シンポジウム「めまいの発症機序を考える」

メニエール病の発症機序

—遺伝的素因—

土井 勝美

Genetics of Meniere's Disease

Katsumi Doi

Department of Otolaryngology, Osaka University Graduate School of Medicine

The genetics of Meniere's disease (MD), including the *KCNE* genes, *COCH* gene, and *HLA* genes, was reviewed and discussed. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *KCNE* genes might determine the susceptibility to MD. Variations in the *HLA* genes may also be related to the development of MD. To identify more genes that might possibly be closely related to the development of MD, gene profiling of human endolymphatic sac (ES) harvested from MD patients and vestibular schwannoma (VN) patients was performed using a DNA micro-array technique. Many up- and downregulated genes in the ES harvested from the MD patients were identified. The genes were classified into several subgroups according to their physiological functions. Some potassium channel genes, including Kir 4.1, and several stress-related genes were significantly downregulated in the ES harvested from the MD patients. In future, genetic studies of MD will make it possible to determine more genes whose mutations/variations could lead to the development of MD, which would make possible the invention of a DNA-Chip for the diagnosis of MD. Such a DNA-Chip might be applied clinically to prevent MD, predict individual patients' prognosis and apply the most suitable treatment for individual patients.

はじめに

メニエール病の本態である内リンパ水腫は、蝸牛血管条・半規管膨大部暗細胞における内リンパ液の産生と内リンパ嚢における内リンパ液の吸収の不均衡により生じると推察されているが、その形成機構は現在も十分には解明されていない。これまで我々は、血管条および内リンパ嚢に発現するカリウムチャネル *KCNE* 遺伝子に焦点をしばり、メニエール病確実例において同遺伝子の SNP 解析を行ってきた。その結果、*KCNE 1* および

KCNE 3 遺伝子上の SNP のパターンは、メニエール病の発症すなわち内リンパ水腫の形成に大きな影響を与えることを確認した¹⁾。*KCNE* 遺伝子上のバリエーションは、メニエール病発症の決定因子ではないが、その危険因子となる可能性が示唆されたのである (図 1)。

多因子疾患であるメニエール病の発症には、*KCNE* 遺伝子上のバリエーション以外にも多くの遺伝的な素因と、ストレス・食事・生活パターン等のさまざまな環境因子が複雑に絡み合っているものと推察される²⁾。欧米ではメニエール病症例の約10%は常染色体性優性もしくは劣性の家族

図1 メニエール病の遺伝的素因に関する研究
 メニエール病内リンパ水腫の形成に関連する遺伝的素因（決定因子・危険因子）の解析

性発症を呈することから³⁾、以前より *COCH* 遺伝子、*HLA* 遺伝子等に焦点を絞り、メニエール病発症の決定因子を同定するための遺伝子解析が進められてきた^{4)~7)} (図1)。メニエール病の遺伝的素因をさらに詳細に検討するためには、膨大な数の遺伝子の中から内リンパ水腫の形成に深く関与する可能性が高い遺伝子群を抽出し、今後もそれらの遺伝子群における変異およびバリエーションの有無を慎重に解析していく必要がある。

本稿では、メニエール病の遺伝的素因に関するこれまでの研究について概説するとともに、メニエール病発症に関連する遺伝子群をヒト内リンパ囊から抽出するため当教室で行っているDNAマイクロアレイ解析についても紹介する。

1. *KCNE* 遺伝子

遺伝的バリエーションの一つとして遺伝子上の一塩基変異 (single nucleotide polymorphism; SNP) が知られている。遺伝子上の数100から1000塩基に一つの割合でSNPは存在し、全ゲノム中では300~1000万という膨大な数になる。現在、国内外でSNPのデータ収集・解析は驚くべき速度で進行しており、複数のWebsite上にデータベースが公開されている。いくつかの疾患でのSNP解析の結果、SNPは、①疾患の発症に影響する危険因子、②疾患の臨床症状を規定する因子、③薬剤の効き目や副作用の強弱を決定する因子であることが明らかにされてきた。

さて、内リンパ液の産生・吸収において、K⁺

イオン輸送が重要な機能を果たしていることは広く認知されている。*KCNE1* と称される K⁺ チャネルは、内リンパ液の産生部位である蝸牛血管条に発現するが、同チャネルのノックアウトマウスでは内リンパ液量に変化が生じることが報告されている⁸⁾。また、同じ K⁺ チャネルファミリーの *KCNE3* が内リンパ液の吸収部位である内リンパ囊に強く発現していることを我々は確認した (図2)。メニエール病の発症、内リンパ水腫の形成に *KCNE1*、*KCNE3* 遺伝子が関与している可能性を考慮して、これら2つの K⁺ チャネル遺伝子上のSNP解析を行った。

1) SNP解析の対象と方法

厚生省前庭斑研究、AAO-HNSの診断基準に従い、メニエール病確実例と考えられる患者63症例 (男性18例、女性45例：平均年齢42.5歳) よりゲノム抽出を行った。静脈血の採取に先立ち、患者には十分なインフォームド・コンセントを与えて研究内容に了解を得た。*KCNE1*、*KCNE3* 遺伝子の塩基配列から、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを作成してPCR法によりそのcoding region 全長を増幅した。増幅された遺伝子断片を回収した後、直接シーケンス法によりその塩基配列を決定した。

SNP解析により同定された *KCNE1* 遺伝子上の112 G/A変異、*KCNE3* 遺伝子上の198 T/C変異の両者について、メニエール病確実例においてそれぞれのSNPがどのような比率で存在するのか検討した (図2)。同時に、対照群として非メニエール病の聴力健常者 (*KCNE1* 遺伝子解析では237例、*KCNE3* 遺伝子解析では211例) から抽出したゲノムにおいても上記2種類のSNPの発現比率を同様に算出し、メニエール病群との間で比較検討した。

2) SNP解析の結果

KCNE1 遺伝子では、メニエール病確実例63症例中、112 Gホモが28例、112 Aホモが8例、112 G/Aヘテロが27例であった。対照群の非メニエール病群237例中、112 Gホモが192例、112 Aホモが20例、112 G/Aヘテロが25例であった。両群間の比較検討では、112 Aを少なくとも一つのアリルに有する割合は、メニエール病群において統計学的に有意に高かった ($P<0.001$)。

KCNE3 遺伝子では、メニエール病確実例63例

図2 *KCNE1* 遺伝子, *KCNE3* 遺伝子上の SNP 解析

KCNE1・*KCNE3* 蛋白の発現部位と
KCNE1・*KCNE3* 遺伝子上の3種類の
SNP

中, 198 T ホモが52例, 198 C ホモが3 例, 198 T /C ヘテロが8 例であった。非メニエール病群211 例中, 198 T ホモが196例, 198 C ホモが4 例, 198 T/C ヘテロが5 例であった。両群間の比較検討では, 198 C を少なくとも一つのアリルに有する割合は, メニエール病群において統計学的に有意に高かった ($p=0.0015$)。

以上の結果より, *KCNE1* 遺伝子の少なくとも一つのアリルに 112 A を有する人, *KCNE3* 遺伝子の少なくとも一つのアリルに 198 C を有する人はメニエール病を発症する率が有意に高くなることが明らかになった¹⁾。

2. *COCH* 遺伝子

COCH (Coagulation factor C homology) 遺伝子は, 優性遺伝形式を示す感音難聴 DFNA9 の原因遺伝子として同定され, P51 S (208 C/T) 変異を含めていくつかの遺伝子異常が報告されている。特に, P51 S 変異を有する家系内の25%はメニエール病様の前庭症状を示すことが観察され, *COCH* 遺伝子がメニエール病の原因遺伝子の一つであるかどうかについての解析が進められた⁴⁾⁵⁾。欧米および国内の解析の結果, メニエール病確実例において *COCH* 遺伝子には変異は同定されなかった。われわれも, メニエール病確実例36名について, *COCH* 遺伝子の exon 4, exon 5 を PCR 法にて増幅・回収して遺伝子変異の有無を解析したが, いずれの症例でも P51 S を含め

COCH 遺伝子に変異を同定することはできなかった。

実際, 臨床的にも, 病理学的にも, DFNA9 とメニエール病の間にはいくつかの相違点が認識されている。例えば, DFNA9 の感音難聴は高音部より始まり徐々に進行して最終的には聾に至ることもあるが, メニエール病では低音部の難聴から始まり, 最終的には 60 dB 程度の水平型難聴に落ち着くのが一般的である。DFNA9 の前庭症状は, 程度の差はあっても多くは浮動感で, メニエール病のように20分間以上継続する回転性めまいは極く少数である。病理的にも, DFNA9 の側頭骨所見では, メニエール病に特徴的な内リンパ水腫はほとんど観察されていない。以上のことより, *COCH* 遺伝子がメニエール病の原因遺伝子であるとの考えには現時点ではコンセンサスは得られていない。

3. *HLA* 遺伝子

メニエール病の発症因子の一つとして自己免疫の関与を示唆する報告はこれまでにも多数なされているが, 自己抗原として type-II collagen, type-IX collagen, type-XI collagen, tubulin, C-Raf, heat shock protein 70 等が想定され, メニエール病症例において上記の血中自己抗体や免疫複合体の解析が進められた。特に, type-II collagen に関しては, 同抗原の認識に関与する *HLA* (Human leukocyte antigen) 遺伝子の多形 (polymorphism) とメニエール病発症の相関について国内外で検討がなされた。日本人のメニエール病症例では CW 4, DRB 1*1602 をアリルに有する症例が統計学的に有意に多く, 一方, 英国人のメニエール病症例では CW 7, A 1, B 8 を有する症例が多かったとされる。同様の解析はその後もいくつか報告されているが, 人種が異なるからか抽出対象の違いか, 再現性のある一定の結果は得られていない。最も新しい韓国での解析では, メニエール病症例の中で type-II collagen に対する自己抗体陽性者では DRB 1*0405 が有意に多く, 同抗体陰性の症例では DRB 1*1201 が有意に多く, 逆に, DRB 1*13 は有意に少なかったという。自己免疫異常による内リンパ水腫の形成, メニエール病の発症に関しては, こうした免疫系を構成する遺伝子群についても変異やバリエーションの解析が必要になるものと考えられる。

図3 ヒト内リンパ嚢発現遺伝子の網羅的解析
メニエール病確実例、聴神経腫瘍症例の内
リンパ嚢より抽出した遺伝子群の DNA マ
イクロアレイ解析

4. メニエール病確実例の内リンパ嚢に発現する遺伝子の網羅的解析

メニエール病の遺伝的素因をさらに詳細に検討するためには、膨大な数の遺伝子の中から内リンパ水腫の形成に深く関与する可能性が高い遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群における変異・バリエーションとメニエール病発症の関連を調べていく必要がある。メニエール病確実例の内リンパ嚢に発現する多数の遺伝子の動態を、同時に網羅的に観察することが可能な DNA マイクロアレイ法を用いて解析することとし、メニエール病確実例の内リンパ嚢において遺伝子発現量が著明に上昇・低下する遺伝子群の抽出を試みた。

1) DNA マイクロアレイ解析の対象と方法

当科で内リンパ嚢手術を施行した難治性メニエール病確実例 (MD 1, 2, 3…), 対照群として経迷路法による摘出術を施行した聴神経腫瘍 (VN 1, 2, 3…) 症例のそれぞれよりヒト内リンパ嚢の採取を行った (図3)。本研究の目的、内容、成果等に関して十分な説明を行い、各症例より文書によるインフォームドコンセントを得た。採取したヒト内リンパ嚢より total RNA の抽出・増幅を行った後、Affymetrix 社製 Gene chip とのハイブリダイゼーションを行った。Human Genome (HG) Focus Array 上では8793遺伝子の遺伝子発現量が一度に測定可能である。得られたデータは解析ソフト Gene Spring® を使用して処理を行った。

2) 聴神経腫瘍 (VN) とメニエール病 (MD) 内リンパ嚢での遺伝子発現量の比較

HG Focus Array の chip 上に存在する8793遺伝子の内、VN 1 および MD 1 いずれの内リンパ嚢でも発現が確認できた7579遺伝子について、両者間で発現量を比較した。MD 1 において0.33倍 ($1/3$ 倍) 以下に発現量の低下を示した遺伝子群が1214遺伝子 ($1214/7579=16\%$)、3倍以上に発現量が増加を示した遺伝子群が114遺伝子 ($114/7579=1.5\%$) 確認された (図4)。同様に、HG Focus Array の chip 上に存在する8793遺伝子の内、VN 1 および MD 2 の内リンパ嚢のいずれにも発現が確認できた7399遺伝子について、両者間で発現量を比較したところ、MD 2 において0.33倍以下に発現量の低下を示した遺伝子群は502遺伝子 ($502/7399=6.8\%$) 確認された。

MD 1 において0.33倍 ($1/3$ 倍) 以下に発現量の低下を示した遺伝子群が1214遺伝子、MD 2 において0.33倍以下に発現量の低下を示した遺伝子群は502遺伝子で、両者に重なって含まれる遺伝子群は322遺伝子であった。HG Focus Array 上で、カリウムイオン輸送に関連する遺伝子は105遺伝子あり、上述の322遺伝子中に含まれるものとして *Kir 4.1* など3遺伝子が同定された。一方、ストレス関連遺伝子のフォルダ内に含まれる遺伝子は138遺伝子で、上述の322遺伝子群内に含まれるものとして *HSP 90* など13遺伝子が同定された。

3) DNA マイクロアレイ解析と DNA チップの開発

DNA マイクロアレイを用いた解析から、メニエール病症例の内リンパ嚢では、聴神経腫瘍症例の内リンパ嚢における各遺伝子の発現量と比較して、その遺伝子発現量が低下する遺伝子群が多数確認された。これらの遺伝子群における発現量の変化が、内リンパ水腫の形成に関係するものなのか、あるいは、存在する内リンパ水腫の結果であるのかは、現時点では不明である。

メニエール病症例で遺伝子発現量の変化するこれらの遺伝子群をさらに機能別に分類して検討することが可能であり、カリウムイオン輸送に関連する遺伝子として *Kir 4.1* など3遺伝子が、ストレス関連遺伝子として *HSP 90* など13遺伝子が同定された。メニエール病の発症とカリウムイオン

図4 聴神経腫瘍症例 (VN 1) とメニエール病確実例 (MD 1) 内リンパ嚢に発現する遺伝子群

VN 1と比較して、MD 1で遺伝子発現量が3倍以上、1/3倍以下に変化した遺伝子群の同定

図5 メニエール病診断 DNA チップの開発
メニエール病関連遺伝子の同定、遺伝子診断の臨床応用と DNA チップの開発

輸送やストレスとの関係についてはこれまでに十分なデータが蓄積され、内リンパ水腫の形成に密接な関連を有することが示唆されている。内リンパ嚢における遺伝子発現の質的・量的変化が、内リンパ嚢における水・イオン輸送における機能的変化を生じ、内リンパ水腫の形成やメニエール病発症の遺伝的素因となる可能性が推察される。これらの遺伝子上の変異・バリエーションの解析がさらに進み、メニエール病の遺伝的素因についての理解が深まれば、将来的 (20xx 年) にはメニエ

ール病診断 DNA チップの開発も期待できる (図5)。カリウムチャネルや水チャネルはもちろん、メニエール病の発症に関連すると推察される①ストレス関連遺伝子、②自律神経関連遺伝子、③内耳微小循環に関連する遺伝子、④そして自己免疫に関連する遺伝子全てがこの DNA チップ1枚にプリントされ、メニエール病の遺伝的素因が一瞬でわかる簡易検査キットの実用化がもたらされることになる。

まとめ

これまでのメニエール病の遺伝的素因に関する研究成果から示唆されたのは、①メニエール病発症の遺伝的素因と推察される遺伝子が存在すること、②遺伝子型、すなわち、遺伝子上の変異やバリエーションが、表現型、すなわち、臨床症状や検査所見に影響を与えること、そして、③例えば、*KCNE* 遺伝子が難治例に特徴的な遺伝的素因であると仮定するなら、難治例なのか予後良好例なのかの予後判定が遺伝子診断により可能になることである。すなわち、遺伝子バリエーションを調べることで、臨床経過の予測が可能となり、同時に、発症の予防や治療法の選択にもこの遺伝的素因の決定が役立つことになる (図5)。

近未来的には、メニエール病のみならず、さまざまな原因で発症するめまい疾患それぞれに対するめまい診断 DNA チップが完成、遺伝的素因の発症前診断により、生活習慣の改善、新薬、さらに、遺伝子治療や再生医療を用いての新しい治療法や予防法の開発につながるものと期待される。

文献

- 1) Doi K, Sato T, Kuramasu T, et al: Meniere's disease is associated with SNPs in the human potassium genes, *KCNE 1* and *KCNE 3*. *ORL* 67: 289-293, 2005
- 2) Paparella MM: The cause and pathogenesis of Meniere's disease and its symptoms. *Acta Otolaryngol* 99: 445-451, 1985
- 3) Morrison AW: Anticipation in Meniere's disease. *J Laryngol Otol* 109: 499-502, 1995
- 4) Usami S, Takahashi K, Yuge I, et al: Mutation in the *COCH* gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet* 11: 744-748, 2003

- 5) Sanchez E, Lopez-Escamez JA, Lopez-Nevot MA, et al: Absence of COCH mutation in patients with Meniere's disease. *Eur J Hum Genet* 12: 75-78, 2004
 - 6) Koyama S, Mitsuishi Y, Bibee K, et al: HLA association with Meniere's disease. *Acta Otolaryngol* 113: 575-578, 1993
 - 7) Koo J-W, Oh SH, Chang SO, et al: Association of HLA-DR and type II collagen autoimmunity with Meniere's disease. *Tissue Antigens* 61: 99-103, 2003
 - 8) Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, et al: Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 1996; 17: 1251-1264
-
- 原稿到着：平成20年5月1日
 別刷請求先：土井 勝美
 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2
 大阪大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科