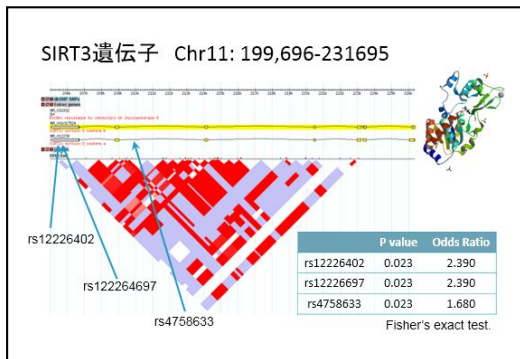
全ての情報管理は担当者(福田宏治)が厳重に管理し、情報漏洩の無いよう体制をとる。

STEP3 では担当(大塚尚志・嶋本記里人)が解析を行う。



4. 研究成果

結果、ミトコンドリア遺伝子では 12SrRNA を含む OXHOS 構成領域での 13 部位の遺伝子が老人性難聴群において統計学的有意であった。また Sirt3 遺伝子の SNP では、聴力との重回帰分析により 1 部位 (rs4758633) が聴力障害と関連する可能性が示唆された。



本年度は日本耳科学会ならびに厚労省班研究班報告会での報告を行い、国内での公表を行った。一般的な大学病院受診患者数の減少により、相対的に対象候補者も減少しており、

対象の確保に苦渋した。また、震災による、

Table 7. Results of multivariate linear regression analysis.

Explanatory variable (Frequency)	Independent variable	B	SE	P value
125Hz	961insC	0.231	4.968	0.002
	A3434G	0.205	8.440	0.005
	Age (year)	0.355	0.188	<0.001
250Hz	961insC	0.260	5.349	<0.001
	A3434G	0.223	9.088	0.003
	Age (year)	0.306	0.202	<0.001
500Hz	G676A	0.188	9.493	0.009
	961insC	0.294	5.671	<0.001
	A3434G	0.171	9.502	0.018
	Age (year)	0.281	0.211	<0.001
1000Hz	961insC	0.284	5.765	<0.001
	A3434G	0.161	9.790	0.024
	rs4758633 (wild type)	0.167	2.713	0.018
	Age (year)	0.365	0.218	<0.001
	Age (year)	0.403	0.221	<0.001
2000Hz	961insC	0.221	5.833	0.002
	A3434G	0.146	9.900	0.037
	C8684T	-0.159	9.796	0.022
	rs4758633 (wild type)	0.174	2.744	0.012
	Age (year)	0.462	0.236	<0.001
4000Hz	961insC	0.163	6.238	0.018
	A3434G	0.184	10.593	0.008
	rs4758633 (wild type)	0.221	2.935	0.001
	Age (year)	0.462	0.236	<0.001
8000Hz	rs4758633 (wild type)	0.208	3.473	0.005
	Age (year)	0.399	0.278	<0.001

震災に関連した要因からの影響で研究遂行プロセスに影響するものもいまだ多くあり、さらなる今後の研究体制を再構築していかなければならない。

Table 6. Results of multiple logistic regression analysis.

Variable	Beta coefficient	Odds ratio	95% CI	P value
Age	0.141	2.388	1.079-1.228	<0.001
rs4758633 (Sirt3)	0.870	1.079	1.160-4.917	0.018

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 尚志 (Ohtsuka Hisashi)
岩手医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
研究者番号：80453299

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：