

國立臺灣大學醫學院 臨床醫學研究所 博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine
National Taiwan University, College of Medicine
Ph.D. Thesis

遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學暨其臨床應用

Genetic epidemiology and molecular pathology of
hereditary hearing impairment and the clinical applications

研究生：吳振吉 (Chen-Chi Wu)

臨床指導老師：許權振 (Chuan-Jen Hsu)

基礎指導老師：陳培哲 (Pei-Jer Chen)

中華民國九十九年一月





致謝

暮然回首，自從碩士班投入於聽力損失之「分子遺傳學」(molecular genetics) 研究，不知不覺也過了七個多年頭了，宛如又從新念了一遍台大醫學系。

回顧這七年多來所走過的足跡，從一無所知的門外漢，到國外同領域的研究者開始知道台灣有個作 deafness genetics 的 Wu CC；從剛開始只能消極地告訴病童家長「聽損原因不明，不過要定期追蹤」，到今天我們實驗室已初具規模、並已可提供全台灣聽損病人確切的基因診斷以及適當的遺傳諮詢。七年多的研究所生涯，雖不敢說有偉大的研究成就，但自覺從進入所內到離開，自己的行囊卻是裝的滿滿的。

當中，最要感謝的，就是我的兩位指導教授：許權振教授及陳培哲教授。許教授這幾年來，不僅在知識及臨床上給予我很多指導，也提供我許多人力、物力資源，全力支持我做聽損的基因研究；陳教授望之儼然，即之也溫，他總是不藏私、毫無保留地提供我研究方面的建議，每當研究遇到瓶頸，老師都能適時地伸出援手，指導我找到正確的研究方向。非常慶幸人生中可以遇到兩位這麼好的老師，也多虧兩位老師的提攜和指導，才能讓資質駑鈍的我能夠逐漸成長，並為未來 10~20 年的研究之路，打下良好的基礎。

其次，要感謝的是我論文的指導委員：楊義良教授、楊偉勛教授和劉殿楨教授。感謝楊義良教授於擔任台北護理學院聽語所所長百忙之際，仍願意擔任我論文的指導委員，並給予我研究中關於聽語復健方面珍貴的建議；楊偉勛教授是醫學院以親和力、幽默聞名的老師，每當基因研究遇到問題的時候，他總是能親切地指導我；聽力學博士劉殿楨老師，在聽力的分析以及老年性聽損的研究方面，不僅給我很多指導，也實質地提供我許多幫助。論文的口試委員李宣佑教授，是國內研究感覺系統遺傳學的泰斗，願意不辭勞遠到台北給我直接的指導，實在銘感五內。

我也要感謝醫學院及醫院曾經給予我指導和幫助的老師和學長，包括幫我們培育聽損基因變異轉殖鼠的林淑華老師和游益興博士、幫我們處理電子顯微鏡研究的盧國賢教授、提供我們測量老鼠內耳電位的劉宏輝教授、提供我們測量老鼠平衡功能儀器的蕭水銀教授、以及於 connexin 細胞轉染研究給與我們建議的吳建春老師。基因醫學部胡務亮主任所建立的台大醫院遺傳性疾病基因庫，使我們收集病例的流程更加順暢；婦產部陳思原老師，於遺傳疾病之產前及胚胎植入前基因診斷方面，也給我很多指導；蘇怡寧學長，因為基因醫學部的門診剛好為隔壁診，屢屢幫我解答了許多基因研究方面的疑惑；陳沛隆學長可以說是我投入遺傳研究的啟蒙師父，但今後要向學長學習的恐怕只會更多；蔡佳醞學長，則是在多基因疾病基因關聯研究方面，給予我許多建議。

此外，還要感謝公衛學院流病所統計組的李依錦醫師(我大學同學)和劉妍甄同學幫我們處理統計相關問題。耳鼻喉部裡的葉德輝老師和楊庭華學長，於我們

開始進行動物研究之初，給與我們很大的協助。大林慈濟醫院的黃俊豪醫師，可以說是住院醫師以來的老戰友，現在仍一起收集老年性聽損的受試者、一起進行研究。同時，也要感謝國內耳鼻喉科界及聽語學界許多先進們給予我們的指正與病人轉介。

感謝同實驗室的盈璋、昱勳、柏伶、琬錡和文聖，一起和我於聽損基因研究之路上並肩作戰；也要感謝許權振教授的助理錦薇，幫我們處理掉一些實驗室文書上的瑣事。

最後，感謝照顧我最久，永遠在背後支持我的父親、母親、拙荊怡岑、家姊以及舍妹。你們是我一切奮鬥的原動力。

雖然完成了博士論文，但是我認為，我們的研究其實還在起飛的階段。在感謝上天對我的眷顧、感謝周遭有這麼好的師長、環境和同仁的同時，卻也感受到了身處在國內醫學的龍頭—臺大醫院的使命感，我想，今後唯有更加努力，才能回報大家給我的栽培、指導和照顧。



目錄

封面	1
口試通過證明	2
致謝	3
目錄	5
圖表目錄	6
縮寫表	9
中英對照表	11
一、中文摘要	15
二、緒論	19
第一部份：遺傳性聽損基本介紹	20
第二部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學	24
第三部份：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用	32
第四部份：本研究之假設與目的	37
三、研究方法與材料	41
第一部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究	42
第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用	51
四、結果	57
第一部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究	58
第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用	69
五、討論	73
第一部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究	74
第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用	85
六、展望	93
七、論文英文簡述	103
八、參考文獻	117
九、圖表	143
圖	143
表	184
研究方法附表	218
十、附錄	221

圖表目錄

圖

圖一：	遺傳性聽損之分類與流行病學分佈	143
圖二：	四種可能影響粒線體 m.1555A>G 突變臨床表徵的機制	144
圖三：	可供粒線體 m.1555A>G 突變病人隨身攜帶之小卡片	145
圖四：	<i>Slc26a4</i> 基因 c.919-2A>G 變異及 p.H723R 變異之 plasmid constructs	146
圖五：	pIRES2-AcGFP1 質體	147
圖六：	於細胞株之功能性基因研究之流程	148
圖七：	<i>Gjb2</i> 基因 p.V37I 變異之 plasmid construct	149
圖八：	SNaPshot 基本原理	150
圖九：	胚胎著床前基因診斷(PGD)流程簡圖	151
圖十：	<i>SLC26A4</i> 基因 c.919-2A>G 突變源自一起始點變異	152
圖十一：	<i>SLC26A4</i> 基因促進區之 c.-2554G>A 變異	153
圖十二：	<i>Slc26a4</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之聽力表徵	154
圖十三：	<i>Slc26a4</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之平衡覺表徵	155
圖十四：	<i>Slc26a4</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之解剖學表徵	156
圖十五：	<i>Slc26a4</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之組織學表徵	157
圖十六：	<i>Slc26a4</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之內耳毛細胞退化	158
圖十七：	<i>Slc26a4</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 內耳之 pendrin 表現	159
圖十八：	<i>GJB2</i> 基因 p.V37I 變異與特發性感覺神經性聽損之研究流程	160
圖十九：	p.V37I 變異之家族樹分析	161
圖二十：	於 <i>GJB2</i> 基因促進區(promoter)及其上游之 <i>GJB6</i> 基因搜尋突變點	162
圖二十一：	<i>GJB2</i> 基因 p.V37I 與 c.235delC 同型合子之複合聽力圖	163
圖二十二：	西方點墨法及螢光研究	164
圖二十三：	染料運送(dye transfer test)研究	165
圖二十四：	<i>GJB2</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之聽力表徵	166
圖二十五：	<i>GJB2</i> ^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之內耳組織學	167
圖二十六：	粒線體 m.1555A>G 突變臨床表現型之家族內差異性	168
圖二十七：	粒線體 m.1555A>G 突變臨床表現型之家族間差異性	169
圖二十八：	所有母系遺傳成員皆帶有 m.1555A>G 同質突變	171
圖二十九：	粒線體 m.1555A>G 突變外顯率與粒線體 DNA 單套群之相關性	172
圖三十：	SNaPshot 基因檢測之結果圖	173

圖三十一：	PGD 案例之聽力圖及內耳影像結果	174
圖三十二：	於第二次 PGD 療程所進行 12 個胚胎之基因檢測	175
圖三十三：	以絨毛膜取樣進行產前診斷	176
圖三十四：	以 AABR (35 dBHL, clicks)進行新生兒聽力篩檢	177
圖三十五：	一 BOR 症候群家族及其所帶 <i>EYAI</i> 基因 p.Q123X 突變	178
圖三十六：	聽損基因研究之未來方向	179
圖三十七：	進行新生兒耳聾基因變異篩檢之原因	180
圖三十八：	利用新生兒血片進行耳聾基因變異篩檢流程	181
圖三十九：	新生兒耳聾基因篩檢可輔助傳統新生兒聽力篩檢	182
圖四十：	質離子幫浦阻斷劑(PPI)作用於 <i>SLC26A4</i> 基因突變病人急性聽損之可能機制	183

表

表一：	420 個家族初始受試者之基本資料	184
表二：	於 420 個家族中三段常見耳聾基因之基因變異光譜	185
表三：	醫院及聽語復健中心初始受試者中常見耳聾基因變異對偶基因頻率的差異	186
表四：	醫院及聽語復健中心初始受試者中 <i>SLC26A4</i> 基因型分佈的比較	187
表五：	醫院及聽語復健中心初始受試者中聽力學特徵之比較	188
表六：	以羅吉斯迴歸分析聽力學特徵與 <i>SLC26A4</i> 基因型之相關性	189
表七：	於 101 個 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族之 <i>SLC26A4</i> 基因型分布	190
表八：	於 101 個 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族之 <i>SLC26A4</i> 基因變異	191
表九：	於 c.919-2A>G 同型合子、異型合子及對照組所進行之 SNP 分析	192
表十：	<i>SLC26A4</i> 基因型與表現型之關連性	193
表十一：	<i>SLC26A4</i> 基因促進區(promoter)及 <i>FOXI1</i> 基因之基因變異	194
表十二：	21 名 c.919-2A>G 異型合子病人之未被偵測出突變 <i>SLC26A4</i> 對偶基因之單套型	195
表十三：	不同組間基因變異對偶基因頻率之比較	196
表十四：	聽損程度不同組間 p.V37I 變異基因型分布之比較	197
表十五：	不同 p.V37I 基因型病人基本資料與聽力表徵之比較	198
表十六：	1005 名受試者基本資料	199
表十七：	依 Z_{low} , Z_{4-tone} 與 Z_{high} scores 區分實驗組與對照組年齡、性別之比較	200
表十八：	依 Z_{low} , Z_{4-tone} 與 Z_{high} scores 區分實驗組與對照組基因型之	201

	分布	
表十九：	<i>GJB2</i> 單套型與老年性聽損之相關性	202
表二十：	不同 c.109G>A 基因型之平均 Z_{low} , Z_{4-tone} 與 Z_{high} scores	203
表二十一：	羅吉斯回歸校正其他干擾因子	204
表二十二：	10 個 m.1555A>G 突變家族初始受試者之臨床表現型	206
表二十三：	粒線體 DNA 單套群與 m.1555A>G 突變外顯率之比較	207
表二十四：	比較不同基因檢測結果之語音聽知覺表現	208
表二十五：	比較不同影像學結果之語音聽知覺表現	209
表二十六：	以廣義線性模式分析各預後因子與語音辨識率總和之相關性	210
表二十七：	24 名內耳畸形病童之植入人工耳蝸後之語音聽知覺表現	211
表二十八：	本研究所選取 SNaPshot multiplex assays 之點位	212
表二十九：	SNaPshot 反應與突變檢測之引子	213
表三十：	經 SNaPshot assay 檢測出基因變異病人之基因型	214
表三十一：	案例家族兩次 PGD 療程之結果	215
表三十二：	於體染色體隱性遺傳模式下， <i>SLC26A4</i> 基因變異與大前庭導水管之關連性	216
表三十三：	文獻比較： <i>SLC26A4</i> 基因型與表現型之關連性	217

研究方法

附表一	Sequences of the primers for quantitative PCR of the 21 <i>SLC26A4</i> exons	218
附表二	Sequences of the primers and conditions used for amplification of the <i>SLC26A4</i> promoter and <i>FOXII</i>	219
附表三	Sequences of the primers for PCR of the 11 <i>TRMU</i> exons	220

縮寫表

AABR	automated auditory brainstem response
ABR	auditory brainstem response
ANOVA	analysis of variance
ARHI	age-related hearing impairment
ASSR	auditory steady-state response
cDNA	complementary DNA
CI	confidence interval
Cx	connexin
EVA	enlarged vestibular aqueduct
gDNA	genomic DNA
GLM	general linear model,
HHL	hereditary hearing loss
HL	hearing level
HRCT	high resolution computed tomography
IAC	internal auditory canal
IEM	inner ear malformation
LCL	lymphoblastoid cell line
LHON	Leber's hereditary optic neuropathy
MAF	minor allele frequency
MD	Mondini's dysplasia
MIM	Mendelian Inheritance in Man
NIHL	noise-induced hearing loss
OAE	otoacoustic emission

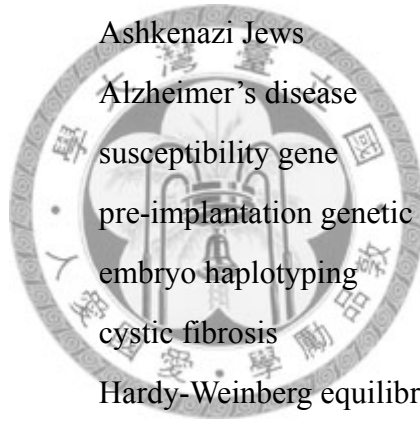
OR	odds ratio
PCR	polymerase chain reaction
PGD	pre-implantation genetic diagnosis
SBE	single base extension
SCC	semicircular canal
SNHI	sensorineural hearing impairment
SNP	single nucleotide polymorphism



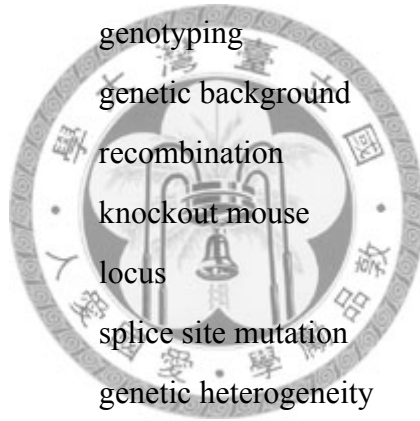
中英對照表

人工耳蝸	cochlear implant
人工耳蝸植入手術	cochlear implantation
大前庭導水管	enlarged vestibular aqueduct
干擾因子	confounding factor
上游調控區域	upstream regulatory element
子單元	subunit
毛細胞	hair cell
內淋巴	endolymph
內淋巴水腫	endolymphatic hydrops
內聽道	internal auditory canal
內聽道狹窄	narrow internal auditory canal
內聽道擴張	wide internal auditory canal
引子	primer
半規管	semicircular canal
目標族群	target population
功能性基因研究	functional genetic study
甲狀腺腫	goiter
外顯率	penetrance
同型合子突變	homozygous mutation
同質突變	homoplasmic mutation
多病患家族	multiplex family
老年性聽損	age-related hearing impairment
西方點墨法	western blotting
血管紋	stria vascularis
先天性聽損	congenital hearing loss
自動聽性腦幹反應	automated auditory brainstem response
次要等位基因頻率	minor allele frequency

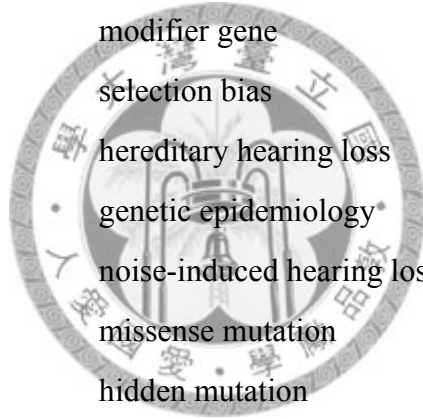
耳蝸	cochlea
耳蝸未完全分隔	incomplet partition of cochlea
耳聲傳射	otoacoustic emission
耳聾基因	deafness gene
亨丁頓舞蹈症	Huntington's disease
初始受試者	probands
波動性聽力喪失	fluctuating hearing loss
表型模擬	phenocopy
表現型	phenotype
非症候群型遺傳性聽損	non-syndromic hereditary hearing loss
定位選殖	positional cloning
直系同源	orthologous
阿胥肯那吉猶太人	Ashkenazi Jews
阿茲海默症	Alzheimer's disease
易感基因	susceptibility gene
胚胎著床前基因診斷	pre-implantation genetic diagnosis
胚胎單套定型技術	embryo haplotyping
肺囊泡纖維化	cystic fibrosis
哈溫平衡	Hardy-Weinberg equilibrium
前庭	vestibule
前庭擴大	vestibular enlargement
前庭導水管	vestibular aqueduct
突變光譜	mutation spectrum
突變負荷	mutation load
後天性聽損	acquired hearing loss
染色體互換	chromosomal crossover
研究族群	study population
起始者效應	founder effect
連鎖不平衡	linkage disequilibrium
連鎖分析	linkage analysis
高解析度電腦斷層掃描	high resolution computed tomographic scan



候選基因	candidate gene
候選基因方式	candidate gene approach
家族樹分析	segregation analysis
家族譜	pedigree
缺失突變	deletion mutation
症候群型遺傳性聽損	syndromic hereditary hearing loss
純音聽力檢查	pure-tone audiogram
胺基酸甘醣體	aminoglycoside
帶因者	carrier
淋巴球母細胞株	lymphoblastoid cell line
基因多效性	pleiotropy
基因多型性	polymorphism
基因定型	genotyping
基因背景	genetic background
基因重組	recombination
基因剔除鼠	knockout mouse
基因座	locus
基因接合處突變	splice site mutation
基因異質性	genetic heterogeneity
基因單套型	haplotype
基因置換鼠	knockin mouse
基因關聯研究	genetic association study
基因雙套型	diplotype
習語前聽損	pre-lingual hearing impairment
習語後聽損	post-lingual hearing impairment
移碼突變	frameshift mutation
異型合子突變	heterozygous mutation
異質突變	heteroplasmic mutation
盛行率	prevalence
單一核苷酸多型性變異	single nucleotide polymorphism
單病患家族	simplex family



單套缺失	haploinsufficiency
單套群	haplogroup
發育不全	dysplasia
勝算比	odds ratio
無義突變	nonsense mutation
感覺神經性聽損	sensorineural hearing impairment
複合異型合子突變	compound heterozygous mutation
複合聽力圖	composite audiogram
對偶基因	allele
廣義線性模式	general linear model
聚合酶連鎖反應	polymerase chain reaction
編碼區	coding region
調節基因	modifier gene
選樣偏差	selection bias
遺傳性聽損	hereditary hearing loss
遺傳流行病學	genetic epidemiology
噪音性聽損	noise-induced hearing loss
錯義突變	missense mutation
隱藏突變	hidden mutation
雙基因	di-genic
聽力程度	hearing level
聽力損失形式	hearing loss pattern
聽力圖圖形	audiogram configuration
聽性穩態誘發反應	auditory steady-state response
聽損病因	etiology
變異的對偶基因	variant allele



一、中文摘要

研究背景及目的

特發性(原因不明)感覺神經性聽損係臨床上相當常見的疾病，而最近的研究證實，基因變異是導致特發性感覺神經性聽損的重要成因之一。最近數年來，學界已經發現至少四十多個基因與特發性感覺神經性聽損的發生有關(即遺傳性聽損)。遺傳性聽損基因及其突變，常因種族不同而存在著很大的差異，易言之，吾人臨床上並無法直接採用國外的研究結果，來作為遺傳諮詢的準則，若要提供病患及其家屬正確的資訊及診斷，顯然必須仰賴國人自行完成一大規模且完整的基因流行病學調查，而以此一檢體庫為基礎，吾人日後亦可致力於新耳聾基因的找尋或其他研究。同時，一些常見耳聾基因變異之致病機制，諸如：*GJB2* 基因的 p.V37I 變異之致病性、*SLC26A4* 基因變異之基因型與表現型之關連性、*SLC26A4* 基因變異如何導致聽損、以及影響粒腺體 m.1555A>G 突變臨床表現型之因素等，皆有待吾人釐清，以助於吾人了解病人聽損發生之原因，進而針對該原因研擬治療方針。

而如同其他單基因遺傳疾病，過去幾年來遺傳性聽損的研究，也逐漸地被應用於臨床醫學以幫助病人及其家屬。然而，從臨床研究者的角度觀之，吾人自不宜安於現狀、故步自封，而應致力於新臨床應用之研究或研發，以使更多病人得以受惠於基因醫學的新進步。而隨著我們對於耳聾基因變異流行病學更精確的掌握，以及對於耳聾基因變異致病機制更深入的了解，若能結合其他領域醫學的較新進步，如內耳之人工耳蝸手術、基因定型技術、以及生殖科技等，應能從中研究出聽損基因檢測之臨床新應用。

研究材料與方法

本研究分兩大部分執行：第一部分為遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究；第二部分為遺傳性聽損基因檢測之臨床應用。

於第一部分之遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究，本研究先由建立一大規模之特發性感覺神經性聽損基因檢體庫著手，並從中研究國人聽損基因流行病學；其次，再分就三個最常見之耳聾基因，即 *GJB2* 基因、*SLC26A4* 基因與粒線體 12S rRNA 基因之基因變異，研究其致病機制：

1. 遺傳性聽損之基因流行病學研究：於一大規模之聽損世代中，進行基因檢測，並比較常見遺傳性聽損基因突變之機構間及地區間差異。
2. *SLC26A4* 基因變異及其致病機制：於大前庭導水管家族，分析 *SLC26A4* 基因型與表現型之關連性，搜尋僅帶單一 *SLC26A4* 基因突變或未帶突變之初

始受試者是否帶有 *SLC26A4* 基因促進區(promoter)及 *FOXII* 基因之基因變異,並進行單套型分析以尋找隱藏突變之可能位置;同時,培育帶有 *Slc26a4* 基因國人最常見之 c.919-2A>G 突變之基因置換鼠,以研究 *SLC26A4* 基因變異之致病機轉。

3. *GJB2* 基因變異及其致病機制:分別於特發性感覺神經性聽損與老年性聽損等二研究世代,藉由分析比較 *GJB2* 基因 p.V37I 變異之對偶基因頻率及基因型分布,以釐清該變異與聽損發生之相關性;同時,亦於 HeLa 細胞進行轉染實驗,並培育帶有 p.V37I 變異之基因置換鼠,以研究其致病機轉。
4. 粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制:分析影響粒線體 12S rRNA 基因 m.1555A>G 突變表現型之因子,包括粒線體基因體之單套群、m.1555A>G 之突變負荷、細胞核內可能影響粒線體表現的基因、以及抗生素暴露等因素。

於第二部分之遺傳性聽損基因檢測之臨床應用研究,本研究則區分下列三子題,研究聽損基因檢測之新應用:

1. 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果:研究接受人工耳蝸植入手術病童之術後長期語音聽知覺表現,分析比較各預後因子(包括基因檢測結果、手術年齡、人工耳蝸使用期間、術前殘存聽力及影像學檢查結果等)對於人工耳蝸植入手術術後聽能創建效果好壞的影響。
2. 研發高效率低成本之基因診斷工具:使用 SNaPshot 此一基本技術,設計一套可同時檢測約 20-40 個耳聾基因突變位點的檢測方法,並應用該檢測方法於一新的特發性感覺神經性聽損世代,以確認此一診斷工具的效力。
3. 胚胎著床前聽損基因診斷:針對帶有特定耳聾基因變異的家族,設計胚胎著床前基因診斷技術,以助其生育聽力正常之胎兒。

結果

第一部分之遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

1. 遺傳性聽損之基因流行病學研究:本研究建立了一個大規模國人特發性感覺神經性聽損的基因庫,也釐清了國人聽損基因流行病學的大致輪廓—國人的基因變異仍以 *GJB2*、*SLC26A4* 及粒線體 12S rRNA 基因等三個耳聾基因最為常見,並證實了來自不同機構的病人,由於其聽力特徵亦不相同,將導致基因流行病學研究結果的歧異。
2. *SLC26A4* 基因變異及其致病機制:國人大前庭導水管病人中,八成以上可歸因於 *SLC26A4* 基因變異,而進一步之表現型-基因型關連性研究,則暗示仍有未被檢測出之 *SLC26A4* 基因變異;另外,於本研究所培育出之 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 突變之基因置換鼠 *Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}*,表現型可觀察到重度聽損、平衡能力差、前庭導水管擴大等與人類疾病類似之

表徵。

3. *GJB2* 基因變異及其致病機制：對偶基因頻率、病人基因型分佈與家族樹分析顯示，p.V37I 變異與特發性感覺神經性聽損以及老年性聽損均顯著相關，而於 HeLa 細胞進行之實驗則顯示該變異可能為影響蛋白質功能之突變。然而 p.V37I 變異同型合子臨床上聽損程度差異極大，甚至可能完全正常，顯示應有其他因素調控其聽力表徵。
4. 粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制：國人特發性感覺神經性聽損家族中，粒線體 m.1555A>G 突變之盛行率約為 3%，而於多病例家族，其盛行率更高達 11%。抗生素暴露、m.1555A>G 突變之突變負荷及細胞核相關基因之基因變異，皆非決定國人 m.1555A>G 突變臨床表徵之重要因子；反之，某些單套群，如單套群 F，似乎與家族之低外顯率相關。

第二部分之遺傳性聽損基因檢測之臨床應用研究

1. 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果：基因檢測結果及影像學結果為影響人工耳蝸植入術後成效最重要的兩個指標。以影像學上內聽道狹窄之有無評估人工耳蝸之預後，可預測出術後成效不佳之病例；而以基因診斷預測預後，則可預測出術後成效良好之病例。兩者恰可相輔相成，合併使用，將有助於吾人於人工耳蝸植入術前，更精準地預測病人術後成效。
2. 研發高效率低成本之基因診斷工具：本研究研發之 SNaPshot assay，可於 2 次 SNaPshot 反應，完成國人最常見之 20 個耳聾基因變異點位之掃描。將該項基因檢測技術應用於診斷 214 個聽損家族則發現其正確率不亞於傳統之基因定序，且具效率高、成本低、可彈性調整點位與易於推廣等優點。
3. 胚胎著床前聽損基因診斷：本研究首先以 GenomiPhi technology 和 primer extension mini-sequencing 等方法，針對一 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變同型合子病童及其父母，研發並校正單一細胞 c.919-2A>G 突變點檢測技術。其後，以人工生殖技術，誘導排卵並進行體外受精，於胚胎培育成八細胞期時，進行胚胎切片以作單一細胞基因診斷。於第二次 PGD 療程，本研究成功使病童母親受孕，並於 2009 年 5 月生育聽力完全正常之嬰兒，而完成世界首例報告。

結論

本研究過去幾年來所進行的遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究，已使我們對於國人特發性感覺神經性聽損之常見基因變異、基因型與表現型之關連性、以及其致病機制，有了基本的了解。而最近幾個常見耳聾基因變異基因置換鼠之成功培育，不僅有助於我們釐清各基因變異之致病機制，亦將成為我們未來研究新治療方針之礎石。當然，本研究也注意到有些

尚未解決的課題，有待吾人進行更深入的研究。

本研究發現，聽損之基因檢測結果不僅可用來預測人工耳蝸手術術後成果，基因流行病學資料的建立，也使得吾人得以研發高效率、低成本的基因檢測工具來推廣基因檢測並幫助更多病人。近年來，本研究也嘗試結合其他領域醫學的較新進展，以研究聽損基因檢測之臨床新應用：聽損之基因檢測與生殖科技的結合，使得吾人臨床上得以扮演更積極的角色，而能夠於生命的最始期即能提供聽損家族其所需要的幫助。

關鍵字

遺傳性聽損 (Hereditary hearing impairment)

基因流行病學 (Genetic epidemiology)

SLC26A4 基因 (*SLC26A4* gene)

PDS 基因 (*PDS* gene)

大前庭導水管 (Enlarged vestibular aqueduct)

Pendred 氏症候群 (Pendred syndrome)

GJB2 基因 (*GJB2* gene)

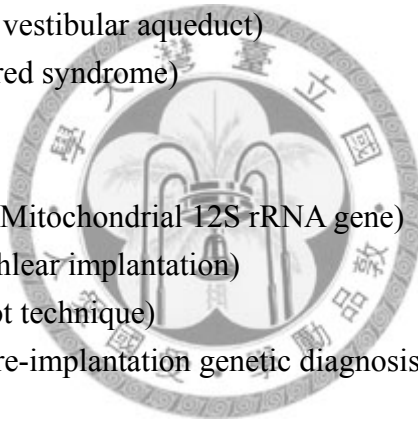
Cx26 基因 (*Cx26* gene)

粒線體 12S rRNA 基因 (Mitochondrial 12S rRNA gene)

人工耳蝸植入手術 (Cochlear implantation)

SNaPshot 技術 (SNaPshot technique)

胚胎著床前基因診斷 (Pre-implantation genetic diagnosis)



二、緒論

第一部份：遺傳性聽損基本介紹

- (一) 前言
- (二) 遺傳性聽損之定義
- (三) 遺傳性聽損之分類與流行病學
- (四) 遺傳性聽損之常見致病基因及其突變
- (五) 其他罕見遺傳性聽損基因之發現
- (六) 遺傳性聽損致病基因之特色
- (七) 結論

第二部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學

- (一) 具有流行病學意義的常見耳聾基因及其突變
- (二) 國內遺傳性聽損流行病學之過去相關研究及其結果
- (三) 當前國人遺傳性聽損基因流行病學所待進行之工作
- (四) 遺傳性聽損基因變異之致病機制
- (五) 結論

第三部份：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

- (一) 遺傳性聽損基因檢測之一般臨床應用
- (二) 臨床新應用一：以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果
- (三) 臨床新應用二：研發高效率低成本之基因診斷工具
- (四) 臨床新應用三：胚胎著床前聽損基因診斷
- (五) 結論

第四部份：本研究之假設與目的

- (一) 遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學
- (二) 遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

第一部分：遺傳性聽損基本介紹

(一) 前言

聽力損失是各種感覺系統缺陷中最為常見的。臨床醫師在處理聽力損失的病人時，通常必須先找出原因，才能做出進一步的決定，而常見的原因包括感染、外傷、噪音、耳毒性藥物、老化、遺傳等等。這些原因的致病機轉和預防治療，大多早已為臨床醫師所熟知，惟獨吾人對於「遺傳性聽損」(hereditary hearing impairment)的瞭解，一直到最近幾年才有重大突破。

(二) 定義

廣義的遺傳性聽損，除了吾人所熟知發生於嬰兒、幼童及青少年時期之遺傳性聽損外，尚包括老年性失聰、美尼爾氏症及耳硬化症等基因因素可能扮演一定角色的耳疾，惟這些疾病受太多環境因素所干擾與影響，因此不包括在一般的討論之內。其次，遺傳性聽損並不等於「先天性聽損」(congenital hearing impairment)。先天性聽損是指出生時就發生的聽損，其中當然由基因遺傳所引起的佔有相當大的比重，但是其他因素如母子病毒垂直感染或過產併發症等，也會導致先天性聽損。另一方面，遺傳性聽損的病人，也不全是先天性聽損，因為一部份病人於出生時聽力可能為正常或接近正常，隨年紀漸長才逐漸變差。一般而言，在已開發國家如台灣，剛出生的嬰兒約 1000 人中有 3 人會合併中至重度聽損，其中三分之二可歸因於遺傳因素；而至成年之前，此 1000 人中又約有 1 人會再發生感覺神經性聽力損失，其中遺傳因素所扮演的角色則仍未知(Marazita et al., 1993)。

(三) 遺傳性聽損之分類與流行病學

遺傳性聽損可依是否合併身體其他器官的異常，區分為「症候群型」(syndromic)與「非症候群型」(non-syndromic)兩類，其中以後者為多數，兩者比例約為 30：70 (Petit, 1996)(圖一)。較常見的症候群型遺傳性聽損有：Pendred 氏症候群（聽損合併甲狀腺腫）、Usher 氏症候群（聽損合併色素性視網膜炎）、Waardenburg 氏症候群（聽損合併前額白髮及內眥異位）、Jervell & Lange-Nielsen 氏症候群（聽損合併心律不整）等等。由於症候群型遺傳性聽損有其他身體表徵可供辨識，而有助於病例的收集與分類，因此吾人對於症候群型遺傳性聽損的基因研究，有較多的瞭解，目前已知約有 100 個基因與症候群型遺傳性聽損有關。

反之，佔較多數的非症候群型遺傳性聽損之基因研究，則一直到 8、9 年前才有突破性的進展。歸究其原因主要有三：(1) 致病基因的異質性—有太多基因

可能造成聽損，(2) 病患除了聽損外缺乏可辨識的臨床表徵，(3) 瘖啞病人之間經常相互通婚致使研究更加複雜化(Petit, 1996)。傳統上針對非症候群型聽損之遺傳研究，乃是藉由家族性病例之「連鎖分析」(linkage analysis)，將可能的目標基因定位於染色體上。當然，各個家族之間致病基因可能不同，然而由於臨床表徵無法區分，因此各個可能致病的基因就以「基因座」(locus)的方式區隔。基因座的命名方式主要根據兩點：遺傳的形式(如 DFNA 代表體染色體顯性、DFNB 代表體染色體隱性、DFN 代表 X 染色體性聯遺傳、DFNY 代表 Y 染色體性聯遺傳)，以及發現之先後(如第一例發現的體染色體顯性遺傳定名為 DFNA1)。目前已知至少有 57 個 DFNA 基因座、77 個 DFNB 基因座、8 個 DFN 基因座、以及 1 個 DFNY 基因座，而且數目還在持續增加中(Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>, accessed on 10/10/2009)。一般而言，體染色體隱性的遺傳性聽損，聽力損失程度通常較嚴重，也多發生在「習語前」(pre-lingual)；而體染色體顯性的遺傳性聽損，聽力損失程度則相對較輕微，且較常發生在「習語後」(post-lingual)。在習語前遺傳性聽損的病人中，DFNB 約佔 75% 的個案，DFNA 約佔 20% 的個案，DFN 約佔 2~3% 的個案，而另外還有不到 2~3% 的個案是經由粒線體遺傳。其中，在歐美的研究中，DFNB1 在遺傳性聽損病人的盛行率接近 50%，而在地中海沿岸的居民，其盛行率甚至可高達 79% (Gasparini et al., 1997; Maw et al., 1995)。

(四) 遺傳性聽損之常見致病基因及其突變

1997 年可以說是非症候群型遺傳性聽損之基因研究有重大發展的一年。在這一年，比較重要的基因座的「候選基因」(candidate gene)，如 DFNB1 的 *GJB2* (*Cx26*) 基因(Kelsell et al., 1997)及 DFNA1 的 *DIAPH1* 基因(Lynch et al., 1997)相繼被發現。之後，由於分子生物學的進步和人類基因體的成功解碼，使學者得以活用「定位選殖」(positional cloning)及「候選基因」(candidate gene)等方法，而加速整個研究的進展。目前已經發現約有四十多個基因的突變與非症候群型聽損的發生有關，包括 *GJB2* (*Cx26*)、*GJB3* (*Cx31*)、*GJB6* (*Cx30*)、*GJB1* (*Cx32*)、*DIAPH1*、*MYO7A*、*MYO15*、*OTOF*、*SLC26A4* (*PDS*)……等(Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>, accessed on 10/10/2009)。其中，臨床上較常見發生異常的基因有：*GJB2* (*Cx26*) 基因、*SLC26A4* (*PDS*) 基因、粒線體 DNA 突變(12S rRNA 基因)、以及 *OTOF* 基因等。由於這些常見的耳聾基因及突變，意義上直接相關於遺傳性聽損的基因流行病學，鑑於論述之完整性，將於其後的第二部分詳細說明。(→第二部分：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究)

(五) 其他罕見遺傳性聽損基因之發現

至於其他罕見之致病基因，由於只出現在全世界單獨一個或少數幾個家族，因此由遺傳諮詢的觀點而言，並不具顯著的臨床價值。然而，其之於吾人對於內耳功能的瞭解，卻具有極大的貢獻(Battey, 2003; Steel et al., 2001)。較著名者，如吾人關於內耳中之「鉀離子再循環」(potassium recycling)(Wangemann, 2006)、內耳毛細胞中多種「非典型肌凝蛋白」(unconventional myosin)及其相關分子(Boeda et al., 2002; Verpy et al., 2000)、毛細胞纖毛(stereocilia)間連結之細微構造(Belyantseva et al., 2005; Frolenkov et al., 2004)、乃至於毛細胞與聽神經間之突觸與神經傳導機制(Roux et al., 2006)等等知識，有一大部分乃是建構於這些罕見致病基因的研究工作之上的。

(六) 遺傳性聽損基因之特色

由過去數年的文獻，吾人逐漸歸納出遺傳性聽損基因的一些特色，與其他疾病的基因有所不同：

1. 除極少數例外(Balciuniene et al., 1998; Bykhovskaya et al., 2000; Riazuddin et al., 2000)，絕大多數遺傳性聽損均由單一基因所造成，不論是症候群型或非症候群型，多由單一基因所造成。
2. 有些症候群，如 Usher 氏症候群及 Waardenburg 氏症候群之各亞型，雖然病人的「表現型」(phenotype)無法區分，卻可能是由多種不同基因所造成的。此種現象，稱為「基因異質性」(genetic heterogeneity)。
3. 反之，有一些基因，會依突變的不同而形成不同的表現型。如前述之 *SLC26A4* 基因，除了導致 Pendred 氏症候群，也可導致非症候群型遺傳性聽損。同理，不同的 *GJB2* 基因突變，也會分別以體染色體隱性(DFNB1)(Kelsell et al., 1997)、體染色體顯性(DFNA3)(Denoyelle et al., 1998)、或症候群型聽損(Vohwinkel's syndrome)(Maestrini et al., 1999)等不同的遺傳方式遺傳。

這些特色，都使得遺傳性聽損的研究較其他遺傳性疾病的研究更複雜。

(七) 結論

由於分子生物學的進步和人類基因體的解碼，最近數年來，學界對於導致遺傳性聽損的成因有了顯著的進展。至今已經發現約有四十多個基因與非症候群型聽損的發生有關(Hilgert et al., 2008)。就臨床研究者的角度而言，如何將此一基礎知識的進步應用到病人身上，可謂是最重要的工作。本文以為，要使近年來關於耳聾基因的相關知識達到臨床上的實用化，應該包含下列工作：

1. 遺傳性聽損的基因流行病學及分子病理學研究：

首先，應進行一大規模、完整的基因流行病學研究，以確定各耳聾基因及其突變在族群中的盛行率及重要性，方有助於之後基因檢測、遺

傳諮詢及預後評估等工作；同時，應釐清常見耳聾基因變異之致病機制，以助於吾人了解病人聽損發生之原因，進而針對該原因研擬治療方針。

2. 遺傳性聽損基因檢測之臨床應用：

將基因檢測的結果，直接應用於病人身上，以確定病人聽損發生的成因，俾於較準確地評估病人的預後以及預測家族中聽損的再發生率；同時，分析病人的基因變異是否會影響到臨床上各種治療的效果，以使帶有特定基因變異的病人，都能獲得較妥切的醫療。另外，亦應研發高效率低成本之聽損基因檢測工具，以使更多病人得以接受聽損基因檢測，並受惠於最新之醫學進展。

3. 動物研究模式之建立以及新型治療之研發：

對於遺傳性聽損致病成因的日益瞭解，也必將促進吾人於未來擬定及開發新的治療方式，如藥物治療、基因治療及幹細胞治療等治療方式，以減緩病人聽力之惡化，甚或根本地改善其聽力損失。然而，由於內耳構造精細、功能複雜，而且受損後修復能力有限，並無法直接於人體進行實驗，而細胞株研究之代表性極為有限，若欲研發新型治療方式，則亟須仰賴動物研究模式之建立。



第二部分：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

(一) 具有流行病學意義的常見耳聾基因及其突變

近幾年來的研究指出，有些耳聾基因突變，在大多數族群，或至少在特定的族群，具有較高的盛行率，這些耳聾基因包括：*GJB2* (*Cx26*)基因、*SLC26A4* (*PDS*)基因、粒線體 DNA 突變(12S rRNA 基因)、以及 *OTOF* 基因等，分別介紹於下：

1. *GJB2* (*Cx26*)基因

如前所述，在歐美等國針對高加索人種所做的研究指出，*DFNB1* 是遺傳性聽損的病人中，盛行率最高的基因座，故當 *DFNB1* 的候選基因 *GJB2* (*Cx26*)被發現後，學者亦開始檢測聽損病人 *GJB2* 的基因突變。果不其然，*GJB2* 的突變仍是遺傳性聽損最常見的基因缺陷：在 56%的法國病人 (Denoyelle et al., 1999)、35-42%的義大利及西班牙病人 (Estivill et al., 1998)、以及 40-58%的美國病人 (Green et al., 1999) 中，可以找到 *GJB2* 的基因突變。在這些高加索人種中，最常見的 *GJB2* 基因突變為 c.30delG (或稱為 c.35delG, 因為 30-35 由 6 個 G 組成)，約佔地中海沿岸 *GJB2* 突變的 85% (Denoyelle et al., 1999; Estivill et al., 1998)，以及美國 *GJB2* 突變的 70% (Green et al., 1999)。

GJB2 為製造 connexin26 分子的基因。Connexin 為細胞與細胞連接時，形成「間隙連接」(gap junction)的重要分子，存在於細胞膜上，可控制小於 1.2 kDa 的小分子來往於細胞之間 (Harris, 2001)。六個 connexin 可組成一組 connexon，鄰近的兩個細胞的 2 組 connexon 則形成一個「間隙連接」，而成為細胞質的連接管道。在耳蝸 (cochlea)，除了毛細胞 (hair cell) 和少數細胞外，幾乎所有表皮細胞 (epithelium) 和纖維細胞 (fibrocyte) 都可以找到 connexin26 蛋白的存在，因此一般認為 connexin26 在內耳主司鉀離子的運送及再循環 (Spicer et al., 1996)。惟最近亦有研究指出，connexin26 在內耳的重要功能亦包括訊息傳遞物質 Ins(1,4,5)P₃ 的運送 (Beltramello et al., 2005)。如果 connexin 的合成發生問題，則可能影響到細胞之間離子及物質的運送，進而影響到內耳的電生理，導致聽損。

在其他種族的研究中，雖然 *GJB2* 基因突變仍為非症候群型遺傳性聽損之一常見原因，然而，其突變型與盛行率卻與高加索人種有顯著差異。阿胥肯那吉猶太人 (Ashkenazi Jews) 中，最常見的 *GJB2* 突變為 c.167delT，而非 c.30delG (Morell et al., 1998)。而鄰國日本的研究則顯示，只有約 12-33% 的病人可找到 *GJB2* 的基因突變，而最常見的突變為也不是

c.30delG，而是 c.235delC (Abe et al., 2000; Kudo et al., 2000)。

在歐美針對 *GJB2* 基因突變所做的研究中，學者很快就注意到，約有 1/3 的病人，只能找到一個 c.30delG 的突變，而無法清楚解釋其體染色體隱性之遺傳模式 (Marlin et al., 2001)。後來則發現，原來很多這種病人的另一「對偶基因」(allele)上，帶有另一突變—「del(*GJB6*-D13S1830)」(del Castillo et al., 2002)。由於此一突變橫跨 *GJB6* (*Cx30*) 基因及微衛星基因標識 D13S1830 間約 342-kb 的片段，且極靠近 *GJB2* 之上游區域，因此學者推估此突變之致病機制可能有二：其一為藉由喪失 connexin30 之表現而以「雙基因」(di-genic)的方式遺傳〈按：connexin26 與 connexin30 可互相結合形成 connexon〉，其二則為喪失 *GJB2* 基因上游調控區域(upstream regulatory element)，而影響 *GJB2* 之第二個對偶基因之正常轉錄作用，進而形成體染色體隱性遺傳。晚近之一大規模研究顯示，似乎以第二說較為合理 (Snoeckx et al., 2005)。而後來的研究也指出，此一 del(*GJB6*-D13S1830)突變，是西班牙裔族群人口中僅次於 *GJB2* c.30delG 之第二常見突變。然而此一突變較少見於其他地區的高加索人種 (Del Castillo et al., 2003b)。

至於臨床表現型方面，根據過去數年的研究，學者們也逐漸歸納出帶有 *GJB2* 基因突變之病人的一些臨床表徵，包括病人之聽損多為習語前的中或重度聽損、聽損程度因人而異、有些病人的聽力可能會逐漸變差、以及病人顛骨影像學未合併異常等特徵 (Denoyelle et al., 1999)。最近歐美的研究則指出，帶有 c.30delG 同型合子突變 (homozygous mutation) 的基因型常伴隨著較差的聽力 (Cryns et al., 2004; Snoeckx et al., 2005)。

2. *SLC26A4* (*PDS*) 基因

SLC26A4 (*PDS*) 基因突變是歐美人種中，導致遺傳性聽損第二常見的原因 (Albert et al., 2006)。*SLC26A4* (*PDS*) 基因最早是於 1997 年被證實為導致症候群型遺傳性聽損—Pendred 氏症候群的致病基因 (Everett et al., 1997)。除了甲狀腺腫外，Pendred 氏症候群尚常會合併兩種常見的內耳畸形—「大前庭導水管」(enlarged vestibular aqueduct, EVA) 和「Mondini 氏發育不全」(Mondini's dysplasia)。後來則發現，在單獨只有大前庭導水管或 Mondini 氏發育不全，而未合併甲狀腺腫的病人，也可以找到 *SLC26A4* 基因的突變 (Li et al., 1998; Usami et al., 1999)。換言之，*SLC26A4* 基因突變，除了導致 Pendred 氏症候群，也會導致非症候群型遺傳性聽損。

SLC26A4 基因，或稱 *PDS* 基因，位於第 7 對染色體長臂上，由 21 個 exon 所組成。所製造的蛋白質為 pendrin，由 780 個胺基酸構成，分子量約 86 kDa，以 11 個 transmembrane domain 橫跨於細胞膜上 (Everett et al., 1997)。分類上，pendrin 是屬於 *SLC26A* (Solute Carrier Family 26A) 家族的蛋白質。這個家族的蛋白質尚包含幾個運送陰離子的蛋白質，如進行氯離子/碳酸根交換的 *SLC26A2*，以及運送硫酸根的 *SLC26A3* 等。在蛙卵

(*Xenopus oocyte*)及某些細胞株的實驗中，pendrin 被證實是一個陰離子的運輸蛋白，它可以運送碘離子、氯離子及重碳酸根離子(Gillam et al., 2005; Scott et al., 1999)。在老鼠的內耳中，pendrin 主要分佈於前庭導水管與內淋巴囊的表皮細胞，而 *Slc26a4* (*Pds*)「基因剔除鼠」(knock-out mouse)的研究，也證實了 *Slc26a4* 基因的喪失，的確也會導致老鼠內耳發育的畸形及重度聽損(Everett et al., 1999; Everett et al., 2001)。因此一般以為 pendrin 在內耳中主要還是扮演調節離子均衡與內淋巴的作用。對於 *SLC26A4* 基因突變導致內耳畸形的致病機轉，曾有人提出：內耳發育的過程中，pendrin 的功能缺失，致使膜性迷路中內淋巴壓力增加，在前庭導水管使得膜性迷路向外壓迫骨性迷路，進而造成大前庭導水管，而在耳蝸，則導致耳蝸不完全分隔，形成 Mondini 氏發育不全(Petit et al., 2001)。而關於聽力喪失的成因，最近則有研究指出，內淋巴及「血管紋」(stria vascularis)內之酸鹼失衡導致內耳鈣離子回收降低(Nakaya et al., 2007; Wangemann et al., 2007)，以及其所引發之自由基的產生及所伴隨之 Kcnj10 蛋白質產生減少(Singh et al., 2008)，乃至內耳局部甲狀腺功能之低下(Wangemann et al., 2009)，皆可能為導致 *SLC26A4* 基因突變聽覺喪失之重要因子。

帶有 *SLC26A4* 基因突變之病人的臨床特徵主要有二：其一為合併大前庭導水管或 Mondini 氏發育不全等兩種內耳畸形；其二則為波動性的聽力喪失(fluctuating hearing loss)，亦即聽力極易因外在因素如頭部撞擊而變差，也因此病人之聽損程度彼此之間也有很大差異。目前為止的研究並未能找出基因突變型與表現型之間的關連性，也就是說，我們無法由病人之 *SLC26A4* 基因突變型，精確地推測出病人是否會發生甲狀腺腫、影像學結果及聽力學結果等等。

3. 粒線體 DNA 突變

粒線體 DNA 突變可以導致症候群型遺傳性聽損，也可以導致非症候群型遺傳性聽損。前者以 m.3243A>G 突變最為常見，此突變發生在一 tRNA 的基因上，病人除聽損外，還會有糖尿病的症狀；後者則以 m.1555A>G 突變最為常見，此突變發生在 12S rRNA 的基因上(Fischel-Ghodsian, 1999)。由於遺傳性聽損以非症候群型為主，所以整體而言，仍是以 m.1555A>G 突變較為常見。

日本人的研究指出，高達 3%的遺傳性聽損人口帶有 m.1555A>G 的突變(Usami et al., 2000)。其聽力學特徵為習語後聽損。聽損情形在不同家族間、甚至同一家族的兄弟姐妹間存在著極大的差異，然而一般而言，聽損程度較其他遺傳性聽損輕微。聽力會隨著年紀而逐漸變差，聽力圖則顯示高頻聽力較易受影響(Usami et al., 1997)。而導致粒線體 m.1555A>G 突變家族內或家族間表現型的差異，則可能來自下列四個機制(圖二)：

(1) 粒線體基因體(mitochondrial genome)之「單套群」(haplogroup)：

粒線體基因體包含 16569 個「鹼基對」(base pair)，這些鹼基對中之任何變異，包括「突變」或「基因多型性」(polymorphism)，都有可能影響到 12S rRNA 之基因表現，導致家族內或家族間表現型的差異。

(2) 粒線體 1555A>G 突變之「同質」(homoplasmy)或「異質」(heteroplasmy)：人體中每個細胞都含有數百到數千個粒線體，而每個粒線體又含有 2 至 10 套的 DNA，若所有的 DNA 都相同，稱為 homoplasmy，反之，則稱為 heteroplasmy。根據過去文獻，粒線體 m.1555A>G 突變以 homoplasmy 突變為主，然而亦有報告指出，heteroplasmy 突變可見於某些家族，且與患病家族成員聽損程度之間，有相關性(del Castillo et al., 2003a)。

(3) 細胞核基因的影響：

過去的研究也證實，細胞核內的其他基因，也會影響細胞質內粒線體 12S rRNA 基因的表現(Guan et al., 1996; Guan et al., 2001)。因此，細胞核內的其他基因，也極有可能導致粒線體 m.1555A>G 突變家族內或家族間表現型的差異。

(4) 外在環境的影響：

如「胺基酸甘醣體」(aminoglycoside)類抗生素暴露的差異(Young et al., 2005)。有研究指出，發生 m.1555A>G 突變，會使得所製造的 12S rRNA 更易與胺基酸甘醣體這類的抗生素結合(Hamasaki et al., 1997)，而加重胺基酸甘醣體的耳毒性，易言之，病人聽力特別易受胺基酸甘醣體所傷害。

4. OTOF 基因

OTOF 基因，位於第 2 對染色體短臂上，由 48 個 exon 所組成，於 1999 年被發現是導致非症候群型遺傳性聽損 DFNB9 的致病基因(Yasunaga et al., 1999)。所製造的蛋白質稱為 otoferlin，主要分佈於內耳的內毛細胞，一般認為它在內耳的功能，與內毛細胞產生神經訊號時，胞內小囊與細胞膜融合的過程有關。

在西班牙裔非症候群型聽損人口中，約有 3.5%的病人，可以找到 *OTOF* 的基因突變，其中絕大多數為 c.2485C>T (p.Q829X)突變(Migliosi et al., 2002)。因此，c.2485C>T (p.Q829X)突變，是現在已知僅次於 *GJB2* 基因的 c.30delG 突變以及 del(*GJB6*-D13S1830)突變，西班牙裔人口中第三常見的耳聾基因突變(Rodriguez-Ballesteros et al., 2003)。

帶有 *OTOF* 基因突變的病人，其臨床特徵主要為「聽覺神經病變」(auditory neuropathy)。病人呈現先天性、重度之聽損，然而其「耳聲傳射檢查」(otoacoustic emission, OAE)卻呈陽性反應，這是此種病人最大之特徵。

(二) 國內遺傳性聽損之過去相關基因研究及其結果

1. 國人之 *GJB2* 基因突變光譜

在過去臺大醫院耳鼻喉部與基因醫學部針對國人所合作的研究中，我們發現，在國人先天性聽損病人中，約只有 14.8% 的患者顯現 *GJB2* 的突變，而其中以 c.235delC 最為常見(Hwa et al., 2003)，此點結果與日本人的研究類似(Abe et al., 2000; Kudo et al., 2001)，而歐美研究中較為常見的 c.30delG 及 c.del(*GJB6*-D13S1830)兩種突變，則均未見於國人。國內中山醫學大學的研究，也顯示類似的結果—只有 10% 的病人出現 *GJB2* 的基因突變(Wang et al., 2002)。相較於歐美的研究中，動輒 40-60% 的病患導因於 *GJB2* 的基因突變，國人遺傳性聽損人口中，則只有約 10-15% 的病人可找到 *GJB2* 的突變。這不禁讓我們思考，是否還有其他重要基因，導致國人遺傳性聽損。

附帶一提的是，本研究所探索的 *GJB2* 基因 p.V37I 變異，由於在國人的對照世代中對偶基因頻率高達 10% 以上，因此在前述國人的兩個報告中皆被報告為無致病性的基因多型性(polymorphism)，此點與國外報告不同，先以敘明。(→詳後述(四) 1. *GJB2* 基因變異)

2. 內耳畸形之流行病學研究

隨著影像儀器的進步，使得「內耳畸形」(inner ear malformation, IEM) 的診斷率大為提昇。歐美的研究即顯示，先天性聽損的患者中，約有 30% 合併內耳畸形，其中大前庭導水管約佔 15%，Mondini 氏發育不全佔 12%，此兩者可以說是內耳畸形中最為常見的兩種畸形(Antonelli et al., 1999)。而且許多證據也顯示，內耳畸形可由基因突變所造成(Anagnostopoulos, 2002; Li et al., 1998; Usami et al., 1999)。由於大多數的遺傳性聽損屬於非症候群型，無其他身體表徵可供辨識，因此以影像檢查結果作為表現型的分類基準，來研究遺傳性聽損，不失為一可行的切入點。於是，我們研究團隊於 2003 年起，即著手針對內耳畸形病人進行一系列之流行病學研究：我們回顧性分析臺大醫院於之前五年內，因為感覺神經性聽力損失接受顫骨高解析度電腦斷層掃描，並接受完整聽力檢查之 18 歲以下病人 160 例。結果發現，高達 37% 的聽損病童可發現內耳畸形，其中又以大前庭導水管、Mondini 氏發育不全、前庭擴大(large vestibule)及半規管發育不全(semicircular canal dysplasia)等四類畸形特別常見。由於此四類畸形經常合併出現且又分別位於四處不同之內耳解剖位置，而聽力學特徵亦具同質性，因此吾人以為其致病機轉可能雷同，並取此四種畸形之英文字首，而合稱之為「EMVS 複合畸形」(EMVS complex)(Wu et al., 2005b)。

3. 小結

綜觀在吾人進行本研究之前國內遺傳性聽損之相關研究，儘管陸續有些結果發表，但不難發現這些都是一個片段、一個片段的發現，很

難整理出一個全盤性的概觀。而這些結果也指出，常見的耳聾基因如 *GJB2*，國人呈現出不同於國外的突變光譜，再度證明了常見的遺傳性聽損基因及其突變因種族不同而異，也凸顯了建立國人本土資料的必要性。

(三) 當前國人遺傳性聽損基因流行病學所待進行之工作

1. 國人遺傳性聽損病人檢體庫之建立：

如上所述，由於常見的耳聾基因及突變常具有明顯的種族間差異，易言之，吾人臨床上並無法直接採用國外的研究結果，來作為遺傳諮詢的準則。若要提供病患及其家屬正確的資訊，顯然必須仰賴國人自己資料的建立。而以此一檢體庫為基礎，吾人日後亦可致力於新耳聾基因的找尋或其他研究。

2. 針對常見的耳聾基因及其突變，作一完整之盛行率的調查：

綜觀之前國內遺傳性聽損之相關研究，儘管陸陸續續有些結果發表，但卻都只是片片段段的發現，很難整理出一個完整的概觀。我們認為，唯有進行一大規模的遺傳性聽損之基因流行病學研究，方能釐清各耳聾基因突變之相對重要性，以解決當前研究的瓶頸。

3. 分析比較常見的基因型與表現型之間的關連性，以作為臨床評估之參考：歸納整理 *GJB2*、*SLC26A4* 及粒線體 DNA(12S rRNA 基因)等常見耳聾基因突變之臨床表現型，探討各基因型與表現型之間的關連性，並找尋會影響臨床表現的因子，以助吾人利用基因檢測結果來評估病人的預後。

4. 分析比較不同的病人來源，是否會影響遺傳性聽損基因流行病學的研究結果，以作為研究報告校正之基準：

文獻上關於聽損基因流行病學研究的報告，病人來源包括醫院、聽障學校及聽語復健中心等，由不同的病人來源所獲得聽損基因流行病學資料是否相同，並非毫無疑義。過去的研究也指出，以不同的納入標準收集病人，即使研究族群為同一種族，也會導致聽損基因流行病學研究結果的歧異 (Green et al., 1999; Lim et al., 2003)。因此，若能擴充基因檢體庫之病人來源，應該可以提供機會來檢視遺傳性聽損基因突變之機構間及地區間差異，並更精確地評估國人聽損基因流行病學之結果。

(四) 遺傳性聽損基因變異致病機制之釐清

除了研究基因流行病學資料之外，釐清遺傳性聽損基因變異之致病機制，也有助於吾人瞭解病人聽損之成因，進而研擬相對應之治療策略。如前揭說明，常

見之聽損變異雖已陸續報告於文獻，然其詳細之致病機制，則有待吾人進一步之探索：

1. *GJB2* 基因變異

雖然 *GJB2* 基因是文獻中報告最多之耳聾基因，然而有些變異之致病性，卻仍存有爭議。其中，吾人最感興趣的，當屬漢人最為常見之 p.V37I 變異。

GJB2 基因的 p.V37I (c.109A>G) 是東方人相當常見的基因變異，根據國人之前的研究，其「對偶基因頻率」(allele frequency) 在一般人中約為 11~12%，亦即，國人約高達四分之一的人口為此一變異之帶原者，因此以往一直被認為是一無致病性之「基因多型性」(polymorphism)(Hwa et al., 2003)。然而，邇近的研究指出，該一基因變異可能會以體染色體隱性的遺傳模式，導致輕度至中度的感覺神經性聽損(Dahl et al., 2006; Huculak et al., 2006; Snoeckx et al., 2005)。由於歐美高加索人種族群中，*GJB2* 基因 p.V37I 變異的對偶基因頻率不高，所以這些論文中所報告的 p.V37I 變異「同型合子」(homozygote) 之數目皆不多，臨床表現型之記錄也不完整。相對地，國人中此一基因變異的高盛行率，無疑提供我們一大利基，來釐清 *GJB2* 基因 p.V37I 變異之致病性及其於國人輕度至中度感覺神經性聽損病人間之盛行率，並整理其同型合子病人之臨床表現型。

2. *SLC26A4* 基因變異

如前揭說明，*SLC26A4* 基因突變係以隱性的遺傳模式導致 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管。然而，臨床上在相當比例的病人，吾人卻只能找到單一的 *SLC26A4* 基因突變，而且目前為止的研究也尚未能找出基因突變型與表現型之間的關連性。為了完整釐清基因因素所扮演的角色，則有待進一步之研究。

另一方面，帶有 *SLC26A4* 基因突變之病人臨床上所常見的急性波動性聽力喪失，也一直都是耳鼻喉科醫師必須經常面臨的難題。而由於其詳細機制不明，故關於此類波動性聽力喪失之處理，雖然有一些傳統的治療方式(如投與類固醇或降腦壓藥物)，然而皆欠缺確實之基礎醫學依據，以致於治療效果往往無法預期。此一部份，亦值深入探研。

3. 粒線體 12S rRNA 基因變異

如前揭說明，粒線體 12S rRNA 基因變異中，以 m.1555A>G 突變最為常見，而其臨床主要特徵，除了抗生素之耳毒性外，即屬家族內成員或家族間比較，表現型存在極大之差異。雖然 m.1555A>G 突變之盛行率，未如 *GJB2* 及 *SLC26A4* 之盛行率高，然而迥異於 *GJB2* 及 *SLC26A4* 等隱性基因突變，m.1555A>G 突變之患病家族，其成員患聽損者動輒以數人計，一旦遺傳下來，多數兄弟姊妹皆可能患病。此外，粒線體 m.1555A>G 是目前已

知的非症候群型遺傳性聽損突變中，唯一可以事前預防其聽力惡化的，亦即，只要針對帶有 m.1555A>G 突變之病人，避免其使用「胺基酸甘醣體」(aminoglycoside)這類的抗生素，就能夠預防病人聽力急速惡化，這也就是粒線體 m.1555A>G 突變臨床上之重要性及特殊性，而瞭解其致病機制，自然也成為臨床醫師刻不容緩的課題。

相對於 *GJB2* 及 *SLC26A4* 此二基因之突變，由於病例較多，相關發現已可被應用於遺傳諮詢及產前診斷之上。然而，針對病例較少的粒線體 m.1555A>G 突變，吾人目前則尚未能精確地評估病人的預後。由於粒線體 m.1555A>G 突變具其臨床上之重要性及特殊性，因此極富研究價值，若能深入探研其家族內或家族間表現型差異之原因，無疑將可彌補臨床上遺傳諮詢在這方面的缺口。

(五) 結論

遺傳性聽損基因及其突變，常因種族不同而存在著很大的差異，易言之，吾人臨床上並無法直接採用國外的研究結果，來作為遺傳諮詢的準則。若要提供病患及其家屬正確的資訊及診斷，顯然必須仰賴國人自行完成一大規模且完整的基因流行病學調查。而以此一檢體庫為基礎，吾人日後亦可致力於新耳聾基因的找尋或其他研究。

同時，一些常見耳聾基因變異之致病機制，諸如：*GJB2* 基因的 p.V37I 變異之致病性、*SLC26A4* 基因變異之基因型與表現型之關連性、*SLC26A4* 基因變異如何導致聽損、以及影響粒線體 m.1555A>G 突變臨床表現型之因素等，皆有待吾人釐清，以助於吾人了解病人聽損發生之原因，進而針對該原因研擬治療方針。

第三部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

(一) 遺傳性聽損基因檢測之一般臨床應用

1. 病人聽力預後之評估

基於過去幾年之臨床遺傳研究，特別是「基因型-表現型關連性」(genotype-phenotype correlation)方面的研究，目前我們已較能根據病人所帶有的基因突變類型，預測其預後。蓋基因的變異可以說是聽損發生最直接的證據，而藉由觀察並歸納以往的案例，我們發現同一種基因變異，其聽損的表現也類似。例如，帶有 *GJB2* 基因變異的個案，聽損的程度通常是不太惡化或惡化極慢的；而帶有 *SLC26A4* 基因變異的個案，臨床上則常合併大前庭導水管，以及反覆發作的波動型聽力喪失；而帶有粒線體 12S rRNA 基因變異的個案，聽損的程度則會隨著年齡增長而逐漸變差，尤其是若接觸到胺基酸甘醣體這一類的抗生素，聽力就會立刻變差。所以，如果能知道個案的基因診斷，就能夠知道往後聽力是否會繼續惡化。

2. 危險因子之避免

某些特定之遺傳性聽損，會因耳毒性藥物的暴露而急速惡化。最著名的，就是前述粒線體 12S rRNA 基因上 m.1555A>G 突變之胺基酸甘醣體耳毒易感性。因此，若病人檢測出帶有粒線體 12S rRNA 基因的 m.1555A>G 突變，我們會特別告知病人應特別注意胺基酸甘醣體之類的藥物，並發予可供病人隨身攜帶之小卡片(圖三)，以確實防止他科臨床醫師投與這些病人此類的藥物治療，杜絕其聽力之急遽惡化。

3. 產前診斷與遺傳諮詢

如同其他常見的遺傳性疾病，經由耳鼻喉部、婦產部及基因醫學部的跨科部合作，我們已可正確且迅速地完成遺傳性聽損之產前診斷。分別以施行羊水穿刺及絨毛膜取樣的方式，目前臺大醫院已順利完成數例聽損家族待生胎兒之基因檢測。易言之，藉由更精確地掌握病人之基因診斷，吾人對於遺傳性聽損之家族，已不再居於如過去般被動的角色，而僅能明示或默示其家屬利用結紮或其他節育措施，以避免生育出聽力損失之下一代。相反地，吾人可以主動地利用基因篩檢，檢測出其家族所帶有之基因突變，而當其家族成員再度懷孕時，利用羊水穿刺、絨毛膜取樣或其他方法，於產前為胎兒做出診斷，以提供其家族為決定時之參考。

4. 小結

如同其他遺傳疾病，過去幾年來遺傳性聽損的研究，也逐漸地被應用於臨

床醫學以幫助病人及其家屬，其要者悉如前述。惟吾人以為，根據我們過去幾年來聽損基因檢測所建立的資料及研究成果，若能結合其他領域醫學的較新進步，或許能從中找尋出聽損基因檢測新的臨床應用。

(二) 臨床新應用一：以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成效

1. 研究背景

「人工耳蝸」(cochlear implant, CI)植入手術近年來已被廣泛應用於治療助聽器效果不彰之重度聽損。然而，人工耳蝸相當昂貴（成本平均約80萬台幣）且植入手術本身具侵襲性，而術後不論是聽損兒童、家長還是聽語老師更要花費很長的時間並投入相當多的人力、物力進行聽語復健或聽能創建，但是，卻不是所有接受手術的案例都能獲得良好的成效。因此，找出預測其術後成效之指標，一直是臨床工作者所引頸企盼的。

2. 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成效之原理

目前已知，手術年齡、人工耳蝸使用期間、術前殘存聽力及影像學檢查結果與人工耳蝸之術後成效有關。其中，影像學檢查被認為有助於醫師術前篩選適當病例，特別是內耳畸形中的「內聽道狹窄」(narrow internal auditory canal, NIAC)，更是文獻上唯一確定之不良預後指標。然而，內聽道狹窄之病例於所有病人中僅佔極少數，而影像學結果又多偏重於形態之描述，無法提供精確的聽損致病成因。職此，尋找其他預測指標存在其實用性及必要性，而基因診斷，由於是病人聽損發生成因的直接線索，故可能為人工耳蝸植入手術術後聽語復健或聽能創建效果好壞的重要指標。

3. 文獻回顧

晚近確有若干研究報告以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成效，這些報告皆以 *GJB2* 基因突變為研究對象。其結果顯示，帶有 *GJB2* 突變的病人，接受人工耳蝸植入手術之後，均能獲得不錯之效益(Lustig et al., 2004; Sinnathuray et al., 2004a; Taitelbaum-Swead et al., 2006)。然而，常見耳聾基因變異，並非僅限於 *GJB2*，而這些研究報告，也往往只著重於基因檢測結果，而未能將會影響人工耳蝸植入手術預後的其他因子一併納入考量，故其所能提供的訊息相當有限。

3. 小結

以聽損基因檢測結果來預測人工耳蝸植入手術的術後成效，邏輯上雖然相當合理，但過去國外的研究，僅侷限於特定的基因—*GJB2*，且未同時考量其他的干擾因子，因此臨床上的應用相當有限。我們認為，應於病人進行所有已知常見耳聾基因的突變檢測，並同時考量其他預後因子，方

能提供一完整、通用的預測模式。

(三) 臨床新應用二：研發高效率低成本之基因診斷工具

1. 國內特發性感覺神經性聽損基因檢測之現況及困境

(1). 吾人現行的基因檢測方法

由於有多個常見的致病基因會導致國人特發性感覺神經性聽損，所以進行聽損的基因檢測時，必須同時兼顧臨床上較重要的幾個基因，方能減少遺漏，以求周全。因此，我們目前所採行的基因檢測方法，乃係使用 DNA「直接定序」(direct sequencing)的方法，於所有病人一次掃描三個國人常見的耳聾基因：*GJB2* (*Cx26*)基因、*SLC26A4* (*PDS*)基因及粒線體 12S rRNA 基因。對於特定表現型的病人如聽覺神經病變或 BOR 症候群等，本研究亦針對 *OTOF* 基因和 *EYAI* 基因等進行突變掃描。

吾人所掃描的 DNA 片段主要含括這些基因的所有 exon、以及 exon 與 intron 交界處會影響 RNA splicing 的序列。使用直接定序的優點是可以獲得整段完整的 DNA 序列資料。由於吾人開始進行國人聽損的基因檢測時，國人常見的基因突變尚屬未知，因此，使用此種可以獲得整段完整 DNA 序列資料的直接定序方法，是有其邏輯上之合理性及必要性的。

(2). 吾人現行基因檢測方法的缺點

以直接定序法進行基因檢測最主要的缺點是必須耗費大量的人力、物力及時間。如前所述，*GJB2* 基因包含 2 段 exons，*SLC26A4* 基因包含 21 段 exons，粒線體 12S rRNA 基因全長則包含約 1000 個鹼基對(mitochondria map position: 648-1601 b.p.)，姑且不論聽覺神經病變等其他特殊表現型的病人，光是一般病人，我們至少就需要進行約 25 次的 PCR 反應，以及其後的 PCR 產物純化與定序等工作，其中所耗費的人力、物力及時間不難推算。

2. 當前適合國人之基因檢測方法

若族群中基因突變主要分佈的位點已知，則吾人應可不必一一針對所有可能相關的 DNA 片段進行完整的序列掃描，而僅需針對這些常見或可能發生變異的位點加以檢測，即可為大多數病人完成基因診斷。由於國人 98%以上都是由漢人組成，且其中多數祖先源自華南地區，所以種族上的人口組成不若歐美人種那樣複雜。迄今為止，目前於國人所發現與特發性感覺神經性聽損有關的基因變異，不出 30 至 50 個位點。考量國內當前的現況並參考迄今為止的研究成果，本研究認為，以 SNaPshot 方法進行基因

檢測，應該是一個可行的辦法。(SNaPshot 技術之詳細原理見後→三、研究方法與材料、第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用、(二)研發高效率低成本之基因診斷工具)

3. 小結

我們目前採用 DNA 直接定序法進行聽損的基因檢測，固然能獲得完整的耳聾基因突變資料，然而實用上卻有耗費大量人力、物力和時間的缺點，致使此方法不易廣泛應用。然而此一由直接定序法所建立的資料庫，若佐以其他文獻資料，應有助於吾人研發高效率低成本的診斷工具，以推廣聽損的基因檢測。本研究認為，SNaPshot 基因檢測方法由於具有效率高、成本低、可輕易調整或擴增基因檢測的位點以及容易推廣等優點，可能是當前適合用來篩檢國人耳聾基因突變的好方法。

(四) 臨床新應用三：胚胎著床前聽損基因診斷

1. 胚胎著床前基因診斷之介紹

胚胎著床前基因診斷(pre-implantation genetic diagnosis, PGD)係以檢測體外受精胚胎之方式，來篩檢出未帶基因變異之胚胎，以植入母體。PGD 最早是在 1967 年由 Edwards 分辨出兔子胚胎的性別，並植入母體內懷孕成功，奠定此技術的基礎；而直到 1980 年代試管嬰兒之發展，加上基因序列聚合酶連鎖反應(PCR)使基因放大之技術純熟，促使 Handyside 等人於 1990 年發表世界上首例人類利用 PGD 成功植入懷孕的例子(Handyside et al., 1990)。他們首先刺激母體排出卵子，以人工體外受精的方式，使卵子受精發育成胚胎，受精卵在體外培養第一天分裂成兩個胚葉(blastocyst)，第二天會分裂成四至五個胚葉，第三天會分裂成七至八個胚葉，於八個胚葉中取出一個細胞，檢測此胚葉細胞。若此胚葉細胞之性染色體為 XX，再將同株其餘胚胎細胞植入母體，藉此可避免隱性性聯遺傳之疾病。

而隨著分子基因診斷技術之進步，今日 PGD 技術已非侷限於 X 染色體關聯之遺傳疾病，而已廣泛運用於其他單基因疾病之基因診斷，其中包括了肺囊泡纖維化(cystic fibrosis)、海洋性貧血(thalassemia)、視網膜母細胞瘤(retinoblastoma)、脊髓肌肉萎縮症(spinal muscular atrophy, SMA)、裘馨氏肌肉萎縮症(Duchenne muscular dystrophy, DMD)、范康尼氏貧血(Faconi anemia)、成骨不全(osteogenesis imperfecta)等等，而其中最常實施的疾病，則屬肺囊泡纖維化(cystic fibrosis)和海洋性貧血(thalassemia)(Spits et al., 2009)。

相較於其他產前診斷方式如「絨毛膜取樣」或「羊水穿刺」，胚胎著床前基因診斷毋庸以人工流產之方式中絕受孕之胚胎，故可作為患有遺傳

性疾病家族考量宗教、倫理等因素後之另一選擇。

2. 研究背景

過去數年來，胚胎著床前基因診斷(PGD)雖已成功應用於幫助許多患有其他單基因疾病之家族，然而其於遺傳性聽損之應用卻仍未見報告於文獻。由於經我們基因檢測的家族中，恰好有病人有此需求，故利用此一機會，吾人嘗試將 PGD 技術應用於遺傳性聽損病人，並研究此項技術於遺傳性聽損之可行性。且由於此為世界上第一例報告，相關之醫療倫理問題，亦一併討論之。

(五) 結論

如同其他單基因遺傳疾病，過去幾年來遺傳性聽損的研究，也逐漸地被應用於臨床醫學以幫助病人及其家屬。然而，從臨床研究者的角度觀之，吾人自不宜安於現狀、故步自封，而應致力於新臨床應用之研究或研發，以使更多病人得以受惠於基因醫學的新進步。而隨著我們對於耳聾基因變異的流行病學更精確的掌握，以及對於耳聾基因變異致病機制更深入的了解，若能結合其他領域醫學的較新進步，如內耳之人工耳蝸手術、基因定型技術、以及生殖科技等，應能從中研究出聽損基因檢測之臨床新應用。



第四部份：本研究之假設與目的

(一) 遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

1. 基因流行病學

(1). 本研究之假設

由於之前國外的基因流行病學顯示，常見的耳聾基因及突變具有明顯的種族間差異，而即使是黃種人，國人與日本人也不盡相同。因此，本研究認為，國人遺傳性聽損人口中，各常見耳聾基因突變所佔之比重，與國外不同，而唯有進行一大規模的遺傳性聽損之基因流行病學研究，方能針對此一問題提出解答，並建立一完整之本土資料庫，以供日後臨床工作者諮詢病人時做為參考。

(2). 本研究之目的

- a. 建立一龐大、本土的遺傳性聽損病人檢體庫，並根據病人的理學檢查、聽力學檢查、及影像學檢查適當地區分其表現型。
- b. 檢測國人遺傳性聽損人口中，各常見耳聾基因之盛行率，釐清它們之於國人遺傳性聽損的相對重要性。
- c. 歸納、整理並比較各常見基因突變之病人其臨床表現型(如聽力學特徵、預後等)之異同，釐清基因型表現型之間的關連性，以作為日後遺傳諮詢的參考。
- d. 分析比較不同的病人來源，是否會影響遺傳性聽損基因流行病學的研究結果，以作為研究報告校正之基準。

2. *SLC26A4* 基因變異及其致病機制

(1). 本研究之假設

- a. 臨床上相當比例的 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管病人，只能找到單一的 *SLC26A4* 基因突變，而且目前為止也尚未能找出基因突變型與表現型之間的關連性。本研究認為，可能有無法藉由當前之直接定序方法偵測出來之「隱藏突變」(hidden mutation)；同時，亦可能有其他基因因素，調控 *SLC26A4* 基因突變之臨床表現型。
- b. 若能培育出帶有 *SLC26A4* 基因突變之「基因置換鼠」(knock-in mouse)，將有助於我們瞭解 *SLC26A4* 基因突變導致聽損之致病機制。

(2). 本研究之目的

- a. 於帶有 *SLC26A4* 基因突變之病人，研究是否有未被偵測出來之

SLC26A4 基因隱藏突變；同時，探索是否有其他基因因素調控 *SLC26A4* 基因突變之臨床表現型，以俾助吾人臨床上基因診斷及遺傳諮詢等工作。

- b. 建立實驗動物模式，培育 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 及 p.H723R 變異之「基因置換鼠」(knock-in mouse)，記錄其聽力、平衡、內耳解剖及內耳生理之表現型，以釐清 *SLC26A4* 基因突變之致病機制。

3. GJB2 基因變異及其致病機制

(1). 本研究之假設

GJB2 基因 p.V37I 變異是國人相當常見的基因變異(高達五分之一的國人為此一變異之帶原者)，然而晚近的研究指出，該變異可能為一輕微突變，而與輕至中度感覺神經性聽損的發生有關。該變異是否具致病性，得藉由臨床基因研究、細胞株功能性基因研究、及實驗動物模式等研究方式確認之。

(2). 本研究之目的

- a. 檢測國人特發性感覺神經性聽損病人中，*GJB2* 基因 p.V37I 變異之盛行率，並以「基因型」(genotype)為病人分類，以釐清該變異與聽損研究程度之相關性。
- b. 歸納、整理 *GJB2* 基因 p.V37I 變異同型合子病人之臨床表現型，並釐清基因型與表現型之間的關連性，以作為日後遺傳諮詢的參考。
- c. 另利用吾人所建立之老年性聽損之研究世代，研究 *GJB2* 基因 p.V37I 變異是否與老年性聽損相關，以間接驗證 p.V37I 變異之致病機制。
- d. 於細胞株進行功能性基因研究，直接在細胞層級上，觀察 *GJB2* 基因 p.V37I 變異對於 connexin26 蛋白質表現及各種功能的影響。
- e. 建立實驗動物模式，培育 *Gjb2* 基因 p.V37I 變異之「基因置換鼠」(knock-in mouse)，以記錄其聽力學、內耳解剖學、及內耳生理學上之表現型，並檢視在各種導致聽力惡化的刺激條件之下(如噪音及藥物等)，轉殖鼠對於外在侵害的耐受性是否較對照組為差。

4. 粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制

(1). 本研究之假設

吾人認為，導致粒線體 m.1555A>G 突變家族內或家族間表現型的差異，不外來自下列四個機制：

- a. 粒線體基因體(mitochondrial genome)之「單套群」(haplogroup)
- b. 粒線體 1555A>G 突變之「同質」(homoplasmy)或「異質」(heteroplasmy)

- c. 細胞核基因的影響
- d. 外在環境的影響

(2). 本研究之目的

- a. 收集帶有粒線體 m.1555A>G 突變之家族，歸納、整理各家族之臨床表現型（如聽力學特徵、預後等）資料，並比較家族內及家族間其臨床表現型之異同，以作為日後與基因型比較之基礎。
- b. 分析各個家族基因型之異同，包括如上所述：粒線體基因體之單套群、粒線體 m.1555A>G 突變之同質或異質、以及細胞核內可能影響到粒線體表現的基因。
- c. 藉由分析比較基因型與表現型之間的相關性，找出導致粒線體 m.1555A>G 突變家族內或家族間表現型差異的原因。

(二) 遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

1. 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果

(1). 本研究之假設

基因檢測結果，代表著聽損發生最直接的成因及致病機轉，因此可為預測人工耳蝸植入手術術後聽語復健或聽能創建效果良窳的指標。

(2). 本研究之目的

研究病人之基因檢測結果是否與人工耳蝸植入手術術後成效有關，同時綜合考量其他預後因子，以建立一完整且精確的人工耳蝸植入手術術後成果預測模式。

2. 研發高效率低成本之基因診斷工具

(1). 本研究之假設

根據吾人先前的研究成果以及所建立的資料庫，應可研發一高效率、低成本的聽損基因診斷工具，以推廣聽損的基因檢測。

(2). 本研究之目的

- a. 研發一高效率、低成本的聽損基因檢測工具。
- b. 利用吾人現有的特發性感覺神經性聽損基因庫內之檢體，來校正此一診斷工具，以提高其靈敏度並確保其正確性。
- c. 建立一新的特發性感覺神經性聽損世代，以確認此一診斷工具的效力。
- d. 試行推廣此一高效率、低成本的聽損基因檢測工具，以期嘉惠國內為數眾多的聽損病人。

3. 胚胎著床前聽損基因診斷

(1). 本研究之假設

如同其他單基因遺傳疾病，胚胎著床前基因診斷亦可應用於遺傳性聽損。

(2). 本研究之目的

- a. 完成世界首例遺傳性聽損之胚胎著床前基因診斷。
- b. 分析以胚胎著床前基因診斷應用於遺傳性聽損病人所涉及之相關醫學倫理爭議。



三、研究方法與材料

第一部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

- (一) 遺傳性聽損之基因流行病學研究
- (二) *SLC26A4* 基因變異及其致病機制
- (三) *GJB2* 基因變異及其致病機制
- (四) 粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制

第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

- (一) 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果
- (二) 研發高效率低成本之基因診斷工具
- (三) 胚胎著床前聽損基因診斷



第一部分：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

(一) 遺傳性聽損之基因流行病學研究

1. 研究設計

本研究之設計為前瞻性的基因流行病學研究。

2. 材料與病人

本研究由醫院、啟聰學校或聽語復健機構，收集原因不明的「特發性感覺神經性聽損」(idiopathic sensorineural hearing impairment) 家族 800-1000 個，以作為本研究的「研究族群」(study population)。考量所欲研究的「目標族群」(target population)—亦即國內之全部遺傳性聽損病人人口，本研究認為，這是目前已知較為實際可行、且偏差較小的研究設計。

3. 研究方法與進行步驟

依據典型的基因研究之程序，包括定義疾病之表現型、確認病例、收集病例、收集 DNA 檢體、處理 DNA 檢體、基因定型(genotyping)、以及資料分析。施行步驟分述於下：

(1). 病例之確認與收集

關於疾病表現型的定義，本研究認為，所有非外因造成的、先天性或早發性聽損的病人，都是適合的研究對象。因此，本研究由北部、中部、南部的醫院、啟聰學校或聽語復健機構，篩選、收集此類家族 800-1000 個，此一選取病人的模式恰巧也提供吾人機會，以檢視常見的耳聾基因突變是否具機構間或地域間的差異。

病例的確認與收集之過程如下：每名個案，都由耳鼻喉科醫師親自進行訪談與檢查，以排除(1)胎內感染(2)出生體重小於 1500 公克(3)出生缺氧及使用呼吸器(4)黃疸指數過高(5)耳毒性藥物之使用(6)細菌性腦膜炎之病史(7)頭部外傷病史，其餘病人才納入本研究，以作為「研究族群」。

納入研究之病人均接受基本理學檢查，其重點為：(1)無顱顏面異常(2)耳鼻喉部正常(3)小兒神經學檢查正常(4)無心智功能異常，以區分其是否合併其他症候群。同時，也問取每位病人之詳細家族史，以確認其為「多病例家族」(multiplex family)或「單病例家族」(simplex family)，並儘可能採集「多病例家族」所有家族成員之血液檢體。若病人以前已在其他醫院有確立之診斷或有顱骨影像檢查結果，其資料

也將一併取得。病人聽損程度之判定，以「純音聽力檢查」(pure tone audiometry, PTA)之結果為準；然而對於無法配合進行純音聽力檢查之病人，則以「聽性腦幹反應」(auditory brainstem response, ABR)或「聽性穩態誘發反應」(auditory steady-state response, ASSR)判斷之。

(2). 檢體處理及常見聽損基因突變之檢測

個案填具同意書之後，進行血液檢體之收集與處理。DNA 的萃取是利用市售的基因抽取組(PureGene, Genra system)。本研究檢測三個常見的耳聾基因：*GJB2* (*Cx26*)基因、*SLC26A4* (*PDS*)基因及粒線體 12S rRNA 基因。簡單歸納實驗流程，針對一般病人的檢體，本研究所檢測的基因片段包括 *GJB2* 基因的 exon2 (此片段包含 *GJB2* 之全部 coding 區域)、*SLC26A4* 基因的 exon7-intron7-exon8 片段(此片段包含國人極為常見的 c.919-2A>G 突變)(Wu et al., 2005a; Yang et al., 2005)、以及包含粒線體 12S rRNA 基因全長(mitochondria map position: 648-1601 b.p.)的 DNA 片段；而若病人病史可追溯到波動性的聽力喪失或已確知為內耳畸形病例，則再進行整段 *SLC26A4* 基因共計 21 個 exon 的突變搜尋。所有 PCR 反應的引子(primer)和反應條件，均根據文獻記載 (Campbell et al., 2001; Hwa et al., 2003; Rieder et al., 1998)，這些反應條件，業已經本研究團隊驗證過確實可行，而目前亦皆為我們實驗室之常規檢查之一。

所有的 PCR 的產物以 agarose gel 電泳確定無誤後，以 PCR Purification Kit 純化，再以上述的引子當作定序引子(sequence primer)作直接定序。基因定序委託本院醫學研究部第二共同研究室進行分析，定序儀為 ABI 3730 Genetic Analyzer (Perkin Elmer-Cetus, Foster City, CA, USA)。所有發現之基因變異，皆再加做另一方向的分析，以確認之，並與各耳聾基因相對應之網域資料比較 (*GJB2*, Connexin-deafness Homepage, <http://davinci.crg.es/deafness/index.php>; *SLC26A4*, Pendred/BOR Home Page, <http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/>; 粒線體 12S rRNA, MitoMap, <http://www.mitomap.org/>)，以確認其是否為新變異。若該變異為錯義(missense)變異，則比較各物種之間，該胺基酸基是否演化上高度保留；若該變異為基因接合處(splice site)變異，則以線上軟體(Neural Network at Berkeley Drosophila Genome Project, www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)計算其 splice site score，以預測其對 RNA splicing 之影響。同時，亦比較 100 名之正常漢人對照組，以確認該變異是否為真實突變。

至本論文定稿時(2009 年 12 月)，本研究共為 991 個家族之初始受試者完成三段常見耳聾基因片段之突變檢測，共為 144 個家族之初始受試者完成整段 *SLC26A4* 基因之突變檢測。其間，因為陸續發表於國

外論文之故，各耳聾基因所相對應整理之家族數，並無法完全符合上述數目，合先敘明。

舉例言之，於「常見耳聾基因變異盛行率之調查」之研究(→四、結果，第一部分，(一))，由於發表時間較早，共整理 420 個家族；於「粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制」之研究(→四、結果，第一部分，(四))，由於發表時間亦較早，共完整分析 10 個帶有 m.1555A>G 突變之家族；於「*SLC26A4* 基因變異及其致病機制」之研究(→四、結果，第一部分，(二))，共分析 101 個 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族；於「*GJB2* 基因變異及其致病機制」之研究(→四、結果，第一部分，(三))，則分析共 732 個非症候群特發性感覺神經性聽損家族。

(3). 資料分析與表現型之比較

之後，評估各種常見耳聾基因突變於國人遺傳性聽損人口中之盛行率及其相對重要性。並根據病例是否帶有各基因突變，將病例加以區分別類之後，使帶有各基因突變的病人於門診接受進一步的檢查，以建立更完善的臨床表現型資料。本研究以「影像學檢查結果」(radiographic result)、「聽力損失形式」(hearing loss pattern)、「聽力圖圖形」(audiogram configuration)、以及「聽損程度」(hearing level)等檢查結果，來作為比較表現型的各項指標。我們的實驗室對於各項指標之分類及定義，均已有詳細之規範(Wu et al., 2005b)。

其後，歸納整理各常見基因突變之病人其臨床表現型之異同，並分析基因型與表現型之間的關連性，以作為日後遺傳諮詢的參考。

(4). 比較常見遺傳性聽損基因突變之機構間及地區間差異

最後，藉由比較(a)醫院病人與聽語復健機構病人之基因定型差異；(b)臺灣北、中、南區病人之間之基因定型差異，以更能趨近所欲研究的「目標族群」(target population)—亦即國內之全部遺傳性聽損病人人口中，耳聾基因之流行病學之正確資料。

(二) *SLC26A4* 基因變異及其致病機制

1. 研究設計

本部分研究之設計為前瞻性基因研究，共分為二部分：

- (1). 臨床基因研究。
- (2). 實驗動物模式之建立。

2. 材料與病人

- (1). 臨床基因研究：Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族。
- (2). 實驗動物模式之建立：培育 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 及 p.H723R 突變之「基因置換鼠」(knock-in mouse)。

3. 研究方法與進行步驟

(1). 臨床基因研究

a. *SLC26A4* 基因編碼區「缺失突變」(deletion mutation)之偵測

於僅帶單一 *SLC26A4* 基因突變或未帶突變之初始受試者，搜尋是否具 *SLC26A4* 基因編碼區之「缺失突變」(deletion mutation)。所使用之方法，係利用 SYBR-Green I，針對 *SLC26A4* 基因全部共 21 個 exons 進行 real-time PCR 反應(ABI 7700 PCR system, Foster, CA, USA)。Real-time PCR 反應的引子(primer)如研究方法附表一，反應條件則為 50°C (2 min)、95°C (10 min)、緊接 40 次循環之 95°C (15 sec) - 60°C (1 min) - 72°C (1 min)。Real-time PCR 反應之結果與聽力正常之對照組及同一病人之 β -actin 基因作比較，以計算 normalized ratio (*SLC26A4* amplicons / reference amplicon)。所有實驗皆經重複一次，以確認之。

b. 基因型與表現型之關連性

分析 *SLC26A4* 基因型與表現型的各項指標，包括影像學檢查結果、甲狀腺腫的存在、聽力檢查結果等之間的關連性。

c. *SLC26A4* 基因促進區(promoter)及 *FOXII* 基因之基因變異

於僅帶單一 *SLC26A4* 基因突變或未帶突變之初始受試者，檢測 *SLC26A4* 基因促進區(promoter)及 *SLC26A4* 基因的轉錄因子—*FOXII* 基因(MIM 601093)是否有突變。於 *SLC26A4* 基因促進區部分，本研究比較人類與其他物種於 *SLC26A4* 基因上游 3 kb 以內所相對應之「直系同源」(orthologous) DNA 片段，並找出兩段跨物種核苷酸同質性大於 50%的片段(研究方法附表二)，蓋此演化上高度同質性之 DNA 片段，可能於 DNA 轉錄作用具重要影響，而使核苷酸變異成為影響基因功能的突變。本研究所比較之物種包括人類 [human, accession no.: NT_007933, chromosome 7: 107085316- 107146090]、恆河猴 [macaque, chromosome 3: 145079111- 145137936]、乳牛 [cow, chromosome 4: 41143193-41076270]、小鼠 [mouse, accession no.: NT_039548, chromosome 12: 32248140- 32202300]和大鼠[rat, chromosome 6: 49431055-49386806] (Ensembl, www.ensembl.org/index.html)。而於 *FOXII* 基因，則針對其兩段 exons 直接定序。

d. 單套型分析

為了尋找 *SLC26A4* 基因「隱藏突變」之可能位置，本研究分析「未被偵測出突變之 *SLC26A4* 對偶基因」之單套型。單套型之基因定型，乃針對 *SLC26A4* 基因附近之單一核苷酸多型性變異(SNP)，進行直接定序。

(2). 實驗動物模式之建立

「基因置換鼠」(knock-in mouse)的培育，本研究係與台灣大學「基因體醫學國家型計畫基因轉殖鼠核心實驗室」合作，該實驗室在轉殖與基因剔除鼠技術方面已有良好的基礎，並已成功培育出各種實驗鼠發表於國際知名雜誌(Lin et al., 2009; Yu et al., 2004)。本研究培育 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 及 p.H723R 突變基因置換鼠的進行步驟，臚列如下：

- a. 設計並構築含抗生素篩檢基因之 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 或 p.H723R 突變之基因替換質體(plasmid construct)：本研究所設計的 plasmid construct 如圖四所示。
- b. 以電擊法(electroporation)的方法，將質體送入「胚胎幹細胞」(embryonic stem cell)。
- c. 以抗生素(neomycin)及「南方點墨法」(southern blotting)篩選胚胎幹細胞。
- d. 將胚胎幹細胞植入代孕母鼠。
- e. 「嵌合鼠」(chimera mouse)的產製：由代孕母鼠所生產之子代鼠即為嵌合鼠。
- f. 由嵌合鼠與野生小鼠交配，預計經兩代之交配後，即可淨化復育為帶雙套 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 或 p.H723R 突變之基因置換鼠。

培育出基因置換鼠後，本研究自其出生之後，以「耳聲傳射檢查」(otoacoustic emissions, OAE)、「聽性腦幹反應檢查」(auditory brainstem response)及 rotorod 平衡檢查，詳細記錄其聽力及平衡覺表徵。同時，記錄其內耳解剖學、組織學及生理學上之表現型，以釐清 *SLC26A4* 基因突變之致病機制。內耳組織學檢查主要係利用 H&E 染色及 confocal 螢光顯微鏡來觀察細胞型態及 *Slc26a4* 基因所製造的蛋白質—pendrin 在內耳分佈的位置及表現。

(三) *GJB2* 基因變異及其致病機制

1. 研究設計

本部分研究之設計為前瞻性基因研究，共分為三部分：

- (1). 臨床基因研究。
- (2). 於細胞株之功能性基因研究。
- (3). 實驗動物模式之建立。

2. 材料與病人

- (1). 臨床基因研究：經基因診斷確定帶有 *GJB2* 基因 p.V37I 變異之特發性聽損病人、老年性聽損研究世代。
- (2). 於細胞株之功能性基因研究：HeLa 細胞。
- (3). 實驗動物模式之建立：培育 *Gjb2* 基因 p.V37I 變異之「基因置換鼠」(knock-in mouse)。

3. 研究方法與進行步驟

(1). *GJB2* 基因 p.V37I 變異與特發性感音性聽損

a. 對偶基因頻率、病人基因型分佈與家族樹分析

以聽損程度區分特發性聽損病人為不同組別，比較輕至中度聽損病人、重度至極重度病人與聽力正常對照組之間，*GJB2* 基因 p.V37I 變異之對偶基因頻率以及病人基因型分佈(genotype distribution)，是否有所不同。同時，亦進行家族樹分析(segregation analysis)，檢視 *GJB2* 基因 p.V37I 變異是否臨床上與家族成員之聽損表現型一同出現。

b. 單套型分析

基因定型 p.V37I 變異附近的若干「單一核苷酸基因多型性」(SNP)，以決定 p.V37I 變異附近之單套型，進而分析是否於 p.V37I 變異附近有「連鎖不平衡」(linkage disequilibrium)之真實突變。

c. 基因型與表現型之關連性

歸納整理 *GJB2* 基因 p.V37I 變異同型合子病人之臨床表現型(如聽力學特徵、預後等)，並釐清基因型與表現型之間的關連性

(2). *GJB2* 基因 p.V37I 變異與老年性聽損

a. 案例收集與表現型區分

2009 年 1 月止，本研究由台大醫院健康管理中心及大林慈濟醫院耳鼻喉科共收集 40 至 80 歲無明顯噪音暴露史或其他耳疾之受試者計 1005 名。所有受試者除接受完整的問卷調查以詢問其生活習慣及疾病史之外，亦接受標準的聽力檢查，並將其聽力閾值轉換成年齡性別皆標準化之 Z-scores (Fransen et al., 2004)。根據低、中、高不同頻率，分別計算病人優耳之 Z_{low} (0.25、0.5、1 kHz Z-scores 之平均)、 Z_{4-tone} (0.5、1、2、4 kHz Z-scores 之平均)與 Z_{high} (2、4、8 kHz Z-scores

之平均)。

b. 基因定型與分析

採集受試者的血液檢體、抽取 DNA 後，使用 PCR、SNaPshot 等技術，檢測這些受試者的 *GJB2* 基因編碼區所存有之基因多型性 (polymorphism)。本研究由 SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) 選取七個位於 *GJB2* 基因編碼區且漢人常見之突變或基因多型性變異進行分析，包括 c.235delC、c.299_300delAT、c.109G>A (p.V37I, rs72474224)、c.79G>A (p.V27I, rs2274084)、c.341A>G (p.E114G, rs2274083)、c.368C>A (p.T123N) 以及 c.608T>C (p.I203T) 等。其後，以各音頻之 Z score 及聽力閾值區分受試者為實驗組 (即聽力最差之 1/3，共 335 人) 與對照組 (即聽力最佳之 1/3，共 335 人)，於校正其他與老年性聽損有關的干擾因子後，比較兩組間 *GJB2* 基因變異分佈之差異。

(3). 於細胞株之功能性基因研究

目前文獻上，被報告可應用於研究 connexin26 基因變異在細胞層級功能的細胞株包括 *Xenopus oocyte* (Skerrett et al., 2004; White et al., 1998)、Sf9 細胞 (Oshima et al., 2003)、Cos-7 細胞 (Oguchi et al., 2005) 以及 HeLa 細胞 (Martin et al., 1999; Thonissen et al., 2002) 等。近幾年來，Fabio Mammano 及其團隊利用 HeLa 細胞成功地建立一套研究模式，可完整評估 *GJB2* 基因變異對於 connexin26 蛋白質功能的影響 (Beltramello et al., 2005; Beltramello et al., 2003; Bicego et al., 2006; Piazza et al., 2005)。本研究採用該研究模式，使用 HeLa 細胞株來研究 *GJB2* 基因 p.V37I 變異對於 connexin26 蛋白質表現及功能之影響：

a. 「基因選殖」 (gene cloning)：

本研究選用 pIRES2-AcGFP1 質體 (圖五) 進行基因選殖。以 PCR 大量複製分別帶「野生型」 (wild type) *GJB2* 基因序列及帶 p.V37I 變異 *GJB2* 基因序列的 DNA 片段後，以限制酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 處理，使該二複製之 DNA 產物嵌入 pIRES2-AcGFP1 質體，之後植入該質體於 *E. coli* 中。

b. 「轉染」 (transfection) 至 HeLa 細胞：

由 *E. coli* 萃取帶有野生型 *GJB2* 基因及 p.V37I 變異 *GJB2* 基因的質體，轉染至 HeLa 細胞，由於 pIRES2-AcGFP1 質體包含 GFP 基因，轉染成功後將使 HeLa 細胞發出螢光。

c. 以「西方點墨法」 (Western blotting) 及「螢光研究」 (fluorescent study)，確定 *GJB2* 基因在 HeLa 細胞的表現：

根據我們之前的研究，HeLa 細胞並不會表現 connexin26 蛋白質，因此以西方點墨法及免疫螢光染色方法所偵測到的 connexin26 蛋白

質，應由轉染入之質體所表現而來的。藉由比較轉染野生型 *GJB2* 基因質體及轉染 p.V37I 變異 *GJB2* 基因質體的 HeLa 細胞中 connexin26 蛋白質的表現量，可得知 p.V37I 變異是否會在「量」的方面影響 *GJB2* 基因的表現。

- d. 比較野生型和帶 p.V37I 變異的 *GJB2* 基因在 HeLa 細胞所表現的蛋白質，功能是否有所不同：

本研究根據文獻的方法(Bicego et al., 2006)，比較兩組細胞株細胞間 Lucifer Yellow 的運送，檢視 p.V37I 變異是否會在「質」的方面影響 *GJB2* 基因的表現。

- e. 小結：

簡單整理本部份於細胞株之功能性基因研究之流程於圖六。本研究藉由基因選殖及轉染等技術，分別建立帶野生型 *GJB2* 基因質體及帶 p.V37I 變異 *GJB2* 基因質體的 HeLa 細胞株後，再比較兩組間 connexin26 蛋白質「量」和「質」的差異，以釐清 p.V37I 變異對於 *GJB2* 基因表現的影響。

(4). 實驗動物模式之建立

培育 *Gjb2* 基因 p.V37I 變異基因置換鼠的進行步驟，臚列如下：

- a. 設計並構築含抗生素篩檢基因之 *Gjb2* p.V37I 變異基因替換質體 (plasmid construct)：本研究所設計的 plasmid construct 如圖七所示。
- b. 以電擊法(electroporation)的方法，將質體送入「胚胎幹細胞」(embryonic stem cell)。
- c. 以抗生素(neomycin)及「南方點墨法」(southern blotting)篩選胚胎幹細胞。
- d. 將胚胎幹細胞植入代孕母鼠。
- e. 「嵌合鼠」(chimera mouse)的產製：由代孕母鼠所生產之子代鼠即為嵌合鼠。
- f. 由嵌合鼠與野生小鼠交配，預計經兩代之交配後，即可淨化復育為帶雙套 *Gjb2* 基因 p.V37I 變異之基因置換鼠。

培育出基因置換鼠後，自其出生之後，以「耳聲傳射檢查」(otoacoustic emissions, OAE)及「聽性腦幹反應檢查」(auditory brainstem response)，詳細記錄其聽力表徵。若記錄到類似人類之輕至中度感覺神經性聽力損失，則給予各種導致聽力惡化的刺激，如噪音及藥物，以觀察轉殖鼠對於外在侵害的耐受性是否較對照組為差，進而釐清其致病機制並尋找預防或治療其聽力惡化之方法。

(四) 粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制

1. 研究設計

前瞻性臨床基因研究：經由分析粒線體 m.1555A>G 突變之家族成員之基因型與表現型之間的相關性，本研究希望能夠找出導致 m.1555A>G 突變家族內或家族間表現型差異的原因，並以此提供未來預後評估及遺傳諮詢的依據。

3. 材料與病人

經基因診斷確定之粒線體 m.1555A>G 突變之家族

3. 研究方法與進行步驟

(1). 粒線體基因體之「單套群」(haplogroup)之基因定型

於每一帶有粒線體m.1555A>G突變之家族，至少選取兩名病例，以檢測其粒線體基因體之單套群。本研究根據文獻，將粒線體基因體中共16569個鹼基對，分為24段DNA片段，再針對此24段DNA片段，分別進行PCR反應，再定序之(Rieder et al., 1998)。定序方法同上述。根據這16569個鹼基對之序列，吾人即可決定各家族粒線體基因體之單套群。

(2). 粒線體m.1555A>G突變「同質」(homoplasmy)或「異質」(heteroplasmy)之基因定型

針對所有帶有粒線體m.1555A>G突變之家族成員，檢測其m.1555A>G突變之「同質」(homoplasmy)或「異質」(heteroplasmy)。檢測方法參考文獻(Prezant et al, 1993)並簡述於下：以5'-CGATCAACCTCACCACCTCTT-3'及5'-GACAACCAGCTATCACCAGG-3'兩段PCR反應引子，來flank一段包含m.1555A>G之800個鹼基對的DNA片段。再以*BsmAI*限制酶與所產生的DNA片段產物反應，若具m.1555A>G突變之「同質」(homoplasmy)，則此800個鹼基對的DNA片段將不被切割，電泳跑膠可見1個band；若無m.1555A>G突變，則此800個鹼基對的DNA片段將被切割，電泳跑膠可見2個bands。若為「異質」突變，則部份DNA可被切割，部份DNA不被切割，而使電泳跑膠可見3個bands。以ethidium bromide染色後，即可以laser densitometry測量band的亮度，而定量出突變之「異質」程度。

(3). 細胞核內可能影響到粒線體表現的基因之基因定型

細胞核內可能影響到粒線體12S rRNA表現的基因，根據過去之研究目前較為確定的有*GJB2*基因(Abe et al., 2001)及*TRMU*基因(Accession No. 060476)(Yan et al., 2005)。因此，本研究亦針對所有帶有粒線體m.1555A>G突變之家族成員，進行*GJB2*基因及*TRMU*基因的變異掃描。*GJB2*基因於染色體上之位置及其於內耳之功能如前所述。*TRMU*

基因位於第22對chromosome的q arm上，由11段exon所組成，所製造的蛋白質為 tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyl transferase 1，具421個胺基酸，由於此蛋白質會修飾粒線體的tRNA，進而影響到粒線體中蛋白質之製造，故會導致粒線體12S rRNA表現的變化(Umeda et al., 2005)。本研究採取直接定序方法進行*TRMU*基因的變異掃描，其PCR條件如研究方法附表三。

(4). 基因型與表現型之相關性

最後，比較基因型(包括粒線體基因體之單套群、粒線體m.1555A>G突變之heteroplasmy程度以及細胞核內之*GJB2*基因和*TRMU*基因)與表現型(各家族成員之聽損程度及各家族之外顯率[penetrance])之間的相關性，找出導致粒線體m.1555A>G突變家族內或家族間表現型差異的原因。



第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

(一) 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果

1. 研究設計

本研究之設計為「前瞻性、觀察性世代研究」(prospective, observational cohort study)。

2. 材料與病人

研究的世代為接受人工耳蝸植入手術的病童，分析比較各預後因子(包括基因檢測結果、手術年齡、人工耳蝸使用期間、術前殘存聽力及影像學檢查結果等)對於人工耳蝸植入手術術後聽能創建效果好壞的影響。

3. 研究方法與進行步驟

(1). 病例收集：

將接受人工耳蝸植入手術並至少經三年聽能創建的病童納入本研究。所有病童均接受術前殘存聽力、顛骨高解析度電腦斷層掃描、基因檢測及術後語音聽知覺檢查等評估。

(2). 基因檢測：

不同於以往的研究，本研究針對 *SLC26A4*、*GJB2* 及粒線體 12S rRNA 等三段常見耳聾基因，都進行突變掃描。突變掃描的方法如前述。

(3). 語音聽知覺檢查：

所有病童於接受至少三年的聽能創建後，均接受「語音聽知覺檢查」(auditory speech perception performance)，以評估人工耳蝸植入手術術後成效。整套語音聽知覺檢查包括「閉鎖式中文語音辨識測驗」(closed-set Mandarin speech recognition tests)及「開放式中文語音辨識測驗」(open-set Mandarin speech recognition tests)。病人若能完成閉鎖式及開放式語音辨識測驗，吾人即認為其於術後獲得理想之成效。同時，病人的語音聽知覺表現，以五個指標：子音(consonant)、母音(vowel)、聲調(tone)、單字(word)及字組(sentence)的辨識率來表示，以進行分析比較。此一中文系統之語音聽知覺檢查已經本研究團隊使用多年，其信度及效度俱已經驗證(Fu et al., 2004; Liu et al., 2000)。

[註：閉鎖式語音辨識測驗係指在有視覺線索下進行語音辨識測驗，開放式語音辨識測驗則指在無視覺線索下進行語音辨識測驗，故以後者所需之語音聽知覺技巧較高]

(4). 資料分析：

分析基因檢測結果、影像學檢查結果以及其他因子對於人工耳蝸術後

成效的影響。同時綜合考量所有因子，建立一「廣義線性模式」(general linear model, GLM)，以評估在其他因子均受控制下，單一因子與人工耳蝸術後成效的關連性。對於人工耳蝸植入手術案例中，手術技巧最為困難且術後成效最難預測的內耳畸形病例，本研究也特別分析基因檢測結果與術後成效的關係。

(二) 研發高效率低成本之基因診斷工具

1. 研究設計

本部分研究之設計為前瞻性的技術研發，吾人希望藉由逐步完成下列四大部分的工作，達成新基因檢測技術研發及推廣之終極目標：

- (1). 高效率、低成本的聽損基因檢測工具的研發。
- (2). 聽損基因檢測工具的「驗證」(validation)：利用吾人現有的特發性感覺神經性聽損基因庫內之檢體及其所帶之已知突變，校正此一診斷工具，以提高其靈敏度並確保其正確性。
- (3). 確認此聽損基因檢測工具的效力：應用所研發之檢測工具於一新的特發性感覺神經性聽損世代，以確認此一診斷工具的效力。
- (4). 聽損基因檢測工具的推廣。

以下就此四大部分之研究方法、進行步驟及執行進度，詳細論述於下。

2. 研究方法與進行步驟：

(1). 高效率、低成本的聽損基因檢測工具的研發

本研究使用 SNaPshot 此一基本技術，設計一套可同時檢測約 20-40 個耳聾基因突變位點的檢測方法。SNaPshot 基因檢測使用 SNaPshot™ kit (ABI)，同時於多個突變位點進行 multiplex PCR 反應後，利用 primer extension 技術，藉由電泳位差或螢光顏色分析其核苷酸之變異。步驟詳述於下：

A. 耳聾基因突變位點的選擇

基於「成本」(cost)與「效益」(effectiveness)的考量，本研究認為一個好的聽損突變篩檢工具應兼具迅速、低成本與完整性等特點。因此雖然文獻上報告過的耳聾基因突變以數百計，實際上絕大部分是「不會」或「極少」出現於國人的，這些突變或許極具學術上的研究興趣，但是一個以實用為目的的基因檢測工具應該可以不必包含這些突變位點的掃描。易言之，本研究僅需針對國人「可能」出現的突變位點設計檢測工具即可。因此，本研究耳聾基因突變位點的選擇標準主要有下列兩點：

- a. 國人所曾發現與非症候群型聽損有關之基因突變，包括 *GJB2* 基因突變(Hwa et al., 2003; Wang et al., 2002)、*SLC26A4* 基因突

變(Wu et al., 2005a)、粒線體 12S rRNA 基因(Wu et al., 2007)、*OTOF* 基因突變(unpublished data)與 *KCNQ4* 基因突變(Su et al., 2007)。

- b. 曾經出現於兩個以上東亞聽損家族的基因突變，蓋若該突變曾於東亞的「種族背景」(ethnic background)出現兩次以上，則就有可能出現於國人的聽損家族。這一部份，本研究參考日本(Tsukamoto et al., 2003)、韓國(Park et al., 2003)及大陸(Wang et al., 2007)的文獻資料。

B. Multiplex PCR 反應

根據本研究所選擇的耳聾基因突變位點，設計 PCR 反應的引子(primers)。設計多組 PCR 反應的引子(primers)使其 PCR 產物(product)能包含這些位點。加入待測檢體的 DNA 進行 multiplex PCR 反應後，將產生多段 PCR 產物，此即圖八上圖之 template，而藍色 C 則代表待掃描的基因變異位點。本研究使用這些引子，測試及調整 multiplex PCR 反應的條件，以求每次的 multiplex PCR 反應均能包含 10 個左右位點的掃描。

B. Primer extension 反應

本研究根據所選擇的耳聾基因突變位點及其 multiplex PCR 的反應產物，設計 primer extension 反應的引子(primers)，這些引子將在 5' 端接上不同長度的 T 核苷酸(T-tail)，以使不同基因突變位點所對應的 primer extension 產物長度不同(圖八下圖)，而使 1 個 SNaPshot 反應可同時分析 10 個突變位點。而每一個基因變異位點的位置上，則靠螢光顏色分析究竟是何種核苷酸。詳細言之，本研究加入 primer extension 反應的引子使其與 multiplex PCR 所產生的多段 templates 結合後，使用標示不同螢光的 ddATP、ddTTP、ddGTP 和 ddCTP 以進行 single base extension (SBE)反應，則由於不同核苷酸變異所對應的產物帶不同顏色的螢光，故能以定序儀分析辨別之。

D. 以定序儀進行序列分析

Primer extension 的產物，送本院醫學研究部第二共同研究室，以定序儀進行分析，定序儀為 ABI 3730 Genetic Analyzer。之後即可分析及處理基因定型的資料。

(2). 聽損基因檢測工具的驗證

由於過去幾年來，吾人已建立一個國人特發性感覺神經性聽損的基因檢體庫，而經由直接定序的方法，這些 DNA 檢體所帶的突變都已確定。本研究使用所研發的 SNaPshot 基因檢測工具檢驗由此基因檢體庫所選取的檢體，以確認這 20-40 個突變是否可以被本研究所研發的

檢測工具正確地診斷出來。經由此一流程，本研究可校正此一診斷工具，以提高其靈敏度並確保其正確性。進行步驟條列如下：

- i. 突變點選取：選取帶某一突變的檢體。
- ii. 基因檢測：以所研發的 SNaPshot 基因檢測工具檢測該檢體。
- iii. 修正基因檢測工具：若該突變無法由現行的檢測工具偵測出來，則修改 SNaPshot 測試條件，直到能正確偵測為止。
- iv. 重複 i → iv 的步驟，逐步上修 SNaPshot 基因檢測工具的靈敏度及正確率。

(3). 確認聽損基因檢測工具的效力

任何新檢測工具於研發後、推廣前，尚須經由效力確認的步驟，析言之，必須先將其應用至一個與未來待檢測人口類似的研究族群，以評估該檢測的診斷力及其所帶來的效益。而由於本研究所研發的 SNaPshot 基因檢測工具，不論是突變位點的選擇或是檢測工具的驗證，都是根據吾人之前所建立的聽損世代，因此用原有的聽損世代來評估此一檢測工具的效力，必然會產生誤差。最適當且合邏輯的方法乃是重新構築一個新的特發性感覺神經性聽損世代，然後應用本研究所研發的檢測工具於此一新的聽損世代，以確認 SNaPshot 基因檢測工具的效力。同時，由於可為此一新研究世代的聽損病人完成基因診斷，所以並無浪費人力或物力之虞。

本研究根據現有的病例收集模式，由北部、中部、南部的醫院、啟聰學校或聽語復健機構，篩選、收集 200 個非外因造成的、原因不明的感覺神經性聽損家族。根據吾人的經驗，這 200 個家族中估計約有 60 至 100 個家族，可由本研究所新研發的基因檢測工具掃描出基因變異，因此應足夠使吾人確定此一基因檢測工具的效力。其後，分析此 200 個聽損家族中，有多少家族可由此基因檢測工具診斷出帶有基因變異。其與傳統使用直接定序法所得之資料，亦將作一比較，以確認新基因檢測工具相較於傳統檢測工具的「敏感性」(sensitivity)與「特異性」(specificity)。

(4). 聽損基因檢測工具的試行推廣

本研究徵求 4-5 間國內其他有意願進行聽損基因檢測意願之醫療機構，提供技術的移轉。由於 SNaPshot 基因檢測方法需使用定序儀判讀資料，因此參加的醫療機構必須具備 DNA 定序儀，不過 DNA 定序儀目前乃是一被廣泛使用的儀器，所以此一門檻應不難達到。最後，評估廣泛推廣本研究所研發基因檢測工具的可行性。

(三) 胚胎著床前聽損基因診斷(Pre-implantation genetic diagnosis,

PGD)

1. 臨床評估與遺傳諮詢

針對帶有耳聾基因突變之家族進行完整的臨床評估。於徵得病童父母之要求與同意、並於詳細的遺傳諮詢之後，本研究為該家族進行胚胎著床前基因診斷。

2. PGD 進行流程

簡言之，整個流程主要包含二步驟：研發單一細胞 c.919-2A>G 突變點檢測技術，以及臨床 PGD 療程(即人工受孕結合胚胎診斷及植入)。本研究首先以 GenomiPhi technology 和 primer extension mini-sequencing 等方法，針對由此病童及其父母週邊血液所取得之淋巴球，研發並校正單一細胞 c.919-2A>G 突變點檢測技術。詳細方法及材料如文獻記載(Chen et al., 2008)，於茲不贅。

其後，以人工生殖技術，誘導排卵並進行體外受精，於胚胎培育成八細胞期時，進行胚胎切片以作單一細胞基因診斷。篩選後，將正常胚胎植入母體子宮(圖九)。

3. 產前檢查及新生兒聽力篩檢

於產前適當時期，本研究為胎兒進行絨毛膜取樣，以確認其基因型。於出生後，本研究再以 DPOAE 及自動聽性腦幹反應檢查(automated auditory brainstem response, AABR)檢測嬰兒，以排除其聽力異常之情形。

四、結果

第一部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

- (一) 常見耳聾基因變異盛行率之調查
- (二) *SLC26A4* 基因變異及其致病機制
- (三) *GJB2* 基因變異及其致病機制
- (四) 粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制
- (五) 結論

第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

- (一) 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果
- (二) 研發高效率低成本之基因診斷工具
- (三) 胚胎著床前聽損基因診斷
- (四) 結論



第一部分：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

(一) 常見耳聾基因變異盛行率之調查

1. 總家族數及資料分析流程

本研究一共前瞻性收集超過 900 個特發性感覺神經性聽損家族、合計 1900 多名病例，並完成所有病例之表現型評估及基因定型。本研究分析比較所有病例之「家族史」、「過去病史」、「理學檢查」、「聽力檢查結果」及「影像檢查結果」，以作表現型之區分；而基因定型部分則如前所述，本研究針對 *GJB2* (*Cx26*)、*SLC26A4* (*PDS*) 及粒線體 12S rRNA 等三段常見之耳聾基因進行突變掃描。另外，針對前 150 個家族，本研究亦掃描國外曾被報告為「非罕見」之基因變異，包括 *GJB6* (*Cx30*)、粒線體 m.3243 及粒線體 m.7445 等點位，然而由於皆未發現基因變異，故其後並未納為本研究常規之聽損基因檢測。

對於特殊病例，如聽覺神經病變 (auditory neuropathy)、branchio-oto-renal (BOR) 症候群、Usher 氏症候群及 Alport 氏症候群等，本研究亦分別針對特定的基因，即 *OTOF* 基因、*EYAI* 基因、*USH2A* 基因及 *COL4A5* 基因等進行突變檢測。

至本論文定稿時(2009 年 12 月)，本研究共為 991 個家族之初始受試者完成三段常見耳聾基因片段之突變檢測，共為 144 個家族之初始受試者完成整段 *SLC26A4* 基因之突變檢測。其間，因為陸續發表於國外論文之故，各耳聾基因所相對應整理之家族數，並無法完全符合上述數目，先予敘明。

舉例言之，於「常見耳聾基因變異盛行率之調查」之研究(→四、結果，第一部分，(一))，由於發表時間較早，共整理 420 個家族；於「*SLC26A4* 基因變異及其致病機制」之研究(→四、結果，第一部分，(二))，則分析共 101 個 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族；於「*GJB2* 基因變異及其致病機制」之研究(→四、結果，第一部分，(三))，分析共 732 個非症候群特發性感覺神經性聽損家族；於「粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制」之研究(→四、結果，第一部分，(四))，由於發表時間亦較早，共完整分析 10 個帶有 m.1555A>G 突變之家族。

本研究先於 2007 年整理 420 個聽損家族之基因流行病學資料，以釐清國人耳聾基因流行病學之概觀。此 420 個家族初始受試者(proband)之基本資料如表一所示，本研究依基因別、病例收集來源、以及地區分布，分析比較耳聾基因變異之盛行率及分布，其結果臚列於下。

2. 耳聾基因的突變

於此 420 個家族之 420 位初始受試者中，三段常見耳聾基因的基因變異如表二所示：

(1). *SLC26A4* 基因

420 位初始受試者中，共有 90 位可歸類為 Pendred 氏症候群或非症候群型大前庭導水管。以基因型而言，90 位初始受試者中，47 名可找到 2 個 *SLC26A4* 基因突變(i.e. homozygous + compound heterozygous)，27 名可找到 1 個突變(i.e. heterozygous)，16 名則未發現任何突變。

本研究共發現 10 處突變：c.230A>T (p.K77I)、c.919-2A>G、c.1001+5G>C、c.1115C>T (p.A372V)、c.1160C>T (p.A387V)、c.1229C>T (p.T410M)、c.1343C>T (p.S448L)、c.1489G>C (p.G497R)、c.2162C>T (p.T721M)及 c.2168A>G (p.H723R)，其中 c.230A>T、c.1001+5G>C、c.1160C>T、c.1343C>T 與 c.1489G>C 為未曾報告於文獻之新突變，而 c.919-2A>G (IVS7-2A>G)則是國人最常見之突變，佔所有突變之 84%，顯示國人 *SLC26A4* 基因之突變光譜，與國外明顯不同。

[註：高加索人種中，較常見的 *SLC26A4* 基因突變為 p.L236P (16%)、p.T416P (15%)及 c.1001+1A>G (14%)(Campbell et al., 2001)；而日本人最常見的 *SLC26A4* 基因突變則為 p.H723R (53%)(Tsukamoto et al., 2003)]

(2). *GJB2* 基因

於 *GJB2* 基因本研究亦發現多處「對偶基因變異」(allele variant)，其中以 c.109G>A (p.V37I)最為常見，然而其致病性仍有待釐清(→見後(三)*GJB2* 基因變異及其致病機制)。以確定的突變而言，以 c.235delC 最為常見。而以基因型而言，420 位初始受試者中，計 11 名為 c.235delC 突變之同型合子(homozygote)，16 名為帶有一 c.235delC 突變與其他 *GJB2* 基因變異之複合異型合子(compound heterozygote)。

(3). 粒線體 12S rRNA 基因

420 個初始受試者中，共有 12 個初始受試者帶有粒線體 12S rRNA m.1555A>G 突變，4 個初始受試者帶有粒線體 12S rRNA m.961delT+C(n)變異(致病性仍未確定)。檢查 12 個帶有 m.1555A>G 突變之家族，計近 50 位家族成員帶有 m.1555A>G 突變；4 個帶有粒線體 m.961delT+C(n)變異之家族，則計有 20 位家族成員帶有 m.961delT+C(n)變異。至於其他國外曾經報告過、已被確認之 12S rRNA 突變，如 m.1494C>T 等突變(Young et al., 2005; Zhao et al., 2004a; Zhao et al., 2004b)，則未見於本研究所收集之國內家族。

(4). 帶有兩種基因變異之初始受試者

若不考慮國人相當常見之 *GJB2* 基因 p.V37I 變異，則此 420 個初始受試者中，帶有 *SLC26A4* 基因變異之病人，並未同時檢測出帶有 *GJB2*

基因突變或粒線體 12S rRNA 基因突變者；帶有粒線體 12S rRNA 基因突變之病人，亦未同時檢測出帶有 *GJB2* 基因突變或 *SLC26A4* 基因突變者。然而，於一 *GJB2* 基因 p.V37I 變異同型合子之初始受試者，則檢測出帶有一 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 變異，惟由於該名病人並未具內耳畸形，故吾人認為其病因較可能為 p.V37I 變異同型合子所致，*SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 變異可能僅為偶然帶因而已。

3. 耳聾基因突變盛行率的比較

如表三所示，以確定的耳聾基因突變而言，最常見者為 *SLC26A4* 之 c.919-2A>G 突變，其在本研究之聽損世代中的「對偶基因頻率」(allele frequency)為 12.1%，遠較 *GJB2* 之 c.235delC 突變的 4.5%為高。若合併計入其他的突變，*SLC26A4* 突變在聽損病人之盛行率，亦較 *GJB2* 突變高。而粒線體 m.1555A>G 突變於國人聽損人口的對偶基因頻率則相對較低，約為 2.9%。

附言者為，本部份研究並未直接比較各分組間病人基因型(genotype)分佈之差異，蓋同一基因之變異種類繁多，若以病人基因型統計之，則分組數將會極多，而使各分組中人數較少，統計上不易得顯著之發現，故改以各分組間耳聾基因突變盛行率(allele frequency)之比較取代之。於耳聾基因突變盛行率分組比較具差異之 *SLC26A4* 突變，則再進一步比較其基因型分佈之差異(見下述：4. 病人來源對於基因流行病學研究結果的影響、表四)。

關於國人各耳聾基因病人之基因型分佈，另將於其後關於各基因及其致病機制部分詳述之，於茲不贅。

4. 病人來源對於基因流行病學研究結果的影響

420 個聽損家族中，325 個家族由醫院收集，其他 95 個家族則收集自聽語復健中心。由表三可見，醫院的聽損家族中 *SLC26A4* 基因突變的對偶基因頻率較聽語復健中心的聽損家族高(16.2% vs. 8.4%, Chi-square test, $p < 0.05$)，其他耳聾基因突變的對偶基因頻率，兩組間則未有顯著差異。若比較 *SLC26A4* 基因型的分佈，兩組間亦存在顯著差異(表四)。進一步比較聽力學特徵，可知兩組間「聽力損失形式」(hearing loss pattern)以及「聽損程度」(hearing level)並不相同(表五)。而「羅吉斯迴歸」(logistic regression)分析則證實，此一聽力學特徵的歧異，是導致醫院及聽語復健機構間 *SLC26A4* 基因型分佈差異的重要因子(表六)。

另外，比較台灣北區、中區和南區的資料則未見有地區間之差異(data not shown)。

5. 小結

簡而言之，此部分之研究，提供吾人瞭解國人耳聾基因流行病學大致

之輪廓，也證實了來自不同機構的病人，由於其聽力特徵亦不相同，將導致基因流行病學研究結果的歧異，因此在報告耳聾基因流行病學的研究結果時，必須將所由收集病人的來源標示清楚，方為精確，並有助於不同研究間之比較(Wu et al., 2008b)。

(二) *SLC26A4* 基因變異及其致病機制

1. 基因變異與表現型

(1). *SLC26A4* 基因變異

隨著我們研究團隊病例之累積，本研究於 2009 年共分析整理 101 個 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族之 *SLC26A4* 基因變異[註:包含前述 420 個家族中之 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族，以及其後加入新收集之家族]。若以基因型區分，則 101 個家族的初始受試者中，共 37 名為 c.919-2A>G 突變之同型合子(homozygote)，1 名為 p.T410M 突變之同型合子，1 名為 p.H723R 突變之同型合子，24 名為帶有二不同突變之複合異型合子(compound heterozygote)；21 名為帶有僅單一 c.919-2A>G 突變之異型合子(heterozygote)，3 名為僅帶有其他單一突變之異型合子。簡之，101 個家族的初始受試者中，63 名(62%)可找到 2 個 *SLC26A4* 基因突變，24 名(24%)可找到 1 個突變，14 名(14%)則未發現任何突變(表七)。

基因定序之結果如表八所示，本研究於國人共發現 17 個位於 *SLC26A4* 基因編碼區(coding region)的基因變異，包括 11 個錯義突變(missense mutation)、2 個無義突變(nonsense mutation)、1 個移碼突變(frameshift mutation)以及 3 個基因接合處突變(splice site mutation)。

其後，本研究利用 real-time PCR 之方法，針對該 38 名找到 1 個突變或未發現任何突變之初始受試者，搜尋是否具 *SLC26A4* 基因編碼區之「缺失突變」(deletion mutation)，結果顯示 38 名初始受試者於 *SLC26A4* 基因全部共 21 個 exons 之 normalized ratio (*SLC26A4* amplicons / reference amplicon)皆位於 0.92 – 1.08 之間，而未帶有基因編碼區之缺失突變。

(2). 最常見 *SLC26A4* 基因變異—c.919-2A>G 突變之起源

在本研究所發現的 *SLC26A4* 基因變異中，c.919-2A>G (IVS7-2A>G) 突變遠較其他突變常見，約佔所有突變之 76.7%。歸究其因可能有二：一為源自「起始者效應」(founder effect)；二為源自「好發點突變」(hot spot mutation)。而檢視此突變點附近之「DNA 標識」(DNA markers)，適可為此問題提供一清楚之解答。

為釐清此一問題，本研究針對 16 名帶有兩個 c.919-2A>G 對偶基因

(亦即同型合子突變)之初始受試者以及帶有一個 c.919-2A>G 對偶基因(亦即異型合子突變)之初始受試者,進行進一步之分析(表九)。本研究應用 PCR 反應與 DNA 直接定序之方法,來「基因定型」(genotype)此 32 名初始受試者 c.919-2A>G 突變點附近之 4 個「次要等位基因頻率」(minor allele frequency, MAF) > 0.1 的「單一核苷酸多型性變異」(single nucleotide polymorphism, SNP): JST160568、JST089508、JST160566 及 JST160565 (Japanese Science and Technology Agency, JSNP database: <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>)。此 4 個單一核苷酸多型性變異與 c.919-2A>G 突變點之相對位置,由 5' 至 3' 端分別為: JST160568 — 2186bp — c.919-2A>G — 215bp — JST089508 — 1998 bp — JST160566 — 79bp — JST160565。同時,選取 50 名聽力正常無聽損家族史之自願受試者,以作為對照組。

基因定型的結果顯示,16 名同型合子突變之初始受試者,於 JST160568、JST089508、JST160566 及 JST160565 等四處顯現出獨特之基因型(Fisher's exact test, all $p < 0.001$) (表九)。而統計由此 4 個單一核苷酸多型性變異及 c.919-2A>G 突變所組成的「單套型」(haplotype),則發現 16 名初始受試者合計 32 條染色體中,30 條染色體(94%)的單套型是相同的(圖十),顯示所有病人之 c.919-2A>G 突變可能來自共同的祖先,並驗證了此一突變之起始者效應(Wu et al., 2005a)。

(3). 基因型與表現型之關連性

接下來,本研究統計分析 *SLC26A4* 基因型與表現型的各項指標(包括影像學檢查結果、甲狀腺腫的存在和聽力檢查結果等)之間的關連性。就基因型之分類而言,本研究將基因型就其所檢測出之基因變異數先予區分為帶單一突變(i.e. heterozygous)之初始受試者與帶有二突變(i.e. homozygous + compound heterozygous)之初始受試者;而就帶有二突變者,則因文獻有載,同為隱性遺傳之耳聾基因 *GJB2*,其基因型之分類應依其突變性質(如 truncating 突變或 missense 突變)加以區分,較具實益(Snoeckx et al., 2005),本研究從之。

如表十所示,初始受試者之內耳畸形種類、甲狀腺腫之有無、聽損程度和聽力圖形,與 *SLC26A4* 基因型之間,並無顯著相關。而由於帶有單一突變之初始受試者,其臨床表現型與帶有二突變者無差異,且該單一突變於家族成員中與臨床表現型一同出現,故本研究認為帶單一突變初始受試者其另一染色體上可能具有「隱藏突變」(hidden mutation),而非透過「表型模擬」(phenocopying, 亦即帶有單一突變之初始受試者為偶然帶因者)或「單套缺失」(haploinsufficiency)等機制,導致疾病發生。然而,亦不能排除其他「調節基因」(modifier gene)作用之可能。

(4). *SLC26A4* 基因促進區(promoter)及 *FOXII* 基因之基因變異

由於前揭發現，本研究認為帶單一突變或未帶突變之初始受試者應具「隱藏突變」，故進一步搜尋 *SLC26A4* 基因促進區(promoter)及 *SLC26A4* 基因的轉錄因子—*FOXII* 基因是否有突變。結果顯示，除於一家族發現一個位於 *SLC26A4* 基因促進區之變異—c.-2554G>A 外，本研究於其他家族並未發現 *SLC26A4* 基因促進區或 *FOXII* 基因之突變(表十一)。 *SLC26A4* 基因促進區之 c.-2554G>A 變異雖非為演化上高度保留之核苷酸(圖十一 b)，但於家族樹分析中，與 p.G497R 突變分別位於不同染色體上，而與聽損表現型一同出現(圖十一 a)，故不能排除其致病性。

(5). 單套型分析

為了尋找 *SLC26A4* 基因「隱藏突變」之可能位置，本研究分析「未被偵測出突變之 *SLC26A4* 對偶基因」之單套型。如前揭說明，由於帶有 c.919-2A>G 突變之染色體其單套型相同，故本研究只需以基因定型之方式，確定 21 名 c.919-2A>G 突變異型合子病人之「雙套型」(diplotype)，即可推知這些病人另一「未被偵測出突變之 *SLC26A4* 對偶基因」之單套型。本研究共選取 8 個「次要等位基因頻率」(minor allele frequency, MAF) > 0.03 之單一核苷酸多型性變異：rs#2248464 (intron 2)、rs#2248465 (intron 2)、rs#2712212 (intron 6)、rs#3839817 (intron 6)、rs#2395911 (intron 8)、rs#2072064 (intron 10)、rs#2072065 (intron 10)和 rs#2301634 (intron 19)，以決定 *SLC26A4* 對偶基因之單套型。如表十二所示，於 21 個未被偵測出突變之 *SLC26A4* 對偶基因，共分布有 9 種單套型，且其頻率均小於 0.2，可知若有「隱藏突變」位於 *SLC26A4* 基因之 intron 上，則突變點之分布應非集中於一點或特定數點(Wu et al., 2009b)。然其確切位置則有待日後進一步研究。

(6). 小結

本部分研究顯示，*SLC26A4* 基因突變是國人 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管，唯一已知、但亦是最重要之基因因素。國人大前庭導水管病人，高達八成以上可歸因於 *SLC26A4* 之基因突變所致。因此本研究建議，國內大前庭導水管病人皆應接受 *SLC26A4* 基因之突變檢測，以確定病因，並利於其後之預後評估及治療。

2. 動物模式之建立

(1). 基因置換鼠 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之聽覺及平衡覺表徵

目前本研究已於 C57BL/6 (B6) 之小鼠株，成功培育出帶有 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變之同型合子(homozygous) 基因置換鼠 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 及異型合子(heterozygous) 基因置換鼠

Slc26a4^{+/*tm1Dontuh*}，並完成聽性腦幹反應檢查(auditory brainstem response, ABR)，以記錄其聽力表徵。結果如圖十二所示，*Slc26a4*^{*tm1Dontuh/tm1Dontuh*}小鼠之聽性腦幹反應檢查在 120 分貝刺激下，完全沒有聽力的波型表現，而呈現極重度之聽損。異型合子(heterozygous)基因置換鼠 *Slc26a4*^{+/*tm1Dontuh*} 則呈現正常聽力，可見其遺傳模式應與人類相同而為隱性遺傳。

行為觀察顯示基因置換鼠 *Slc26a4*^{*tm1Dontuh/tm1Dontuh*} 中約 45%可觀察到歪頭(head-tilting)及繞圈圈(circling)之行為模式(圖十三 A)。在 rotorod 試驗可以發現 *Slc26a4*^{*tm1Dontuh/tm1Dontuh*} 小鼠呈現較差之平衡能力，特別是具繞圈圈(circling)行為模式之小鼠，其於 rotorod 試驗尤差(圖十三 B)。

(2). 基因置換鼠 *Slc26a4*^{*tm1Dontuh/tm1Dontuh*} 之解剖及組織學變化

基因置換鼠 *Slc26a4*^{*tm1Dontuh/tm1Dontuh*} 之解剖構造變化，於肉眼下即可觀察到前庭導水管擴大(圖十四 C)。在光學顯微鏡下，亦可觀察到內淋巴囊(endolymphatic sac)擴大(圖十四 D)，同時呈現內淋巴水腫(endolymphatic hydrops)(圖十五 B)、毛細胞退化(圖十五 D)及耳蝸之血管紋(stria vascularis)變薄(圖十五 F)。Confocal 螢光顯微鏡可觀察到內耳毛細胞有退化的現象發生(圖十六)，不過 pendrin 在內耳分佈的位置及表現上並未顯示明顯差異(圖十七)，足見其致病機制係由於蛋白質功能異常所致，而非起因於缺乏蛋白質。

(三) *GJB2* 基因變異及其致病機制

1. *GJB2* 基因 p.V37I 變異與特發性感覺神經性聽損

此一部分之研究流程簡單整理於圖十八，本研究先依聽力程度分組，比較各組間對偶基因頻率與病人基因型分佈之差異，同時進行家族樹分析，以先釐清 p.V37I 變異與特發性感覺神經性聽損之相關性，其後，進行單套型分析與突變點掃描，並整理 p.V37I 變異之表現型，以研究該變異是否為真實突變、及其致病機制：

(1). 對偶基因頻率、病人基因型分佈與家族樹分析

至 2009 年 1 月，一共 732 個非症候群特發性感覺神經性聽損家族納入本研究[註：包含前述(一)中 420 個家族]。所有家族皆為漢人血統。依據 GENDEAF 建議之準則，356 位初始受試者之聽損程度為重度至極重度，另 376 位則為輕度至中度聽損。同時，另選取 1005 名無聽力主訴之健檢病人，以為對照組。

p.V37I 在「重度至極重度組」、「輕度至中度組」及「對照組」之對偶基因頻率(allele frequency)分別為 12.8%、30.3%及 9.2%(表十三，chi-square test, $p < 0.001$)。「輕度至中度組」中，高達 77 (20.5%)名初始

受試者為 p.V37I 同型合子(homozygote)，亦遠高於由對照組頻率(0.092)所推估而來的期望值(表十四，chi-square goodness-of-fit test, $p < 0.001$)。

本研究共於 56 個 p.V37I 同型合子家族完成家族樹分析(segregation analysis)。一般而言，p.V37I 同型合子變異與家族成員聽損之表現型一同出現，然亦有 p.V37I 同型合子病人表現接近正常之聽力者(圖十九，病人 II-5)。

(2). 單套型分析與突變點掃描

本研究共於 86 位 p.V37I 同型合子之 172 條染色體完成附近 SNP 點位之基因定型，結果顯示 172 條染色體均為同一單套型。為了排除 p.V37I 變異並非真實突變，而係其附近另有一與之形成連鎖不平衡之真實突變導致聽損，本研究進一步於 *GJB2* 基因促進區(promoter)及其上游之 *GJB6* 基因(圖二十)進行突變點搜尋，然均未找到其他突變點。

(3). 基因型與表現型之關連性

歸納整理此 86 名 p.V37I 同型合子之臨床表現型，顯示其聽力學表徵呈現多重樣貌，聽損形式可為穩定或逐漸變差，但一般而言較為輕微，而聽力圖型則可為高音漸傾型或平坦型(表十五)。值得注意的是，半數以上(67%)的病例聽力呈現逐漸惡化，其中部分病例其發病年齡甚至晚至青春期之後，使得其臨床表徵與其他疾病(如自體免疫耳疾等)不易區分。如圖二十一所示之「複合聽力圖」(composite audiogram)，與另一常見之 *GJB2* 基因 c.235delC 突變相較，p.V37I 同型合子臨床上顯然表現較輕之聽損表徵。

2. *GJB2* 基因 p.V37I 變異與老年性聽損

(1). 比較實驗組與對照組基因型與單套型分布

1005 名受試者之基本資料如表十六所示。進一步分析顯示，不論以 Z_{low} score、 $Z_{4\text{-tone}}$ score 或 Z_{high} score 區分受試者，實驗組與對照組之間均無年齡或性別分布之差異(表十七)。而本研究所檢測 *GJB2* 基因各變異點位，於以 Z_{low} score、 $Z_{4\text{-tone}}$ score 及 Z_{high} score 所區分出對照組，亦皆處於哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)。

GJB2 基因各變異點位於實驗組與對照組之基因型分布如表十八所示。於以 Z_{low} score 及 $Z_{4\text{-tone}}$ score 所區分之實驗組與對照組，p.V37I 的之基因型分布呈現顯著差異(Fisher's exact test, $p = 0.014$ & $p = 0.043$, respectively)，特別是 p.V37I 同型合子基因型使該案例低頻聽力及中頻聽力較差之勝算比(odds ratio, OR)更分別高達 6.0 (95% CI, 1.3-27.1)和 5.7 (95% CI, 1.3-25.9)。進一步分析亦顯示 *GJB2* 基因單套型分布與老年性聽損亦具相關(表十九)。

(2). Z scores 與基因型

為釐清 p.V37I 變異與聽損程度之關係，本研究直接比較各 p.V37I 變異基因型之 Z_{low} score、 $Z_{4\text{-tone}}$ score 及 Z_{high} score。如表二十所示 p.V37I 同型合子之 Z_{low} score、 $Z_{4\text{-tone}}$ score 及 Z_{high} score 均顯著較另二基因型受試者高(Analysis of variance [ANOVA], post hoc test with the Tukey multiple comparison procedure, all $p < 0.001$)。而於以「羅吉斯迴歸」(logistic regression)校正其他干擾因子後，p.V37I 基因型仍與聽力呈現顯著相關(表二十一)。

3. 於細胞株之功能性基因研究

(1). 西方點墨法及螢光研究

將帶有野生型 *GJB2* 基因及 p.V37I 變異 *GJB2* 基因的 pIRES2-AcGFP1 質體，分別轉染至 HeLa 細胞後，以西方點墨法(Western blotting)比較二者蛋白質之表現，結果顯示野生型 *GJB2* 基因與 p.V37I 變異 *GJB2* 基因於蛋白質之表現並無差別(圖二十二 A)。然而，於轉染野生型 *GJB2* 基因之 transient HeLa 細胞株間，可觀察到由 connexin26 蛋白質所形成漂亮之 gap junction plaque(圖二十二 B 左圖箭頭)，而於轉染 p.V37I 變異 *GJB2* 基因之 HeLa 細胞間(圖二十二 B 右圖箭頭)，則較少形成明顯之 gap junction plaque。(註：平均計算 5 個螢光視野)

(2). 染料運送研究(dye transfer test)

為檢視 p.V37I 變異是否會在質的方面影響 *GJB2* 基因的表現，本研究比較轉染不同基因之細胞株細胞間 Lucifer Yellow 的運送。如圖二十三所示，以 scrape dye transfer 的方式，進行 Lucifer Yellow 的運送比較。初步結果顯示，p.V37I 變異 *GJB2* 基因之 HeLa 細胞間，Lucifer Yellow 的運送較野生型略差。惟進一步之確認，則有待利用本研究所培育之基因置換鼠 *GJB2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 進行 in vivo 的研究(Chang et al., 2008)。

4. 實驗動物模式之建立

目前本研究已於 C57BL/6 (B6)之小鼠株，成功培育出帶有 *GJB2* 基因 p.V37I 變異之同型合子基因置換鼠 *Gjb2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}，並完成聽性腦幹反應檢查。初步結果顯示，p.V37I 變異同型合子基因置換鼠 *GJB2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之聽力閾值變異大，有些為不正常(圖二十四 A 圖上)，有些則為正常(圖二十四 A 圖下)。平均值略較異型合子基因置換鼠及野生鼠高，但具統計學上顯著差異，可見其遺傳模式亦與人類相同而為隱性遺傳(圖二十四 B)。*Gjb2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 內耳組織學上未見明顯變化(圖二十五)。惟由於 *Gjb2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠目前仍在大量繁殖中，詳細之聽力表徵、以

及解剖、組織與生理變化，須待繁殖後方能作進一步的研究。

(四) 粒線體 12S rRNA 基因變異及其致病機制

1. 粒線體 m.1555A>G 突變於國人特發性感覺神經性聽損家族之盛行率及其臨床表徵

於本研究聽損世代 900 餘個特發性感覺神經性聽損家族中[註：包含前述(一)中 420 個家族]，共 32 (~3%)個家族、合計 152 名病人帶有 m.1555A>G 突變。然而，若將聽損家族區分為「多病例家族」(multiplex family)及「單病例家族」(simplex family)，則多病例家族中高達 11%帶有 m.1555A>G 突變，易言之，若一家庭中兩名以上成員患有原因不明的感覺神經性聽損，則必須考量是否為 m.1555A>G 突變所導致。

整體而言，帶有 m.1555A>G 突變的聽損病人中，抗生素暴露史皆不明顯，152 名病人中僅 3 名確定為藥物暴露所造成的聽損。可知由於醫藥衛生之進步以及醫師的用藥習慣，抗生素暴露已非決定國人 m.1555A>G 突變臨床表徵之重要因子。

各家族之初始受試者(proband)之聽力及臨床表徵整理於表二十二。同一家族中，雖然患病成員多呈現雙側對稱性、漸進性、學語後感音性聽損，且均顯示正常之顛骨電腦斷層掃描結果，然而彼此間聽損程度卻有極大的差異性(圖二十六)。不同家族間，其「外顯率」(penetrance)亦大不相同：有些家族中高達近十名成員發病，有些家族則只有一兩名成員發病。以家族內母系血親計算，各家族之外顯率由 13%至 78%不等(圖二十七、表二十二)。

2. 粒線體 m.1555A>G 突變之突變負荷(mutation load)定量

為了釐清針對這些家族之臨床表徵是否與粒線體 m.1555A>G 突變之「突變負荷」(mutation load)有關，本研究針對所有帶有粒線體 m.1555A>G 突變之家族成員，檢測其 m.1555A>G 突變之「同質」(homoplasmy)或「異質」(heteroplasmy)。如圖二十八所示，所有帶有粒線體 m.1555A>G 突變的受試者，不論發病與否，皆為同質(homoplasmic)突變，可知粒線體 m.1555A>G 突變之突變負荷，顯非決定國人 m.1555A>G 突變臨床表徵之重要因子。

3. 粒線體DNA單套群分析

接下來，為了釐清針對這些家族之臨床表徵是否與粒線體 DNA 背景(DNA background)有關，於每一帶有粒線體 m.1555A>G 突變之家族，至少選取兩名病例，以檢測其粒線體基因體之單套群。

本研究於前 10 個家族完成粒線體 DNA 單套群之定型。10 個家族中，有 3 個家族分類上屬單套群 F，2 個家族屬單套群 A，2 個家族屬單套群 M7，

其他 3 個家族則分屬單套群 B、D 及 N*。易言之，本研究發現這些不同家族雖皆具 m.1555A>G 突變，卻分屬不同的單套群，顯示其並非源自於一起始點突變，而是於人類遷徙演化中，於 m.1555A 此一熱突變點(hot spot)，屢生突變所致。

另一方面，單套群與表現型之相關性分析則顯示，不同粒線體 DNA 背景之家族間，外顯率亦不相同(圖二十九)。而其中單套群 A 與 B 似乎與高外顯率有關，而單套群 F 則與低外顯率有關(Chi-square test, $p=0.018$ ，表二十三)。此一初步之發現，或有助於吾人未來更精準評估病人及其家屬之預後(Wu et al., 2007)。

4. 細胞核相關基因之基因定型

為了釐清針對這些家族之臨床表徵是否受細胞核內相關基因之基因變異影響，本研究針對 73 名病例檢測其 *GJB2* 基因及 *TRMU* 基因是否具有變異。結果顯示 73 名病例皆未帶有 *GJB2* 基因及 *TRMU* 基因突變，可知此二基因亦非決定國人 m.1555A>G 突變臨床表徵之重要因子。

5. 小結

本部份研究顯示，國人特發性感覺神經性聽損家族中，粒線體 m.1555A>G 突變之盛行率約為 3%，而於多病例家族，其盛行率更高達 11%。易言之，若一家族中有兩名以上成員患有原因不明的感覺神經性聽損，則必須考量是否為 m.1555A>G 突變所致。於吾人之研究世代中，抗生素暴露、m.1555A>G 突變之突變負荷及細胞核相關基因之基因變異，皆非決定國人 m.1555A>G 突變臨床表徵之重要因子。反之，某些單套群，如單套群 F，似乎與家族之低外顯率（即低發病率）相關，此一初步之發現，將有助於吾人未來更精準地評估病人及其家屬之預後。

(五) 結論

回顧過去幾年的主要成果，本研究不僅建立了一個大規模國人特發性感覺神經性聽損的基因庫，也釐清了國人特發性聽損基因流行病學的大致輪廓。本研究發現，國人感覺神經性聽損病人的基因變異，還是以 *GJB2* (或稱 *Cx26*) 基因、*SLC26A4* (或稱 *PDS*) 基因及粒線體 12S rRNA 基因等三個耳聾基因最為常見。藉由表現型-基因型關連性的研究，亦可推知不同基因變異所相對應之臨床表徵。而最近幾個常見耳聾基因變異基因置換鼠之成功培育，不僅有助於我們釐清各基因變異之致病機制，亦將成為未來研究新治療方針之礎石。

第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

(一) 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果

1. 結合基因檢測結果與其他預後因子以建立預測人工耳蝸術後成效的模式

(1). 基因檢測結果與人工耳蝸術後成效

本研究一共納入 67 名人工耳蝸植入術後並至少經三年聽能創建之病童於本研究。67 名病童中，計 18 名帶 *SLC26A4* 基因突變，4 名帶 *GJB2* 基因突變，另 45 名則未帶基因突變。未帶基因突變之 45 名病人，有 11 人未能於術後獲得開放式語音辨識能力，而 22 名帶基因突變的病人，則皆完成語音聽知覺評估，其「開放式語音辨識測驗」之各辨識率也都相當理想，兩組之間有顯著差異（表二十四）。

(2). 影像學結果與人工耳蝸術後成效

若以影像學結果區分，則有 9 名病人具內聽道狹窄，24 名病人具內聽道狹窄以外之其他內耳畸形，另 34 名病人則不具內耳畸形。內聽道狹窄的 9 名病人中，7 名未能於術後獲得開放式語音辨識能力，而具他種或不具內耳畸形之 58 名病人，則僅 4 名未能獲得開放式語音辨識能力，不論是語音聽知覺評估完成率或是語音辨識測驗之各辨識率，各組之間亦具顯著差異（表二十五）。

(3). 廣義線性模式(general linear model, GLM)

本研究進一步建立廣義線性模式，以研究在其他預後因子受控制下，單一因子與語音聽知覺表現的相關性。結果發現，基因檢測結果及影像學結果確為影響人工耳蝸植入術後成效最重要的兩個指標(表二十六)。

(4). 基因檢測結果與影像學結果的互補性

同時，本研究也顯示，以影像學上內聽道狹窄之有無評估人工耳蝸之預後，可預測出術後成效不佳之病例；而以基因診斷預測預後，則可預測出術後成效良好之病例。兩者恰可相輔相成，合併使用，將有助於吾人於人工耳蝸植入術前，更精準地預測病人術後成效(Wu et al., 2008a)。

2. 以基因檢測結果預測內耳畸形病例人工耳蝸術後成效

本研究分析了 24 名內耳畸形病童於接受人工耳蝸植入手術後語音聽知覺的表現。24 名病童中，計 12 名帶 *SLC26A4* 基因突變，另 12 名則未帶有突變。他們的語音聽知覺表現如表二十七所示：相較於未帶突變組中僅有 5 名病人能順利完成評估，帶突變組病人明顯表現較佳—12 名病人全數皆完成語音聽知覺評估(Fisher's exact test, $p < 0.05$)。而這些帶 *SLC26A4* 基因

突變之患者，其「開放式中文語音辨識測驗」之辨識率也相當理想，其平均值分別為「子音辨識率」：88.5%、「母音辨識率」：86.8%、「聲調辨識率」：93.2%、「單字辨識率」：79.2%及「字組辨識率」：87.8%。易言之，內耳畸形病童中，帶 *SLC26A4* 基因突變之患者，於接受人工耳蝸植入手術後，其語音聽知覺表現顯著較為未帶突變者為優。因此，內耳畸形病童，於人工耳蝸植入之術前評估階段，可建議其接受 *SLC26A4* 基因之突變檢測，以做為預測預後之指標(Wu et al., 2008a)。

(二) 研發高效率低成本之基因診斷工具

1. SNaPshot assay 之研發

本研究所研發之初代 SNaPshot assay，係根據我們之前所建立之資料庫，選取國人最常見之 20 個耳聾基因變異點位，而以 2 次 SNaPshot 反應，完成此 20 個基因變異點位之掃描。此 20 個耳聾基因變異點位包括 9 個 *GJB2* 基因變異(即 c.109G>A、c.124G>A、c.187G>T、c.230G>A、c.235delC、c.299_300delAT、c.427C>T、c.508_509insAACG 與 c.571T>C)、9 個 *SLC26A4* 基因變異(即 c.230A>T、c.919-2A>G、c.1001+5G>C、c.1115C>T、c.1160C>T、c.1229C>T、c.1489G>C、c.2162C>T 與 c.2168A>G)以及兩個粒線體 12S rRNA 基因變異(m.961delT+C(n)與 m.1555A>G)(表二十八)。而根據吾人之之前的研究結果，這 20 個基因變異點位合計之對偶基因頻率，約可涵括國人聽損病人中所有已知突變之 98%(Wu et al., 2008b)。

SNaPshot 反應與突變檢測之引子(primers)如表二十九所示，而 SNaPshot 反應所跑出之結果如圖三十所示，每一基因變異點位皆可對應到特定位置之波型，而每一波型則因核苷酸各代表不同顏色，而可清楚區分出同型合子或異型合子等不同基因型。

2. 基因檢測工具效力之確認

本研究前瞻性、隨機選取 214 接受聽損基因檢測之家族，而同時由兩位不同的研究人員，分別使用傳統標準直接定序方法及 SNaPshot 技術，為其進行耳聾基因突變點掃描。214 個受試家族之初始受試者中，計 126 位(58.9%)帶有至少一個基因變異。以 *GJB2* 基因而言，共有 41 位初始受試者經診斷帶有 2 個變異；以 *SLC26A4* 基因而言，則分別有 13 位及 16 位初始受試者經診斷帶有 2 個變異及 1 個變異；另有 14 位初始受試者帶有 m.1555A>G 變異(表三十)。有一位帶有 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 及 c.235C>T 複合異型合子(compound heterozygous)之病人，則由於本研究之 SNaPshot assay 並未包括 c.235C>T 變異，而使該變異漏未檢出。整體而言，本研究所研發之 SNaPshot 聽損基因檢測技術相較於直接定序，正確率(accuracy)高達 99%以上。每一位病人之檢測成本，包含 DNA 萃取及兩次

SNaPshot 反應，可降低至新台幣 300 元以下(Wu et al., 2009a)。

(三) 胚胎著床前聽損基因診斷

1. 臨床評估與遺傳諮詢

吾人於日前診斷一名患大前庭導水管之男童帶有 *SLC26A4* 基因同型合子 (homozygous) c.919-2A>G 突變。該病童患有兩側重度聽損(圖三十一 a)，電腦斷層掃描則顯示兩側大前庭導水管及 Mondini 氏發育不全(圖三十一 b)。基於病童父母之要求，於詳細之遺傳諮詢後，本研究為此家族進行胚胎著床前基因診斷。

2. PGD 療程(PGD cycle)

於研發並校正單一細胞 c.919-2A>G 突變點檢測技術後，本研究共於該家族進行兩次 PGD 療程(表三十一)。第一次 PGD 療程並未使病童母親成功受孕。於第二次 PGD 療程，本研究共於 12 個胚胎進行切片。如圖三十二所示，共有 4 個胚胎(PGD1、PGD2、PGD3 與 PGD6)為完全正常，3 個胚胎(PGD4、PGD7 與 PGD12)帶單一突變點，另 5 個胚胎(PGD5、PGD8、PGD9、PGD10 與 PGD11) 則帶兩個突變點而會發病。同時考量胚胎之基因型與型態後，本研究選擇 3 個胚胎(PGD1、PGD2 與 PGD12)植入母體，並成功使病童母親受孕單胞胎。

3. 產前檢查及新生兒聽力篩檢

本研究於十一週時所進行之絨毛膜採樣證實胎兒未帶 *SLC26A4* 基因變異(圖三十三)。該名胎兒已於 2009 年 5 月順利出生，出生時接受 DPOAE 及自動聽性腦幹反應(automated auditory brainstem response, AABR)檢測，顯示聽力完全正常(圖三十四)。

(四) 結論

除了耳聾基因之基礎研究外，本研究這幾年也嘗試利用現有知識，研究聽損基因檢測之臨床新應用。歸納其主要成果，包括：利用聽損基因檢測結果以更精確地預測人工耳蝸手術術後成效、研發高效率低成本的 SNaPshot 基因檢測技術來推廣基因檢測、以及完成世界第一例之胚胎著床前聽損基因診斷。相信這些成果，應可使更多病人得以受惠於基因醫學的新進步。



五、討論

第一部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

- (一) 國人遺傳性聽損基因流行病學資料庫之建立
- (二) *SLC26A4* 基因與國人大前庭導水管症候群
- (三) *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變基因置換鼠之表徵
- (四) *GJB2* 基因 p.V37I 變異之致病性
- (五) 粒線體基因變異之臨床重要性
- (六) 其他耳聾基因變異之研究
- (七) 結論

第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

- (一) 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果
- (二) 研發高效率低成本之基因診斷工具
- (三) 胚胎著床前聽損基因診斷
- (四) 結論



第一部份：遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究

(一) 國人遺傳性聽損基因流行病學資料庫之建立

1. 大規模遺傳性聽損基因庫的建立

臨床的基因研究，首重充足的樣本數。過去七年來，本研究在進行聽損基因檢測的同時，也建立了國人自己的遺傳性聽損家族檢體庫，而且詳細記錄了所有病人之臨床資料，如聽損程度、聽力圖圖形、實驗室檢查結果以及影像檢查結果等等。目前總共約收錄了超過 900 個家族近 2000 名病人，而且容量還在逐漸擴充中。此一基因檢體庫之建立，可謂是本研究過去所進行基因流行病學研究的附加成果，未來幾年，我們希望能夠充分利用這個檢體庫，以進行一系列的研究。

2. 聽損基因流行病學資料偏差之來源

根據所進行的基因流行病學研究，本研究發現國人感覺神經性聽損病人的基因變異，還是以 *GJB2* (或稱 *Cx26*) 基因、*SLC26A4* (或稱 *PDS*) 基因及粒線體 12S rRNA 基因等三個耳聾基因最為常見。然而各耳聾基因之常見突變，與國外卻大不相同，其中，最重要的原因，當可歸因於種族因素。

然而，即便是同一種族，基因流行病學的報告亦屢生歧異。舉例而言，兩份同樣是以美國中西部病人為對象、針對 *GJB2* 基因變異所進行的調查，Iowa 大學的研究顯示 c.35delG 變異於病人族群之對偶基因頻率高達 27.9% (Green et al., 1999)，而 Ohio 大學的研究則顯示 c.35delG 變異於病人族群之對偶基因頻率僅為 8.6% (Lim et al., 2003)。進一步分析二者歧異之來源，可發現 Iowa 大學研究的對象，僅限於「非症候群且隱性遺傳」之聽損家族，而 Ohio 大學研究的對象，則包括所有原因不明之特發性聽損病人，故前者自然可得出較高的 c.35delG 變異對偶基因頻率 (Kimberling, 2005)。可見吾人在呈現聽損基因流行病學報告時，須先清楚定義所研究「研究族群」，方有助於不同研究間之比較。

除了「研究族群」不同會導致聽損基因流行病學資料偏差之外，本研究進一步顯示，收集病人之來源，也是必須考量的因素之一。一般而言，文獻上所載聽損基因流行病學研究之病人來源，包括醫院 (Belintani Piatto et al., 2004; Dalamon et al., 2005)、啟聰學校或復健機構 (Kalay et al., 2005)、以及二者皆具 (Gurtler et al., 2003; Hwa et al., 2003; Maheshwari et al., 2003)。理論上各種收集病例之方式各有優缺點：由啟聰學校或復健機構可於短時間收集大病例，而由醫院收集則可對病人之臨床表徵及病程作一完整追蹤。

惟如本研究所示，來自不同機構的病人，由於其聽力特徵亦不相同，將導致基因流行病學研究結果的歧異。比如說，從醫院收集病人，則將較有可能收集到聽力較不穩定之大前庭導水管症候群病人，而使得 *SLC26A4* 基因變異被檢測出的機會增加，導致選樣偏差。因此，在報告聽損基因流行病學的研究結果時，必須將所由收集病人的來源標示清楚，方為精確，並有助於不同研究間之比較。

3. 國人聽損基因流行病學資料尚待補充之處

大致而言，國人特發性感覺神經性聽損病例，若僅針對 *GJB2* 基因、*SLC26A4* 基因及粒線體 12S rRNA 基因等三個常見耳聾基因進行檢測，則約有 1/3 可在這三個基因找到基因變異；而如果家族中有兩個以上的成員罹患感覺神經性聽損，則這個比例可高達 1/2。反面觀之，此一數據亦代表著 2/3 的特發性感覺神經性聽損病例，其成因仍屬不明；而即使家族史明顯，仍有一半的病例無法找到原因。易言之，應有其他耳聾基因導致國人遺傳性聽損。

然而，根據本研究，國外曾被報告為「非罕見」之基因變異，包括 *GJB6* (*Cx30*)、粒線體 m.3243 及粒線體 m.7445 等點位等，似乎均非導致國人遺傳性聽損之原因。晚近，雖有報告於聽損漢人可找到 *KCNQ4* 基因變異(Su et al., 2007)、*MYO7A* 基因變異(Su et al., 2007)或其他 connexins 基因變異(Yang et al., 2007a)，但是由於這些變異僅見於極零星之病例，且其致病性亦多尚未確定，因此所能解釋的臨床案例應極為有限。

綜上，國人特發性感覺神經性聽損病人中，仍有相當比例成因尚屬不明，而構成目前吾人基因診斷及遺傳諮詢等工作上力所不及之處。釐清基因因素在這些病例所扮演的角色，應可彌補此一方面的缺口，也是吾人未來尚須努力的目標。

(二) *SLC26A4* 基因與國人大前庭導水管症候群

1. 大前庭導水管症候群之臨床重要性

隨著影像醫學的進步，特別是高解析度電腦斷層掃描廣泛的臨床應用，聽損人口中合併內耳畸形的比例，遠較以往所認為者為高。歐美的研究顯示，先天性聽損的患者中，約有 20%至 30%合併內耳畸形，其中尤以大前庭導水管最為常見(Antonelli et al, 1999; Mafong et al, 2002; McClay et al, 2002)。而根據本研究，大前庭導水管於國人特發性感覺神經性聽損病人中之盛行率約為 20% (Wu et al., 2005b)。其中有些病例尚會合併 Mondini 氏發育不全(Mondini dysplasia)或其他內耳畸形(仍歸類為非症候群型大前庭導水管)，有些病例則於青春期前後尚會發生甲狀腺腫(即成為 Pendred 氏症候群)。

另一方面，大前庭導水管症候群病人臨床上常合併波動性的聽力喪失 (fluctuating hearing loss)，亦即聽力極易因外在因素如頭部撞擊或其他不明原因而變差，通常經過幾次發作之後，病人之聽損程度就到達了重度或極重度的聽損。此一特徵，一直是令耳鼻喉科醫師頭痛之一難解謎題，然而同時亦提供吾人機會，於病人尚具殘餘聽力之時，積極介入治療以保存其聽力。

2. *SLC26A4* 基因變異於國人大前庭導水管症候群所扮演之角色

依前揭本研究所整理 101 個 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族之 *SLC26A4* 基因檢測結果，101 個家族的初始受試者中，63 名(62%) 可找到 2 個 *SLC26A4* 基因突變，24 名(24%)可找到 1 個突變，14 名(14%) 則未發現任何突變(表八)。若以體染色體隱性之遺傳模式估計，假設 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管於族群中之盛行率為 0.0002 (0.001 的聽損病人中 20%具大前庭導水管)，則根據 Kimberling (Kimberling, 2005)所建立的統計模型，關於 *SLC26A4* 基因變異與大前庭導水管之關連性，本研究可推導出如表三十二之結果。亦即，國人 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管的病人中，高達 88% (表三十二中 α 值)可歸因於 *SLC26A4* 之基因突變所致。因此本研究認為，國內大前庭導水管病人皆應接受 *SLC26A4* 基因之突變檢測，以確定病因，並利於其後之預後評估及治療。

3. c.919-2A>G 變異之臨床意義

在本研究所發現的 *SLC26A4* 基因變異中，c.919-2A>G (IVS7-2A>G)突變遠較其他突變常見，約佔所有突變之近 8 成，而之後進一步的研究亦證實，該變異係源自一起始點突變。c.919-2A>G 突變不僅常見於台灣之漢人，也是大陸地區漢人最為常見之 *SLC26A4* 基因變異(Wang et al., 2007)。由於其盛行率遠高於其他 *SLC26A4* 基因變異，本研究認為，若在資源有限的條件下，對於漢人中大前庭導水管病人，可先針對 c.919-2A>G 突變進行檢測。而於研發新型態聽損基因檢測工具、或於大規模族群進行基因篩檢時，*SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變也必須納入考量，不容遺漏。

4. 基因型與表現型之關連性

本研究亦統計分析 *SLC26A4* 基因型與表現型的各項指標之間的關連性，包括影像學檢查結果、甲狀腺腫的存在和聽力檢查結果等。如表十所示，初始受試者之內耳畸形種類、甲狀腺腫之有無、聽損程度和聽力圖形，與 *SLC26A4* 基因型之間，並無顯著相關。而由於帶有單一突變(i.e. heterozygous)之初始受試者，其臨床表現型與帶有二突變(i.e. homozygous + compound heterozygous)者無差異，且該單一突變於家族成員中與臨床表現型一同出現，故本研究認為帶單一突變初始受試者其另一染色體上亦可能

具有「隱藏突變」(hidden mutation)，而非透過「表型模擬」(phenocopying, 亦即帶有單一突變之初始受試者為偶然帶因者)或「單套缺失」(haploinsufficiency)等機制，導致聽損發生。換言之，根據本研究結果，*SLC26A4* 基因突變導致國人大前庭導水管症候群，仍係基於體染色體隱性遺傳模式為主，雖文獻中有報告雙基因遺傳模式者(容後「4. 單一 *SLC26A4* 基因變異與大前庭導水管」再述)。當然，亦不能排除其他「調節基因」(modifier gene)作用之可能。

而關於 *SLC26A4* 基因型與表現型之關連性，文獻報告則容有差異。如表三十三所示，有報告 *SLC26A4* 基因型與表現型間具關連性者，如兩份美國報告(Azaiez et al., 2007; Pryor et al., 2005)；亦有報告不具關連性者，如日本的研究(Suzuki et al., 2007)及本文。本研究認為，導致這些報告間歧異之原因主要有二。其一，比較方法不同：兩份美國報告比較不同表現型的病人間，*SLC26A4* 基因型的分布，而日本的研究及本文則係比較不同基因型的病人間，臨床表現型之異同。亦即，後二者所研究的病人，是針對已被檢測出帶有 *SLC26A4* 基因變異的病人，故一開始研究族群的同質性即較高，而不易觀察到基因型與表現型之關連性。此點觀諸日本研究中 100%病人帶有 2 個 *SLC26A4* 基因變異，本研究中高達 62%病人帶有 2 個 *SLC26A4* 基因變異，而兩份美國報告則分別僅有 35%與 14%病人帶有 2 個 *SLC26A4* 基因變異，其理自明。其二，本研究僅納入雙側大前庭導水管的病人，而兩份美國報告則均同時納入單側與雙側大前庭導水管病人，此點亦導致研究族群同質性的差異。

縱使於報告 *SLC26A4* 基因型與表現型間具關連性之研究，其關連性亦僅存在於 *SLC26A4* 基因變異的「個數」與表現型之間。析言之，病人所帶有 *SLC26A4* 基因變異的個數越多，則臨床上越有可能合併較嚴重的內耳畸形或甲狀腺腫(Azaiez et al., 2007; Pryor et al., 2005)。至於 *SLC26A4* 基因變異的「種類」，則無論於任何研究，皆未發現與表現型具關連性。

易言之，我們目前仍無法根據病人的 *SLC26A4* 基因型，精確地預測病人之臨床表現型。惟目前本研究除了培育 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 變異之基因置換鼠外，亦同時培育 p.H723R 變異之基因置換鼠。此二株小鼠之表現型是否存有差異，殊值研究，蓋未來或許可提供我們一些線索，來反推我們臨床上之觀察。

5. 單一 *SLC26A4* 基因變異與大前庭導水管

於大前庭導水管病人若僅檢測出單一 *SLC26A4* 基因變異，則其臨床意義為何，一直是學者相當感興趣的問題。近年的研究指出，單一 *SLC26A4* 基因變異，可能與功能相關基因的另一變異，如 *FOXI1* 基因變異(Yang et al., 2007b)或 *KCNJ10* 基因變異(Yang et al., 2009)，一起作用，而以雙基因(di-genic)遺傳的方式，導致大前庭導水管症候群。然而，一般咸以為，這

些僅是少數特例，絕大多數的大前庭導水管症候群病人，仍屬於體染色體隱性遺傳模式(Choi et al., 2009)。

本研究並未偵測出國人大前庭導水管症候群病人中帶有 *FOXII* 基因變異者，顯示目前尚無證據可證實有雙基因遺傳之情形。而根據本研究針對 *SLC26A4* 基因型與表現型關連性之分析，亦偏向國人大前庭導水管症候群病人為體染色體隱性遺傳。果如此，則表三十二之估計模型，可能具有相當之臨床參考性。舉例而言，大前庭導水管症候群病人縱未檢測出 *SLC26A4* 基因變異，仍有 16.6% 可歸因於 *SLC26A4* 基因之隱藏突變，而不能排除其為遺傳性聽損，病童父母若欲生下一胎時，仍須提防；而 *SLC26A4* 基因變異於國人總族群中之對偶基因頻率之估計值為 1.3% (P_{tot})，亦即約 40 個正常人中，即有一個為帶因者(carrier)，而其中約 8 成係帶有 c.919-2A>G 變異，故由預防醫學的角度觀之，似乎有將 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 變異之基因檢測，推廣至一般族群之必要性。

(三) *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變基因置換鼠之表徵

1. *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變基因置換鼠與人類臨床表徵之比較

如前面結果部分所述，目前本研究已於 C57BL/6 (B6) 之小鼠株，成功培育出帶有 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變之同型合子基因置換鼠，並將之命名為 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}。 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠之表現型，與人類相對應基因型病人之臨床表徵大致類似，但仍有相異之處，茲比較並臚列於下：

(1) 相同之處

- a. 隱性遺傳：僅 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠呈現聽損及平衡功能異常，異型合子之 *Slc26a4*^{+ / tm1Dontuh} 基因置換鼠與野生型小鼠尚無差異。
- b. 聽力損失：所有 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠皆具聽力損失。
- c. 前庭導水管擴大：不論係於肉眼觀察或光學顯微鏡下，皆可發現 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠之前庭導水管擴大。

(2) 相異之處

- a. *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠一律呈現極重度聽損，而未如人類可見波動性或漸進性聽損。
- b. *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠中，45% 可觀察到歪頭(head-tilting)及繞圈圈(circling)之行為模式，然而人類於急性聽損發作時雖會伴隨頭暈，平常則無平衡功能失調之症狀。

2. *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠表現型與人類不盡相同之原因

由於吾人建立 *SLC26A4* 基因變異實驗動物模式之目標，除為了釐清

SLC26A4 基因變異之致病機轉外，尚希望該動物模式可用作未來研發新治療方式之用，故實驗動物模式之表現型，若能與人類疾病幾乎相同，自是最佳。因此，針對本研究所培育 *Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 基因置換鼠表現型，與人類相對應基因型病人之臨床表徵不同之處，或許有加以檢討改善之必要，以下分別討論之：

- (1) *Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 基因置換鼠中，45%可觀察到歪頭(head-tilting)及繞圈圈(circling)之行為模式，人類無此表徵，其原因可能有二：
 - a. 人類視覺功能較強，得以彌補內耳平衡功能的缺失。蓋於人類帶有 *SLC26A4* 基因變異之大前庭導水管症候群病人並非全無前庭功能之症狀。部分病人於極性波動性聽損發作時，也會合併頭暈的症狀；而有些報告也指出，部分病人學會走路之年齡，有延緩之情形。
 - b. *Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 基因置換鼠之表現型較人類為重，此點相對應於小鼠之聽力自出生後即為極重度聽損，而無如人類聽力係以波動性或漸進性的形式逐漸變差。
- (2) *Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 基因置換鼠一律呈現極重度聽損，而未如人類可見波動性或漸進性聽損，或許可歸因於其較為嚴重的表現型。

3. 實驗動物模式之改善之道

為使本研究所培育之 *SLC26A4* 基因突變之基因置換鼠其表現型更加接近人類，可能有下列解決之道：

- (1) 於不同基因背景(genetic background)的小鼠進行培育。舉例而言，129/Sv 小鼠之聽力較 C57BL/6 (B6)小鼠不易退化，吾人或許可將現有之 B6:*Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 基因置換鼠與129/Sv 小鼠混交，看是否得於129/Sv 基因背景之小鼠，觀察到較輕之表現型。
- (2) 除了 c.919-2A>G 突變之基因置換鼠 *Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 外，我們也同時培育 p.H723R 突變之基因置換鼠。由於 p.H723R 是錯義突變，理論上仍能轉譯出完整的 pendrin 蛋白質，而未若 c.919-2A>G 突變轉譯出不完整的蛋白質，故理論上，其基因置換鼠之表現型可能較輕。
- (3) 如果上述二方法皆無法得出表現波動性或漸進性聽損的小鼠，則吾人可能需要培育 conditional knock-in 的基因置換鼠，於其出生後適當時期再將基因突變 knock-in，以模擬人類疾病。

4. 小結

SLC26A4 基因 c.919-2A>G 突變基因置換鼠之成功培育，將有助於吾人進一步瞭解國人大前庭導水管症候群之致病機轉。*Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 基因置換鼠之表現型，與臨床上病人之表現型大致類似，若能加以適當調整，應可作為日後研究人類疾病之動物模式，而為大前庭導水管症候群之治療，帶來一線曙光。

(四) *GJB2* 基因 p.V37I 變異之致病性

1. p.V37I 變異與特發性感覺神經性聽損

(1) p.V37I 變異為真實突變？

於本研究針對 732 個非症候群特發性感覺神經性聽損家族所進行的研究中，p.V37I 變異於輕度至中度感覺神經性聽損病人之對偶基因頻率，遠較對照組高，而 p.V37I 同型合子之基因型比例，亦遠高於由對照組頻率所推估而來的期望值，同時家族樹分析亦顯示，p.V37I 同型合子變異與家族成員聽損之表現型一同出現，凡此種種證據皆顯示，p.V37I 同型合子變異與輕度至中度感覺神經性聽損確有顯著相關。

而進一步之單套型分析與相關 DNA 片段，包括 *GJB2* 基因促進區 (promoter) 及其上游 *GJB6* 基因所進行之突變點搜尋，均未找到其他突變點，也間接指向 p.V37I 變異可能本身即具致病性，而導致感覺神經性聽損的發生。此外，本研究於 HeLa 細胞株所進行的功能性基因研究，也顯示 p.V37I 變異可能會影響 Connexin26 蛋白質的功能。

惟不論 p.V37I 變異為真實突變、抑或另有一相近但與其處於連鎖不平衡之真實突變，p.V37I 變異與特發性輕度至中度感覺神經性聽損之間的相關性是無庸置疑的。本研究 376 個特發性輕度至中度感覺神經性聽損的家族中，即有 77 個(20.5%)之初始受試者為 p.V37I 同型合子，其臨床重要性不言可喻。

(2) 其他調控因子的存在

本研究整理 86 名 p.V37I 同型合子之臨床表現型，結果顯示其聽力學表徵呈現多重樣貌，聽損形式可為穩定或逐漸變差，而聽力圖型則可為高音漸傾型或平坦型。如圖二十一之「複合聽力圖」所示 p.V37I 同型合子初始受試者的聽損程度分布由輕度至重度，而家族成員中，更有同型合子病人表現極為接近正常之聽力者(圖十九，II-5)，可見基因型雖相同，臨床表徵卻大相逕庭。本研究認為，應存在其他因子以調控 p.V37I 同型合子之聽損程度。

由於 p.V37I 變異於國人中之對偶基因頻率極高(9.2%)，亦即 5-6 人中即有一位是帶因者，100-120 人中即有一位是同型合子，本研究認為，釐清這些調控因子極具臨床重要性，而有加以研究之必要。

(3) 小結

GJB2 基因 p.V37I 同型合子變異與特發性輕至中度感覺神經性聽損之間具顯著相關，且臨床上顯現多態樣之聽力學表徵。由於此基因變異在國人原因不明的輕至中度感覺神經性聽損中相當常見，且可能解釋大

於 1/5 病人聽損的發生，因此，本研究建議在處理輕至中度感覺神經性聽損病人時，需將基因因素納入鑑別診斷之中。

2. *GJB2* 基因 p.V37I 變異與老年性聽損

於針對 1005 名受試者所進行老年性聽損的研究中，本研究發現 p.V37I (c.109G>A) 變異也與國人老年性聽損相關。特別是如表二十所示，p.V37I 同型合子之 Z_{low} score、 $Z_{4\text{-tone}}$ score 及 Z_{high} score 均顯著較另二基因型受試者高 (Analysis of variance [ANOVA], post hoc test with the Tukey multiple comparison procedure, all $p < 0.001$)，亦讓我們直接聯想到，p.V37I 變異於特發性感覺神經性聽損之體染色體隱性遺傳模式。

惟 p.V37I 變異於老年性聽損所扮演的角色，至少有兩點與特發性感覺神經性聽損不同，而值得我們注意：

- (1) 如表十八所示，1005 名受試者中共 17 名為 p.V37I 同型合子 (genotype AA)，其中有 5 名 (29%) 其 Z_{low} score 可歸類為正常或較佳之 1/3、6 名 (35%) 其 $Z_{4\text{-tone}}$ score 可歸類為正常或較佳之 1/3、8 名 (44%) 其 Z_{high} score 可歸類為正常或較佳之 1/3，可見 p.V37I 同型合子仍有相當比例，於超過 40 歲後，聽力仍維持相當正常。
- (2) 此外，由於本研究於篩選 1005 名受試者時，已排除 30 歲前即有聽力問題之受試者，故 17 名 p.V37I 同型合子中，縱然發生老年性聽損，其發病亦皆自 30-40 歲之後。

我們認為，若能釐清上述二點，應有助於我們更加瞭解 *GJB2* 基因 p.V37I 變異之致病機制。

3. p.V37I 變異具演化上優勢?

若肯認 p.V37I 變異會導致特發性感覺神經性聽損及老年性聽損，則難以理解的是，為何該一突變於正常族群中會有如此高的盛行率。過去幾年的研究，*GJB2* 基因 p.V37I 變異於台灣漢人及大陸漢人正常族群的對偶基因頻率皆接近 10% (Dai et al., 2009; Hwa et al., 2003)，而於泰國人正常族群的對偶基因頻率亦高達 8.5% (Wattanasirichaigoon et al., 2004)，實已顛覆吾人對於真實突變於族群中低對偶基因頻率 ($< 1/100$ 或 $< 1/200$) 之傳統觀念。

合理的推論或許可認為，p.V37I 變異之帶因者，可能具有演化上之優勢，同時由於其導致之臨床症狀多僅為輕度聽損，故在演化上可以均衡天擇的趨勢，而於正常族群中維持高對偶基因頻率。晚近，有研究指出，特定的 *GJB2* 基因變異，可增強表皮細胞底抵抗外來微生物的能力 (Man et al., 2007)，或可提供我們一思考的切入點。

4. 小結

本研究於特發性感覺神經性聽損及老年性聽損聽損的研究皆顯示，

GJB2 基因 p.V37I 變異與聽力損失的發生相關。然而，關於其致病機制及其盛行率，仍存有許多尚待研究的問題。目前，本研究已培育出 *GJB2* 基因 p.V37I 變異的基因置換鼠，此一動物模式，也許可助我們釐清這些相關問題。

(五) 粒線體基因變異之臨床重要性

1. 粒線體基因變異於國人特發性感覺神經性聽損之重要性

根據本研究，國人特發性感覺神經性聽損家族中，約 3-4% 可檢測出粒線體基因變異，其中以 m.1555A>G 突變最為常見。至於粒線體其他基因之突變，如粒線體 m.3243 及 m.7445 等二點位，於國人特發性感覺神經性聽損則尚屬罕見。而位於同一 12S rRNA 基因的其他點位，如 m.1095T>C (Tessa et al., 2001; Zhao et al., 2004b)、m.1494C>T (Zhao et al., 2004a)、m.1243T>C、m.1291T>C (Ballana et al., 2006) 和 m.1462G>A (Gurtler et al., 2005) 等，亦未見於本研究。有些家族可檢測出 m.961delT+C(n) 變異，然而其致病性仍有爭議 (Bacino et al., 1995; Kobayashi et al., 2005)。

2. 影響 m.1555A>G 突變臨床表徵之因子

本研究一共檢視突變負荷、粒線體 DNA 背景、胺基酸甘醣體接觸及細胞核相關基因之作用等 4 個可能影響 m.1555A>G 突變臨床表徵的因子，結果發現，僅有粒線體 DNA 背景 (即粒線體單套群) 是影響國人 m.1555A>G 突變病人臨床表徵的重要因素。

於其他的粒線體疾病，如 Leber 氏遺傳性視神經病變 (Leber's hereditary optic neuropathy, LHON, MIM# 535000)，單套群 J 已被證實與高加索人種中 m.11778G>A 與 m.14484 T>C 二突變較高的外顯率有關 (Brown et al., 1997; Torroni et al., 1997)。進一步的研究發現，單套群 J 所包含的 m.4216T>C 與 m.13708G>A 二變異可能分別會改變 NADH 脫氫酶之 ND1 和 ND5 子單元 (subunit)，而與 m.11778G>A (ND4) 與 m.14484 T>C (ND6) 二突變所導致的構型變化交互作用，進而影響整個 NADH 脫氫酶的功能 (Torroni et al., 1997)。

在本研究之前，亦有學者針對粒線體單套群之於 m.1555A>G 突變臨床表徵的影響進行分析，然而並未得出顯著結果 (Torroni et al., 1999)。本研究是文獻上第一個證實粒線體單套群會影響 m.1555A>G 突變臨床表徵的報告。此項發現，亦為後來的研究所證實 (Lu et al., 2009)。

3. 國人 m.1555A>G 突變之起源

國外關於 m.1555A>G 突變之親緣分析研究 (phylogenetic study) 皆指出，m.1555A>G 突變可出現於多種不同之粒線體單套群 (Abe et al., 1998;

Hutchin et al., 1997; Torroni et al., 1999), 本研究亦顯示類似的結果。本研究發現國人 m.1555A>G 突變家族, 雖然均帶同一突變, 卻分屬 A、B、D、F、M7 及 N* 不同的單套群, 顯示其並非源自於一起始點突變, 而是於人類遷徙演化中, 於 m.1555A 此一熱突變點(hot spot), 屢生突變所致。

4. 小結

本研究顯示, 國人特發性感覺神經性聽損家族中, 粒線體 m.1555A>G 突變之盛行率約為 3%, 而於多病例家族, 其盛行率更高達 11%。易言之, 若一家族中有兩名以上成員患有原因不明的感覺神經性聽損, 則必須考量是否為 m.1555A>G 突變所致。於本研究之研究世代中, 抗生素暴露、m.1555A>G 突變之突變負荷及細胞核相關基因之基因變異, 皆非決定國人 m.1555A>G 突變臨床表徵之重要因子。反之, 某些單套群, 如單套群 F, 似乎與家族之低外顯率(即低發病率)相關, 此一初步之發現, 將有助於吾人未來更精準地評估病人及其家屬之預後。

(六) 其他耳聾基因變異之研究

如前面論述, 國人特發性感覺神經性聽損病人中, 仍有相當比例成因尚屬不明, 而構成目前吾人基因診斷及遺傳諮詢等工作之缺口。甚至於多病例家族, 仍有一半左右其遺傳機制不明, 可見國人特發性感覺神經性聽損, 應有相當部分可歸因於其他耳聾基因變異。為了釐清其他耳聾基因變異所扮演的角色, 我們認為, 將特發性感覺神經性聽損之表現型作更精細的區分, 有其必要性。而表現型之更精細區分, 或許可依循如下的思考脈絡:

1. 由特發性感覺神經性聽損病人中區分出特定之「症候群型遺傳性聽損」

我們可藉由檢查病人是否具特別之身體表徵, 而將之分類為特定的症候群型遺傳性聽損, 再針對其基因進行基因檢測。目前我們已利用此方式, 區別出 8 個 BOR 症候群家族、6 個第二型 Usher 氏症候群家族、以及 5 個 Alport 氏症候群家族, 再分別針對 *EYAI* 基因、*USH2A* 基因及 *COL4A5* 基因等進行突變檢測。圖三十五顯示我們於一 BOR 症候群家族檢測出 *EYAI* 基因 p.Q123X 突變, 即為適例。

2. 由已知之鑑別診斷, 再將非症候群型遺傳性聽損做更精細區分

於非症候群型遺傳性聽損病人, 我們仍可依已知之鑑別診斷, 將表現型做更精細的區分。比如說, 非症候群型遺傳性聽損病人中, 有些病人於聽性腦幹反應(ABR)未見波型, 卻具有正常的耳聲傳射(otoacoustic emission, OAE), 而可被歸類於聽覺神經病變。

根據我們的研究, 聽覺神經病變約占國人特發性感覺神經性聽損家族之 2%, 而於國人聽覺神經病變家族中, 則約有 1/5 可檢測出 *OTOF* 基因之

p.E1700Q 突變(Chiu et al., 2010)。

3. 整理文獻資料，設計新的鑑別診斷方式

此外，我們尚可利用最近幾年迅速累積的遺傳性聽損臨床基因學相關資料，設計新的鑑別診斷方式。最近，即有學者歸納整理非症候群型、顯性之遺傳聽損病人之聽力資料，而將個別基因(如 *KCNQ4* 基因)變異所相對應之聽力圖，予以分門別類，並設計成軟體(Hildebrand et al., 2008)。我們遇到新病例時，只要將病人之聽力圖輸入該軟體，該軟體即會提供較可能致病之耳聾基因，以俾吾人得針對該基因進行突變檢測。

(七) 結論

過去數年來，本研究所進行的遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究，已使我們對於國人特發性感覺神經性聽損之常見基因變異、基因型與表現型之關連性、以及其致病機制，有了基本的了解。然而，仍有許多問題留待我們探索，包括是否有其他耳聾基因亦具流行病學重要性、個別基因變異之詳細致病機轉為何、某些特定基因變異於族群中之高盛行率成因為何、是否有治療方式可防止病人聽力惡化或甚至回復其聽力等。可喜的是，目前本研究針對常見的耳聾基因變異，皆已成功培育或正在培育基因置換鼠，這些基因置換鼠未來或許可助我們解答部分問題。



第二部分：遺傳性聽損基因檢測之臨床應用

(一) 以基因檢測結果預測人工耳蝸植入手術術後成果

1. 影響人工耳蝸術後成果之因素

人工耳蝸植入手術近年來已被廣泛應用於治療助聽器效果不彰之重度聽損。然而，並非所有接受手術之病人，均能獲得令人滿意之成效。由於植入人工耳蝸仍屬相當昂貴且具侵襲性之手術，而且術後病人、家長及聽語老師皆須花費相當的時間與勞力進行聽語復健或聽能創建，因此，找出預測其術後成效之指標，一直是臨床工作者所引頸企盼的。目前已知，手術年齡(Hammes et al., 2002; McConkey Robbins et al., 2004)、人工耳蝸使用期間(Nicholas et al., 2006)、術前殘存聽力(Cullen et al., 2004a; Gantz et al., 2003; Rubinstein et al., 1999)、術前主要溝通模式(Geers et al., 2003)及影像學檢查結果(Kim et al., 2006; Papsin, 2005)與人工耳蝸之術後成效有關。其中，影像學檢查被認為有助於醫師術前篩選適當病例，特別是內耳畸形中的內聽道狹窄，更是文獻上唯一確定之不良預後指標。然而，內聽道狹窄之病例於所有病人中僅佔極少數，而影像學結果又多偏重於型態之描述，無法提供精確的聽損致病成因。職是之故，尋找其他預測指標存在其實用性及必要性。

2. 以基因檢測結果預測人工耳蝸術後成果

(1) 之前文獻

基因診斷，由於代表聽損的直接成因，似乎有成為人工耳蝸術後成果預測指標之可能性。在本研究之前亦有一些研究指出，*GJB2* 基因變異的病人接受人工耳蝸植入手術，通常可伴隨不錯之成果(Cullen et al., 2004b; Dahl et al., 2003; Fukushima et al., 2002; Green et al., 2002; Lustig et al., 2004; Matsushiro et al., 2002; Sinnathuray et al., 2004a; Sinnathuray et al., 2004b; Taitelbaum-Swead et al., 2006)。然而，這些研究有如下之侷限性：

a. 只研究 *GJB2* 基因變異：

如前所述，常見的耳聾基因變異並非僅限於 *GJB2* 基因變異，*SLC26A4* 基因變異及粒線體 12S rRNA 基因變異也很常見。以國人為例，扣除掉致病機制仍未十分確定的 *GJB2* 基因 p.V37I 變異，帶有 *SLC26A4* 基因變異的病人甚至比帶有 *GJB2* 基因變異的病人多，顯然，僅研究 *GJB2* 基因變異的預測模式，是有所不足的。

b. 未能合併其他預測指標作一完整之評估：

外國的研究，多僅單獨研究基因變異與人工耳蝸術後成果之關連

性，然而影響一個病人人工耳蝸術後成果的因素，並非只有基因因素。我們認為，應將基因因素與其他因素綜合考量，方能作出完整的預測。

(2) 本研究結果

因此，本研究係結合基因檢測結果與其他預後因子，合併考量，以更全觀地預測人工耳蝸術後成效；而基因檢測亦不限於 *GJB2* 基因變異，而同時將 *SLC26A4* 基因變異及粒線體 12S rRNA 基因變異也納入分析。歸納本研究的主要發現如下：

- a. 若以影像學結果區分，則內聽道狹窄是預後不良之指標。
- b. 若以基因檢測結果區分，則帶有 *SLC26A4* 基因突變，是預後良好之指標。而未觀察到 *GJB2* 基因變異與人工耳蝸植入術後成效之顯著相關，則可能係由於本研究病人中，帶有 *GJB2* 基因變異的較少所致。
- c. 由於影像學結果(如大前庭導水管)，與基因檢測結果(如 *SLC26A4* 基因突變)有關，也同時與人工耳蝸術後結果良窳有關，故本研究在評估基因檢測結果與人工耳蝸術後結果之間相關性時，影像學結果為一干擾因子(confounding factor)，須予以校正。
- d. 故本研究建立一廣義線性模式(general linear model, GLM)，以校正其他干擾因子，結果發現，基因檢測結果及影像學結果，於校正其他干擾因子後，仍為獨立影響人工耳蝸植入術後成效最重要的兩個指標(表二十六)。

3. 基因檢測結果為預後良好指標之原因

顛覆傳統上基因疾病往往代表嚴重、無法治療之觀念，本研究顯示，耳聾基因變異反而是人工耳蝸植入術後成效良好之預測指標。此項發現，不僅限於 *GJB2* 基因變異與 *SLC26A4* 基因突變，亦可見於其他耳聾基因變異，如粒腺體 m.1555A>G 突變(Tono et al., 1998)、*OTOF* 基因突變(Rouillon et al., 2006)、第一型 Usher 氏症候群(Pennings et al., 2006)、*DFNA9* 病人(Vermeire et al., 2006)、以及 *DFNA17* 病人(Hildebrand et al., 2006)。

本研究認為，合理的解釋係絕大多數的耳聾基因其表現均侷限於內耳，而與聽覺神經無關，故帶有耳聾基因變異的病人聽覺神經多仍完整，而人工耳蝸之作用，係跳過內耳毛細胞而直接刺激聽覺神經，以致帶有耳聾基因變異反而是人工耳蝸植入術後成效良好之預測指標。

4. 小結

本研究顯示，以影像學上內聽道狹窄之有無評估人工耳蝸之預後，可預測出術後成效不佳之病例；而以基因診斷預測預後，則可預測出術後成

效良好之病例。兩者恰可相輔相成，合併使用，將有助於吾人於人工耳蝸植入術前，更精準地預測病人術後成效(Wu et al., 2008a)。

(二) 研發高效率低成本之基因診斷工具

1. 以 SNaPshot assay 進行聽損基因診斷

(1) SNaPshot assay 之研發

進行本研究之前，文獻上亦有以 SNaPshot 技術檢測粒線體突變者 (Bardien et al., 2009; Cassandrini et al., 2006)，惟本研究係直接應用該技術以同時檢測多個耳聾基因。

本研究所研發之初代 SNaPshot assay，係根據我們之前所建立之資料庫，選取國人最常見之 20 個耳聾基因變異點位，而以 2 次 SNaPshot 反應，完成此 20 個基因變異點位之掃描。其後，本研究將該項 SNaPshot 聽損基因檢測技術，直接用以診斷 214 接受聽損基因檢測之家族，並證實本研究所研發的技術，正確率不亞於傳統之基因定序。

(2). SNaPshot 的優點

我們認為，以 SNaPshot 方法進行國人之聽損基因檢測，有下列優點：

a. 效率高：

就基本設計而言，一次 multiplex PCR 約可檢測 10 個基因變異位點，因此，若國人耳聾基因變異的位點以 20-40 點計算的話，則只需進行 2-4 次 SNaPshot 反應，即可完成國人絕大多數耳聾基因變異位點的掃描。

b. 成本低：

本研究進行 2 次 SNaPshot 反應的成本，可壓至台幣 300 元以內，我們認為這應該是一般國人均可以接受的價格。

c. 可輕易調整或擴增基因檢測的位點：

由於 SNaPshot 的基本原理乃是利用 multiplex PCR，因此若需調整檢測的位點，甚至若未來國人發現新的常見突變位點而想要擴增檢測範圍，僅需就新的位點設計 PCR 的引子加入反應即可，無須作全盤變動。

d. 容易推廣：

SNaPshot 基因檢測最後資料的輸出，與直接定序法完全相同—兩者都是利用電泳位差及螢光顏色分析。因此只要有 DNA 定序的儀器，任一機構都可以進行 SNaPshot 基因檢測！

2. 與文獻上其他聽損基因檢測技術之比較

目前文獻上，除了 DNA 直接定序法外，常用於聽損基因檢測的方法尚有：

- (1). 「單鏈構象多態性」(single-strand conformation polymorphism, SSCP)(Adato et al., 1997) :

單鏈構象多態性是一種分離核酸的技術，可以分離相同長度但序列不同的核酸，其原理乃是利用核苷酸改變對於核酸構象的影響，進而產生電泳速度的差異。雖然便宜，但敏感度不高，目前多被下述之 DHPLC 方法取代。就聽損基因檢測而言，有無法一次同時檢測多個突變點的缺點，因此不適合作最初步的篩檢工具。

- (2). 「高效能液相層析」(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)(Prasad et al., 2004) :

此技術之原理為直接將 PCR 產物以加熱之方式將 DNA 部分解構，而此過程可使得具錯誤配對之核苷酸能夠與正常股得到區分，而經由 HPLC 管柱之分離而得到不同之管壁留置時間(retention time)，之後經由 UV 之偵測可得到結果。其缺點之一為尚須加作定序以確定核苷酸為何種變異。另一方面，就聽損基因檢測而言，亦有無法一次同時檢測多個突變點的缺點，因此也不適合作最初步的篩檢工具。

- (3). 「引子延伸晶片」(arrayed primer extension, APEX)(Cremers et al., 2007; Gardner et al., 2006)

其原理是將寡核苷酸引子(其 3'端與特定 SNP 或突變位點互補，5'末端固定在玻片基質上)，患者 DNA 經 PCR 擴增及酵素消化後，與固定在晶片上的引子結合，因而促發了 DNA 聚合酶延伸反應，應用 4 種不同螢光標記的 ddNTP 為反應物，通過引子位點的顏色信號改變即可檢測突變。其優點為一片晶片可同時檢測數百個突變位點，缺點則是價格仍相對較貴，一片晶片價格需台幣上萬元。歐洲、美國由於為多種族國家，故耳聾基因變異之數目較多且分散，使用該項技術或許有其必要；國人因為種族單純(98%以上為漢人)，絕大多數之耳聾基因變異可能僅集中於 20-40 個突變點位，選擇價格實惠而易於推廣之 SNaPshot 基因檢測技術，可能較為妥適。

- (4). 「Invader 分析」(Invader assay)(Abe et al., 2007)

Invader 分析使用一個耐熱的、結構特異的核酸酵素，根據結構而不是序列在特殊位點上切割核酸分子，可簡單、快速、準確檢測基因突變 SNP。不過，國內仍未引進此項技術及儀器，故並不利於普及而成為一個國內其他醫療或研究機構可廣泛適用之技術。

3. SNaPshot 聽損基因檢測技術之微調

本研究於設計 SNaPshot assay 時，儘量將較為常見的耳聾基因變異，如 *GJB2* 基因的 c.235delC 突變和 p.V37I 變異、*SLC26A4* 基因的 c.919-2A>G 突變、以及粒線體 m.1555A>G 突變，集中在第一個 screening panel，以提高檢出率。如表三十所示，214 為病人中，共 41 位檢測出 2 個 *GJB2* 基因

變異、7位檢測出2個 *SLC26A4* 基因變異[註：另6名複合異型合子病人於經第二個 screening panel 方確認診斷]、14位檢測出粒線體 m.1555A>G 突變，故合計62位(29.0%)於第一個 SNaPshot screening panel 即以確定基因診斷，而無庸再進行第二個 SNaPshot screening panel，進而更加降低整套技術之成本。

4. SNaPshot 聽損基因檢測技術上之限制

本研究中，有一位帶有 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 及 c.235C>T 複合異型合子(compound heterozygous)之病人，其 c.235C>T 變異漏未檢出，此乃由於本研究之 SNaPshot assay 所檢測之點位並未包括 c.235C>T 變異，而成為 SNaPshot 聽損基因檢測技術上之限制。

然而，如之前本研究於 *SLC26A4* 基因所進行之流行病學研究，帶有單一 *SLC26A4* 基因變異之病人，我們亦多認為該病人具有另一隱藏突變，而實質帶有2個 *SLC26A4* 基因變異。因此，本例中即使 c.235C>T 變異漏未檢出，仍未影響我們對該病人基因型之判讀。

5. 小結

本研究顯示，本研究所研發試行之 SNaPshot 聽損基因檢測技術，其正確率與傳統直接定序方法相當，且具下列優點：(1) 效率高：一次檢測可同時掃描多個突變點位；(2) 成本低：檢查20個突變點位之成本僅可壓至新台幣300元以內；(3) 可彈性調整點位：檢測之點位可根據需要作調整或增加；(4) 易於推廣：其他醫療機構凡具備DNA定序儀者，皆可進行此一檢測。基此，本研究認為，SNaPshot 聽損基因檢測技術極適合於推廣並應用於初步篩檢國人特發性聽損的基因變異，甚至可推廣至鄰國，同樣是種族組成也較為單純的大陸、韓國、日本等。

(三) 胚胎著床前聽損基因診斷

1. 世界第一例之胚胎著床前聽損基因診斷

藉由跨科際合作，本研究利用胚胎著床前基因診斷(PGD)之技術，成功幫助一帶有 *SLC26A4* 基因 c.919-2A>G 突變之家族，生下一名聽力完全正常之嬰兒。胚胎著床前基因診斷技術雖已被運用於其他單基因疾病，其中包括了肺囊泡纖維化(cystic fibrosis)、海洋性貧血(thalassemia)、視網膜母細胞瘤(retinoblastoma)、脊髓肌肉萎縮症(spinal muscular atrophy, SMA)等，然而文獻上仍無目前胚胎著床前聽損基因診斷之案例。本研究所順利完成之第一例，可能涉及下列問題，以下分別論述之。

2. 胚胎著床前聽損基因診斷醫學倫理上之考量

(1) 胚胎著床前基因診斷之較新發展

胚胎著床前基因診斷早期係應用於單基因疾病，惟晚近逐漸亦被應用於晚發性、多基因疾病，如亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease) (Rechitsky et al., 2002)或阿茲海默症(Alzheimer's disease) (Verlinsky et al., 2002)；另一方面，亦有進行胚胎著床前 HLA typing 者，用以選擇 HLA 相符之胚胎受孕，並於出生後取該胎兒之幹細胞以拯救其已患嚴重海洋性貧血或白血病之兄姐。此二臨床新應用皆涉及醫學倫理爭議，整理於下：

a. 應用於晚發性、多基因疾病：

否定者認為，如 *BRC1* 突變，通常其發病甚晚，而且亦不一定發病，縱算發病仍可以手術治療，捨棄胚胎恐有違醫學倫理(Robertson, 2003)；肯定者則認為，知道自己將來極可能發病所帶來之不安，以及手術所受之痛苦，皆嚴重影響生活品質，故胚胎著床前基因診斷是可被接受的。

b. 應用於胚胎著床前 HLA typing：

否定者認為，胚胎著床前 HLA typing，有將該計畫受孕之胎兒物質化(instrumentation)之嫌；肯定者則認為，該計畫受孕之胎兒出生後仍是一名正常、受家族所喜愛之胎兒，胚胎著床前 HLA typing 並無不妥(de Wert, 2005; Pennings et al., 2002)。

(2) 胚胎著床前基因診斷應用於遺傳性聽損所涉及之倫理考量

由於部分聾人並不認為自己是有疾病的，而係認為聾人間手語屬於一種次文化，故有部分聾人父母希望其子女與他們相同，故傳統上幫聾人父母選擇聽損胚胎一直是醫學倫理上頗具爭議之問題(Dennis, 2004; Hayry, 2004)。相反地，幫正常父母篩選掉聽損胚胎應不具倫理爭議，我們所持理由如下：

a. 單純篩選未具耳聾基因的胚胎，並非胚胎著床前 HLA typing，故不涉及相關爭議。

b. 常見耳聾基因變異，如 *GJB2* 基因的 c.35delG 和 c.235delC 突變、以及多數之 *SLC26A4* 基因突變，聽力損失發病甚早，故不涉及應用胚胎著床前基因診斷於晚發性、多基因疾病相關倫理爭議。

c. 相較於其他單基因疾病，如肺囊泡纖維化或海洋性貧血等，由於這些疾病通常十分嚴重，且有致命可能，故於產前檢查診斷出來，須做人工流產手術時，家屬及產科醫師的心理、道德上較無負擔。相對地，若要針對單純聽損胎兒進行人工流產手術，則家屬及產科醫師可能須面臨良心的掙扎。故遺傳性聽損病例，更於有於胚胎著床前進行基因診斷之必要。

3. 於耳聾基因尚未確定之病例進行胚胎著床前聽損基因診斷

前已論及，目前非症候群型遺傳性聽損已被定位出來的基因座已超過 100 個，然而僅有不到 50 個耳聾基因被發現(The Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>) (Hilgert et al., 2008)。針對耳聾基因尚未知，但基因座位置確定之家族，最近所發展出之「胚胎單套定型技術」(embryo haplotyping)可能有所助益(Renwick et al., 2007)。該項技術，係藉由定型基因座附近之基因標記，以判定哪條染色體是致病的，而可加以排除。惟使用此項新技術時，應考量染色體可能發生互換(crossover)而發生基因重組(recombination)，而謹慎為之。

(四) 結論

本研究發現，聽損之基因檢測結果不僅可用來預測人工耳蝸手術術後成果，基因流行病學資料的建立，也使得本研究得以研發高效率、低成本的基因檢測工具來推廣基因檢測並幫助更多病人。近年來，本研究也嘗試結合其他領域醫學的較新進展，以研究聽損基因檢測之臨床新應用：聽損之基因檢測與生殖科技的結合，使得吾人臨床上得以扮演更積極的角色，而能夠於生命的最始期即能提供聽損家族其所需要的幫助。





六、展望

- (一) 本研究之主要成果及未來方向
- (二) 短程：常見耳聾基因變異致病性與成因之再探索
- (三) 短程：以基因血片進行新生兒耳聾基因變異篩檢
- (四) 中程：其他常見耳疾之基因研究
- (五) 中程：利用遺傳性聽損基因檢體庫找尋其他耳聾基因
- (六) 長程：新型態治療之研發
- (七) 長程：公共衛生政策—將聽損基因檢測推廣至一般民眾？
- (八) 結論



(一) 本研究之主要成果及未來方向

過去數年來，吾人所進行的研究，大體而言包括遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究、以及遺傳性聽損基因檢測之臨床應用等兩大部分。

第一部分遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究，已使吾人對於國人特發性感覺神經性聽損之常見基因變異、基因型與表現型之關連性、以及其致病機制，有了基本的了解；而第二部分之遺傳性聽損基因檢測之臨床應用，則使得吾人可以將基礎研究所獲得的知識，「轉譯」(translate)到臨床實務，以實際幫助病人。

基於這些初步的成果，吾人為未來的工作，如圖三十六所示大致勾勒出幾個方向，並依短程、中程、及長程規劃，列舉其要項如下：

1. 短程：常見耳聾基因變異致病性與成因之再探索
2. 短程：以基因血片進行新生兒耳聾基因變異篩檢
3. 中程：其他常見耳疾之基因研究
4. 中程：利用遺傳性聽損基因檢體庫找尋其他耳聾基因
5. 長程：新型態治療之研發
6. 長程：公共衛生政策—將聽損基因檢測推廣至一般民眾？

(二) 短程：常見耳聾基因變異致病性與成因之再探索

過去數年來，本研究所進行的遺傳性聽損之基因流行病學及分子病理學研究，已使我們對於國人特發性感覺神經性聽損之常見基因變異、基因型與表現型之關連性、以及其致病機制，有了基本的了解。然而，仍有許多問題留待我們探索，其中，最具研究價值的應屬一些常見耳聾基因變異之詳細致病機制、以及某些特定耳聾基因變異於族群中高盛行率之成因：

1. 常見耳聾基因變異之詳細致病機制

(1) *GJB2* 基因 p.V37I 變異導致聽損之機制

本研究發現，*GJB2* 基因 p.V37I 變異，與特發性輕至中度感覺神經性聽損、以及老年性聽損之間均具相關性，且臨床上呈現多態樣之聽力學表徵。瞭解其詳細之致病機轉，乃至找出調控其表現型之因子，應是我們未來研究的目標之一。

(2) *SLC26A4* 基因變異導致波動性聽損之原理

目前為止的研究，雖可解釋 *SLC26A4* 基因變異會導致聽損，然而，為何病人會出現波動性的變化，卻缺乏一合理之理論。由於 *SLC26A4* 基因變異合併波動性聽損是臨床耳科醫師面對病人時，直接需要處理之問題，釐清其機制具臨床重要性！

(3) *SLC26A4* 基因變異病人臨床表徵差異之原因

SLC26A4 基因變異病人臨床表徵差異甚大，病人內耳畸形嚴重程度不一，而甲狀腺腫發生與否也無法預測，其原因實值探究。

2. 特定耳聾基因變異於族群中高盛行率之成因

(1) *GJB2* 基因 p.V37I 變異之高盛行率

過去幾年的研究，*GJB2* 基因 p.V37I 變異於正常漢人族群的對偶基因頻率接近 10% (Dai et al., 2009; Hwa et al., 2003)，若真為具致病性之突變，其如此高之對偶基因頻率實在令人匪夷所思。晚近，有研究指出，特定的 *GJB2* 基因變異，可增強表皮細胞底抵抗外來微生物的能力 (Man et al., 2007)，p.V37I 變異是否亦具相同功能，使其具有演化上之優勢以均衡天擇的趨勢，而於正常族群中維持高對偶基因頻率，殊值吾人進一步思考。

(2) *SLC26A4* 基因變異之高盛行率

如表三十二本研究依流行病學資料建立之估計模型所示，而 *SLC26A4* 基因變異於國人總族群中之對偶基因頻率之估計值為 1.3% (P_{tot})，亦即約 40 個正常人中，即有一個為帶因者(carrier)，難謂罕見。其是否亦具演化上之優勢，值得探究。目前的研究已證實，pendrin 與高血壓(Eladari et al., 2009)和氣喘(Nakagami et al., 2008)的調控皆有相關，是否藉由此一機制，使得 *SLC26A4* 基因變異帶因者較不會發生高血壓或氣喘，進而使該變異得以抵抗天擇，或許可作為未來研究之方向。

(三) 短程：以基因血片進行新生兒耳聾基因變異篩檢

1. 新生兒基因篩檢之背景與重要性

現今台灣的新生兒篩檢仍著眼於代謝性疾病，利用生化值的高低進行疾病診斷，但是有些先天性疾病不見得會由下游的蛋白質來表現，有些先天性疾病不見得在出生的三天或第五天即會出現，所以只是以生化值來進行篩檢，仍嫌不足。隨著基因科技的進步，分子生物的技術不斷演進與穩定，國外已經開始發展所謂「新生兒分子遺傳篩檢」，例如高加索人種常見的肺囊泡纖維化(cystic fibrosis)，許多先進國家已經開始推廣它的新生兒基因篩檢。然而此病在亞洲人非常少見，所以國內並不適用。此外還有 Factor V Leiden c.G1691A 突變以及 *MTHFR* 基因 c.C677T 突變等等的基因篩檢，或是利用血片 DNA 進行楓漿尿症的基因診斷。

基因分子生物檢測的優勢在於可以從疾病的源頭獲知所有的訊息，無論疾病癥狀是否已經出現，皆可以診斷，而且它所需要的檢體量很少，我們可以藉由聚合酶連鎖反應的基因放大技術得到我們需要的量，並且可以

進行高效率高輸出率的檢測。而若能建立新生兒常見單一基因疾病的篩檢系統，不僅可及早診斷、及早治療，同時大規模地推廣後，亦可建立台灣本土基因資料庫，了解台灣人特殊的基因疾病傾向。

2. 進行新生兒耳聾基因變異篩檢之原因

目前國內外學界及臨床界，皆一致肯認新生兒應接受聽力篩檢，然而是否應接受耳聾基因篩檢，則因為這方面的研究尚在起步階段，而未有確定的共識。然而，根據過去的臨床經驗，我們認為，新生兒耳聾基因篩檢可能可以提供以下的幫助(圖三十七)：

(1). 對小朋友的幫助：早期且確定地診斷聽力損失，及早接受聽語治療

根據國內外研究，嬰幼兒聽力語言發展的黃金時期是在三歲以前：剛出生的嬰兒，雖然內耳的構造已接近完全發育，然而大腦的聽覺中樞則是要在出生後，不斷地接受環境中聲音的刺激，才得以發育完成。因此，若能及早診斷出聽力損失，而在早期(最好於六個月大前)給與積極的聽語復健或聽能創建及治療，則聽損兒童便有極大機會發展出正常的聽覺語言技能。目前已相當普及的「新生兒聽力篩檢」雖可篩檢出中至重度聽力損失的兒童，然而對於較輕度或較晚發性的聽損則無法檢測出來，而即便篩檢出疑似聽損的個案，通常也須幾個月的觀察和檢查，才可確定聽損的診斷。我們認為，「新生兒聽力篩檢」若能輔以「新生兒耳聾基因篩檢」，應有助於我們更早、更確定地診斷嬰幼兒聽損，以及早積極介入治療。

(2). 對父母親的幫助：減少下一胎聽損的機會

如前所述，聽損雖會遺傳，然而並非所有的遺傳性聽損，都會在嬰幼兒的階段就發病，因此，當前一胎已證實患有聽損時，往往父母親已生下或懷有下一胎。若能在出生的時期，就確定遺傳性聽損的診斷，則可藉由遺傳諮詢，減少下一胎聽損的機會。

(3). 對疾病本身的幫助：

有些遺傳性聽損的病人，聽力會逐漸變差。然而，若能及早確立基因診斷，則在一些情形，聽力的惡化是可以預防的。例如帶有 *SLC26A4* 基因變異的個案，臨床上常合併大前庭導水管，以及伴隨頭部撞擊反覆發作的波動型聽力喪失；而帶有粒線體 12S rRNA 基因變異的個案，聽損的程度則會因接觸到胺基酸甘醣體這一類的抗生素而立刻變差。因此，若能及早確定病人的診斷，便可在疾病的最初期，有效地預防聽力的惡化。

3. 我們進行新生兒耳聾基因變異篩檢之初步成果

我們研究團隊，日前已與基因醫學部蘇怡寧醫師、小兒部新生兒科謝武勳主任、曹伯年醫師等團隊合作，利用血片 DNA 萃取技術及 hybridization

probe 基因檢測法(圖三十八)，開始著手於新生兒耳聾基因變異篩檢，初步成果如下：

(1) 研究方法

至 2009 年 8 月止，共計 236 名新生兒同時接受新生兒聽力篩檢及耳聾基因篩檢。聽力篩檢以 DPOAE 檢測，若新生兒於出生時及出生後三日皆未通過聽力篩檢，則視為聽力篩檢未過之陽性病人。耳聾基因篩檢則以血片與 hybridization probe 檢測，吾人初步篩檢 *GJB2* 基因之 c.109G>A 和 c.235delC、*SLC26A4* 基因之 c.919-2A>G 以及粒線體 m.1555A>G 等 4 個國人最常見之耳聾基因變異點。其後，分析並比較聽力篩檢及耳聾基因篩檢之結果。

(2) 初步結果

236 名新生兒中，計 12 名(5.1%)未通過聽力篩檢。耳聾基因篩檢結果，若以基因型區分之，則有 4 名帶有 *GJB2* 基因 c.109G>A 之同型合子(homozygous)突變，3 名帶有 *GJB2* 基因 c.109G>A 與 c.235delC 之複合異型合子(compound heterozygous)突變，而可能導致聽損。另有 41 名新生兒為隱性變異之偶然帶原者(不致發生聽損)。7 名(3.2%)同型合子或複合異型合子突變之新生兒中，計 3 名通過聽力篩檢，顯示吾人現在所採行之新生兒聽力篩檢流程，有可能遺漏較輕度或晚發性之兒童聽損，而此一部份，似可以耳聾基因篩檢加以補足。

4. 小結

嬰幼兒聽損相當常見，若未及早發現，及早治療，則會影響其以後的語言和智能發展。然而因為大部分病例屬於隱性遺傳，所以多數病人的父母親及其他親友雖然聽力皆為正常，卻可能已帶有一個不正常的基因。吾人所進行的新生兒耳聾基因篩檢，初步結果顯示似可與新生兒聽力篩檢達到相輔相成之功(圖三十九)，而若能事先篩檢出基因的缺陷，不僅可以提供關於聽損致病機轉最直接的證據，對於家族的遺傳諮詢以及這些兒童的後續處理，也可提供珍貴的訊息，以使聽損兒童能及早接受聽語治療，並可透過遺傳諮詢及產前檢查等方式，提供年輕且仍想生育下一胎的家長相關的資訊。

(四) 中程：其他常見耳疾之基因研究

1. 可能與遺傳有關之常見耳疾

遺傳性聽損的研究，固然為內耳解剖學及聽覺生理學的知識帶來革命性的進展，然而在整個聽損人口中，遺傳性聽損畢竟還是屬於相對罕見的疾病。而其他較常見會導致聽力損失的耳疾，如老年性聽損、美尼爾氏症

及耳硬化症等，也或多或少有些證據支持基因因素可能於這些疾病扮演一定的角色。我們相信，由「單基因遺傳疾病」的研究跨足到「多基因遺傳疾病」的研究，是當前醫學遺傳學的潮流，在耳科學亦是如此。目前已知，可能與遺傳有關的常見耳疾臚列於下：

(1) 老年性聽損

老年性聽損(age-related hearing impairment, ARHI)是已開發國家聽力損失最常見的原因。其臨床特徵為伴隨年紀增加的兩側對稱性、漸進性的聽力損失，其中尤以高頻的聲音最常受到影響。老年性聽損不僅阻礙了病人與週遭環境的溝通，減少病人自理生活的能力，也間接影響了病人身邊親友的生活品質。根據歐美的研究，65至75歲的人口中，約有23%罹患聽力損失，而大於75歲的人口中，更有高達40%為聽力損失所苦(Gates et al., 1989)。隨著人口組成的逐年老化，老年性聽損勢必將成為社會之一大負擔，也將是臨床工作者所必須面對之一大挑戰。

較早期的研究，均已證實老年性聽損之可遺傳性。首先，在瑞典所進行的雙胞胎研究中，高頻頻率聽損程度之可遺傳性估計約為0.47(Karlsson et al., 1997)。而其後的研究，也確定了老年性聽損具家族聚集情形—藉由染病同胞對(sibling pairs)及親子三元體(parent-child trios)的分析，研究者發現33~55%的老年性聽損程度之變異，可歸因於遺傳因素(Gates et al., 1999)。而在一泛基因體之連鎖分析的研究，則發現某些染色體片段可能與老年性聽損的發生有關(DeStefano et al., 2003)。另一方面，於老鼠的研究也找出了三個與老年性聽損有關的基因座：*Ahl1* (Johnson et al., 1997)、*Ahl2* (Johnson et al., 2002)與 *Ahl3* (Nemoto et al., 2004)，其中 *Cdh23* 基因已被證實為 *Ahl1* 的致病基因(Noben-Trauth et al., 2003)。

最近，已開始有學者進行「基因關聯研究」(genetic association study)，以尋找與老年性聽損有關之「易感基因」(susceptibility gene)。目前已被發現之基因包括：*NAT2* 基因(Unal et al., 2005; Van Eyken et al., 2007)、*KCNQ4* 基因(Van Eyken et al., 2006)、*APOE* 基因(O'Grady et al., 2007)、*GRHL2* 基因(Van Laer et al., 2008)與 *GRM7* 基因(Friedman et al., 2009)。

(2) 噪音性聽損

噪音所引起的聽力損失，是繼老年性聽損後，已開發國家聽力損失第二常見之原因(Konings et al., 2007)。臨床上可以觀察得到，在同樣的噪音暴露的環境以及條件之下，卻不一定是每個人都患有一樣的聽力損失，這個現象暗示著除了噪音的強度之外，每個人對噪音的感受性，在暴露於噪音的環境時，也決定著聽力受損程度。而每個人對噪音的感受性，則可能取決於個人的基因變異。

目前已知與噪音性聽損有關的基因大致可分為三類：活性氧(reactive oxygen species)代謝相關基因，如 *CAT* 基因(Konings et al., 2007)、鉀離子循環機能相關基因，如 *KCNE1* 和 *KCNQ4* 基因(Pawelczyk et al., 2009)、以及熱休克蛋白(Heat shock protein)相關基因，如 *HSP70* 基因(Konings et al., 2009)。

(3) 耳硬化症

耳硬化症是西方人常見耳疾，其於成年高加索人種之盛行率高達 0.3-0.4%。於少部分家族中，耳硬化症似乎以體染色體顯性方式遺傳；然而基因關聯研究也發現了一些易感基因(Ealy et al., 2009)。由於耳硬化症在東方人相當罕見，故目前於國人並不適合進行基因研究。

(4) 美尼爾氏症

美尼爾氏症是耳鼻喉科常見的疾病之一。病人臨床上會出現眩暈、耳鳴、耳漲及聽損等症狀。目前已知，美尼爾氏病之病理變化為內耳內淋巴水腫，然而，引起內淋巴水腫的原因卻不明。臨床上吾人常見美尼爾氏症病人具家族聚集性(Klockars et al., 2007)；而最近的研究亦顯示，某些特定之基因變異，可能與美尼爾氏症的發生有關(Teggi et al., 2008; Vrabec et al., 2008)。因此，基因因素可能在美尼爾氏病的致病機制上扮演著重要的角色。

(5) 兒童中耳炎

中耳炎是孩童聽力損失最常見的原因，也是上呼吸道感染不容忽視的併發症。臨床上中耳炎已被證實具有家族聚集性(亦即病童之兄弟姊妹亦較易發生中耳炎)。根據歐美最近的研究，兒童中耳炎的確可能與一些基因的變異，如 *FBXO11* 基因的單一核苷酸多型性(SNP)有關(Segade et al., 2006)；而在一泛基因體之連鎖分析的研究，也發現某些染色體片段可能與兒童中耳炎的發生有關(Casselbrant et al., 2009)，因此，兒童中耳炎亦是與遺傳有關之常見耳疾。

2. 我們研究團隊目前已進行之工作

本研究於通過台大醫院倫理委員會的審查後，開始收集老年性聽損、噪音性聽損、美尼爾氏症與兒童中耳炎病例，以建立相關基因庫。特別是在老年性聽損基因庫及噪音性聽損基因庫，簡介於下：

(1) 老年性聽損基因庫

本基因庫之檢體，係採集自台大醫院健康管理中心之健檢者、以及大林慈濟醫院之志工，目前收案個數接近兩千人。

(2) 噪音性聽損基因庫

本基因庫之檢體，係與義守大學附設醫院合作，收集義聯集團鋼鐵廠之噪音暴露工人之檢體，目前收案個數五百餘人。

3. 小結

其他常見耳疾之基因研究，是我們中程的研究規劃之一，我們預計將研究重心之一部分，移轉至這一塊領域。我們希望，在不久的將來，可以將我們由遺傳性聽損的研究所學習到的知識和方法，應用於這些疾病的研究之上，以造福更多的病人。

(五) 中程：利用遺傳性聽損基因檢體庫找尋其他耳聾基因

如前述研究結果，國人特發性感覺神經性聽損病例中，仍有 2/3 的病例，其成因仍屬不明，即使其家族史明顯，仍有一半的病例無法找到原因。因此，我們認為，應有其他耳聾基因導致國人遺傳性聽損。

傳統尋找新基因的方法，係以「連鎖分析」(linkage analysis)為主，若能定位至特定染色體片段，再合併「候選基因方式」(candidate gene approach)之方法，找到致病的耳聾基因。然而，由於我國法律規定不得近親通婚，而且城鄉之間人口流動頻繁，故即使本研究已收集近千個聽損家族，但仍無適當之案例可進行連鎖分析。

惟晚近另發展出一些嶄新的尋找疾病基因之方法。比如說，藉由內耳 cDNA library 合併「候選基因方式」之方法，找出 *CRYM* 基因(Abe et al., 2003)；又比如說，由於基因變異通常會影響基因之表現，故亦有轉化病人白血球為「淋巴球母細胞株」(lymphoblastoid cell line, LCL)並萃取其 RNA，進而以 whole genome expression array 分析所有基因之 RNA 表現、找尋較可能之致病基因(Lesperance et al., presented at 32nd ARO meeting, 2009)。易言之，隨著這些搜尋基因技術之發展，我們未來便有機會由本研究所建立的基因庫，尋找出新的耳聾基因。我們也相信，這些新基因的發現，將可增進吾人對於內耳生理功能的瞭解。

(六) 長程：新型態治療之研發

1. 新型態藥物治療：以質離子幫浦阻斷劑治療 *SLC26A4* 基因突變病人之急性波動性聽損為例

(1) 研究背景

如前所述，帶有 *SLC26A4* 基因突變之病人的臨床特徵主要有二：其一為合併大前庭導水管或 Mondini 氏發育不全等兩種內耳畸形；其二則為波動性的聽力喪失，亦即聽力極易因外在因素如頭部撞擊或其他不明原因而變差，通常經過幾次發作之後，病人之聽損程度就到達了重度或極重度的聽損。關於此類波動性聽力喪失之處理，雖然有一些

傳統的治療方式，例如投與類固醇或降腦壓藥物，然而這些方式皆欠缺確實之基礎醫學依據，以致於治療效果也往往無法預期，於是，*SLC26A4* 基因突變病人臨床上所表現的急性波動性聽損，一直是難解謎題。

另一方面，*SLC26A4* 基因突變病人發生急性波動性聽力喪失之前，聽損程度通常也較輕微，而毛細胞受傷害的程度尚非處於不可逆的狀態，故為投與治療之適當時機。

(2) 相關機制

查閱文獻，吾人發現質離子幫浦(proton pump)在人體內主要可分為兩類：vacuolar type 和 gastric type。在內耳，前者主要分佈於 stria marginal cells、outer hair cells 和 interdental cells(Stankovic et al., 1997)，後者則分佈於 stria intermediate cells、spiral ligament 和 spiral ganglion(Lecain et al., 2000)。而邇近之研究指出，*SLC26A4* 基因所製造的蛋白質—pendrin，在內耳之功能可能為將重碳酸根離子(HCO_3^-)從血管紋(stria vascularis)運送至內淋巴，故若發生突變，將導致血管紋內 pH 值升高，並引起自由基累積及急性聽損(Wangemann et al., 2004)(圖四十)。而質離子幫浦於血管紋之功能，則為將質子從血管紋運送至內淋巴，因此，在質離子幫浦阻斷劑的作用下，恰可防止血管紋內 pH 值的升高(圖四十)。易言之，pendrin 與質離子幫浦，於內耳血管紋內 pH 值的調控上恰具拮抗角色。

(3) 研究規劃

我們計畫將以所培育出 *SLC26A4* 基因變異之基因置換鼠為研究模式，先予進行動物實驗。而我們預計選取質離子幫浦阻斷劑 SCH28080 為實驗用藥，蓋該藥物可於中性環境下發揮作用，且已被確定可投與並作用於內耳(Shibata et al., 2006)。

若質離子幫浦阻斷劑確實可用以回復 *SLC26A4* 基因變異基因置換鼠之聽力，則再規劃進行臨床試驗。

2. 基因治療

由於內耳是被顛骨緊密包住的，故一般認為，於內耳進行基因治療較無散播病毒至其他身體組織之虞，相對較為安全。而基因治療在耳科領域的發展，一開始並未侷限於遺傳性聽損，而係被用以回復受損之毛細胞(Izumikawa et al., 2005)。然而，遺傳性聽損肇因於單基因之缺陷，若能直接給予正常基因以彌補之，理論上應為一個相當合理的治療選擇。文獻上亦有成功之報告(Ahmad et al., 2007)。

3. 幹細胞治療

近年來再生醫學蓬勃發展，幹細胞的研究用以治療人體相當多器官組織病變，提供了另一種醫療方式。在耳科研究的再生醫學領域，國外學者已提出種種方式利用幹細胞植入來取代受損的內耳毛細胞與聽神經，並得到相當程度的研究結果(Brigande et al., 2009)。惟於遺傳性聽損病人，由於其體內所有細胞均帶相同之基因缺陷，所以並無法仰賴其內耳之內源性幹細胞再生為正常細胞，而必須由外植入幹細胞。

(七) 長程：公共衛生政策—將聽損基因檢測推廣至一般民眾？

由於遺傳性聽損多為體染色體隱性遺傳，通常基因變異之帶因者本身並無症狀，亦無家族史，然而，當兩個帶因者結婚後，所生下的子代卻有 1/4 的機會，將發生聽損。故若能從族群中找出帶因者，進而給予適當之婚前衛教以及婚後遺傳諮詢，將可防免生育出聽損的下一代，而大大地降低國人特發性感覺神經性聽損的盛行率。

依照經驗法則，基因變異的檢測成本將隨著醫療生技的進展而迅速降低。而如前所述及，國人一般族群中有相當比例之人口為 *GJB2* 基因變異與 *SLC26A4* 基因變異的帶因者。就成本與效益之考量，我們認為，在可預見的未來，將聽損基因檢測推廣至一般民眾，以檢測出帶因者，將成為合理的公共衛生政策。由種族優生學的角度觀之，吾人亦樂見此一日之到來。

(八) 結論

誠如美國「國家耳聾及其他溝通疾病研究機構」(National Institute on Deafness and Other Communication Disorder) Battey 博士所說，我們現在正進入一個解決聽覺問題的新黃金時代，不論是我們對於聽覺功能的基本瞭解、我們做出正確診斷的能力、以及我們能給予病人的適當處理，與過去相較都有長足的進步。我們希望，能持續之前的研究，與世界上其他團隊一起努力，一同為全世界人類福祉做出貢獻。

七、論文英文簡述

PART I. Genetic epidemiology and molecular pathology of hereditary hearing impairment

Outlines

1. Genetic epidemiology of common deafness genes in Taiwanese
2. *SLC26A4* mutations and the pathogenetic mechanisms
 - A. *SLC26A4* mutations in humans
 - B. *SLC26A4* mutations in mice
3. *GJB2* mutations and the pathogenetic mechanisms
 - A. The p.V37I variant vs. idiopathic sensorineural hearing impairment
 - B. The p.V37I variant vs. age-related hearing impairment
4. Mitochondrial 12S rRNA mutations and the pathogenetic mechanisms

1. **Genetic epidemiology of common deafness genes in Taiwanese: Prospective mutation screening of three common deafness genes in a large Taiwanese cohort with idiopathic bilateral sensorineural hearing impairment reveals a difference in the results between families from hospitals and those from rehabilitation facilities.**

Background

Molecular genetic analysis provides us with a powerful tool in approaching patients with sensorineural hearing loss of unknown cause. Among a plethora of deafness genes discovered in the past decade, certain genes are more important than others from an epidemiologic perspective. These genes include *GJB2*, *SLC26A4* and mitochondria 12S rRNA gene. Not only do the mutations of these genes demonstrate a universal distribution, but the frequencies of these mutations in the hearing-impaired population are also much higher than the frequencies of other mutations. One of the most important findings that we have learned from past years' researches is that different ethnic groups showed different mutation spectra for each deafness gene. Consequently, establishment of a database for each ethnic group becomes indispensable, and the ethnic background should be considered whenever genetic counseling for hereditary hearing impairment is

performed.

Accurate epidemiological data of common deafness genes are essential to improve the efficiency and the cost of molecular diagnosis. They may depend on several factors, including a clear delineation of the source of patients being studied. In the present study, we hypothesize that idiopathic sensorineural hearing-impaired patients of different sources might reveal discrepancies in the epidemiological results of genetic screening, because patients of different sources might demonstrate distinct clinical or audiologic features and thus result in biased selection of subjects.

To elucidate the relative importance of mutations of the common deafness genes in the Taiwanese population and to verify our hypothesis, we conducted a prospective project screening mutations in *GJB2*, *SLC26A4* and the mitochondria 12S rRNA gene in families with idiopathic bilateral sensorineural hearing loss, and compared the prevalence of common mutations between families of different sources.

Patients and Methods

We conducted a prospective project screening mutations in *GJB2*, *SLC26A4* and mitochondria 12S rRNA gene in a total of 420 Taiwanese families with idiopathic bilateral sensorineural hearing loss, of which 325 families were recruited from hospitals and 95 from hearing rehabilitation facilities. Allele frequencies of common mutations in these three genes and distributions of the corresponding genotypes were then compared between the two groups.

Results

The allele frequencies of variants in *SLC26A4*, *GJB2* and mitochondria 12S rRNA in the probands of the 420 families were 14.4%, 21.7% and 3.8%, respectively. The allele frequency of *SLC26A4* mutations in the hospital group was significantly higher than that in the rehabilitation facility group (16.2% vs. 8.4%, chi-square test, $p < 0.05$); whereas no difference in the frequencies of *GJB2* variants and mitochondria 12S rRNA variants was found between the two groups. Distributions of probands classified by *SLC26A4* genotypes were also different between the two groups (chi-square test, $p < 0.05$). Accordingly, a discrepancy in the genetic screening results might exist between different sources of idiopathic hearing-impaired patients. Further analysis of audiological results and construction of a logistic regression model showed that different audiological features, namely hearing levels and hearing loss patterns, might be responsible for the unequal distributions of mutations and probands between the hospital and rehabilitation facility groups.

Conclusion

The source of patients might affect the results of genetic screening for idiopathic hearing impairment. Patient source should therefore always be labeled with clarity when the results of genetic epidemiological studies for idiopathic hearing impairment are being reported.

2. **SLC26A4 mutations and the pathogenetic mechanisms**

A. **SLC26A4 mutations in humans: Phenotypic analyses and mutation screening of the SLC26A4 and FOXI1 genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome.**

Background

Recessive mutations in the *SLC26A4* gene are responsible for non-syndromic enlarged vestibular aqueduct (EVA) and Pendred syndrome. However, in some affected families, only one or zero mutated allele can be identified, together with the fact that there is no clear correlation between *SLC26A4* genotypes and clinical phenotypes, hampering the accuracy of genetic counseling. To elucidate the genetic composition of non-syndromic EVA and Pendred syndrome, we screened related genomic fragments for genetic variants in a large Taiwanese cohort and analyzed the phenotypic and genotypic results.

Patients and Methods

We used direct sequencing and quantitative polymerase chain reaction (PCR) to screen 101 families with non-syndromic EVA or Pendred syndrome for mutations in the *SLC26A4* coding regions. For those with zero or one mutation detected, genetic variants were then screened in the *SLC26A4* promoter and the *FOXI1* transcription factor gene. Meanwhile, the phenotypes, including the radiological findings, the presence of goiters and the audiological results were correlated with the genotypes. Haplotypes of the *SLC26A4* alleles without mutations detected were also investigated to explore mutations in non-coding regions.

Results

Mutation screening in the *SLC26A4* coding regions detected two mutations in 63 (62%) families, one mutation in 24 (24%) families and no mutation in 14 (14%) families. The radiological findings, the presence of goiters and the audiological results were not different among probands (i.e. index cases of the families) with different *SLC26A4* genotypes. Specifically, probands heterozygous for *SLC26A4* mutations demonstrated clinical features

indistinguishable from those with two mutated alleles, implicating that there might be undetected mutations. However, except for a variant (c.-2554G>A of *SLC26A4*) with possible pathological consequences, no definite mutation was detected after extensive screening in the *SLC26A4* promoter and *FOXII*. In other words, most Taiwanese families with non-syndromic EVA or Pendred syndrome might not result from aberrance in the transcriptional control of *SLC26A4* by *FOXII*. Meanwhile, exploration of undetected mutations in the *SLC26A4* non-coding regions revealed 9 divergent haplotypes among the 21 no-mutation-detected *SLC26A4* alleles of the c.919-2A>G heterozygotes, indicating that there might be no common and predominant mutations in the *SLC26A4* introns.

Conclusion

There is no significant difference in phenotypes among patients with different *SLC26A4* genotypes. The similarity in clinical features between probands with one mutation and those with two mutations and the co-segregation of the mutation with the phenotype in pedigrees indicate the presence of undetected mutations. The transcriptional control of *SLC26A4* by *FOXII* appears to contribute minimally to non-syndromic EVA or Pendred syndrome in Taiwanese. The divergence of haplotypes of the no-mutation-detected *SLC26A4* alleles excludes the possibility of predominant founder intronic mutations.

B. *SLC26A4* mutations in mice: Characterization of phenotypes in knock-in mice with *SLC26A4* c.919-2A>G mutation.

Background

Recessive mutations in *SLC26A4* are responsible for non-syndromic enlarged vestibular aqueduct (EVA) and Pendred syndrome (PS), two disorders commonly encountered in children with hearing impairment. Among more than 100 *SLC26A4* mutations identified to date, c.919-2A>G is by far the most prevalent mutation in Taiwanese, and the second most prevalent in Japanese. In the present study, we established a knock-in mouse model homozygous for the c.919-2A>G mutation, *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}, and explored the associated audiological and vestibular phenotypes.

Materials and Methods

The phenotypes of *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} were characterized by behavioral observations, audiological assessment using auditory brainstem response (ABR)

and distortion production otoacoustic emissions (DPOAE), and balance assessment using rotarod testing. Inner ear morphology was investigated using H&E staining, fluorescence confocal microscopy and electron microscopy.

Result

45% of the *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} mice demonstrated pronounced head tilting and circling behaviors, as well as severely impaired balancing ability on rotarod testing. All *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} mice revealed profound hearing loss (> 120 dB SPL) on ABR and absent OAEs at 3 weeks. Histological studies using H&E staining showed enlarged endolymphatic duct and sac, endolymphatic hydrops in the cochlea, and atrophy of stria vascularis. Fluorescence confocal microscopy and electron microscopy demonstrated degeneration of hair cells in the organ of Corti.

Conclusion

Preliminary characterization of the *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} mice revealed phenotypes reminiscent of those observed in the human counterpart. The *Slc26a4*^{tm1Dontuh/ tm1Dontuh} mice might thus serve as a good animal model for patients segregating *SLC26A4* mutations, and can be utilized for therapeutic researches in the future.

3. GJB2 mutations and the pathogenetic mechanisms

A. The p.V37I variant vs. idiopathic sensorineural hearing impairment: Pathogenetic role of the deafness-related p.V37I variant of GJB2: evidences from a large clinical cohort, cell-line studies and the knock-in mouse model.

Background

p.V37I, a *GJB2* allele with debatable pathogenicity frequently identified in East Asians, was reported to contribute to mild-to-moderate sensorineural hearing impairment (SNHI). The purpose of the study is to elucidate the pathogenicity of p.V37I through investigations in a clinical cohort, cell-lines and the knock-in mouse model.

Methods and Materials

A total of 732 unrelated Han Chinese patients with idiopathic non-syndromic SNHI and 1005 Han Chinese controls were enrolled. According to the GENDEAF criteria, 356 were classified as severe-to-profound SNHI, and 376 were classified as mild-to-moderate SNHI. The allele frequencies and genotype distributions of p.V37I were compared among the groups, and the

corresponding phenotypes were analyzed. The pathogenetic mechanisms of p.V37I were then investigated in cell-lines by transfecting HCx26wt and the p.V37I variant into HeLa cells. A knock-in mouse model homozygous for p.V37I, *Gjb2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}, was also established.

Results

Allele frequencies of p.V37I in these two groups and the controls were 12.8%, 30.3% and 9.2%, respectively (chi-square test, $p < 0.001$). Both patients with severe-to-profound SNHI and those with mild-to-moderate SNHI revealed a deviated genotype distribution from estimation (chi-square goodness-of-fit test, both $p < 0.001$). Homozygosity for p.V37I was identified in 77 (20.5%) and 9 (2.5%) patients with mild-to-moderate and severe-to-profound SNHI, respectively, and co-segregated with the phenotypes of SNHI in 56 kindreds. Further mutation screening in the *GJB2* promoter and *GJB6* coding regions did not detect sequence variants in the 86 p.V37I homozygotes, excluding the possibility of a near-by mutation in linkage disequilibrium with p.V37I. HeLa cells transfected with p.V37I expressed protein levels comparable to those transfected with HCx26wt, but were less able to form clear junctional plaques and demonstrated a less permeability for intercellular dye transfer. Preliminary characterization of the audiological phenotype in *Gjb2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} revealed near-normal hearing levels at 4 weeks.

Conclusion

Homozygosity for *GJB2* p.V37I allele is strongly associated with idiopathic mild-to-moderate sensorineural hearing impairment in Taiwanese, and demonstrates a diverse spectrum of audiological phenotypes. Further functional genetic studies in cell lines and knock-in mice indicated that p.V37I might mildly impact the function of connexin26.

B. The p.V37I variant vs. age-related hearing impairment: The contribution of *GJB2* (*Connexin26*) variant alleles to age-related hearing impairment.

Background

Age-related hearing impairment (ARHI), the most common form of hearing impairment in humans, is a complex disease caused by an interaction between environmental and genetic factors. It has been postulated that genes leading to monogenic hearing impairment might also be susceptibility genes for ARHI. The purpose of this study is to investigate the association between ARHI and variant alleles of *GJB2*, of which the mutations are the most important cause

of monogenic hearing impairment worldwide.

Patients and Methods

A total of 1005 Taiwanese volunteers (all were Han Chinese, aged 40 to 80 y) were included in the analyses, and were classified into controls (the 1/3 subjects with better hearing, n=335) or cases (the 1/3 subjects with worse hearing, n=335) according to the Z_{low} , Z_{4-tone} and Z_{high} scores converted from their original frequency-specific hearing thresholds. Seven sequence variants in the coding region of *GJB2*, including c.79G>A, c.109G>A, c.235delC, c.299_300delAT, c.341A>G, c.368C>A and c.608T>C, were genotyped and then correlated to the audiological phenotypes.

Results

Among the 7 sequence variants, genotype distributions of the c.109G>A allele were different between cases and controls classified according to the Z_{low} and Z_{4-tone} scores (Fisher's exact test, $p < 0.05$). Further analyses revealed subjects with the *AA* genotype demonstrated significantly higher Z_{low} , Z_{4-tone} and Z_{high} scores than those with the *GA* or *GG* genotype (ANOVA with post hoc Tukey multiple comparison procedure, all $p < 0.001$). The *AA* genotype was still significantly associated with ARHI after other non-genetic factors had been adjusted by logistic regression models. Accordingly, the c.109A allele of *GJB2* might contribute to ARHI in Han Taiwanese via a recessive mode.

Conclusion

The association between *GJB2* and ARHI supports the hypotheses that genes responsible for monogenic hearing impairment and genes regulating the potassium homeostasis in the inner ear might be susceptibility genes for ARHI. The significant variety in the audiological phenotypes of subjects homozygous for c.109A implicates the presence of other factors modulating the development of ARHI.

4. Mitochondrial 12S rRNA mutations and the pathogenetic mechanisms: Prevalence and clinical features of the mitochondrial m.1555A>G mutation in Taiwanese patients with idiopathic sensorineural hearing loss and association of haplogroup F with low penetrance in three families.

Background

The m.1555A>G mutation in the mitochondria 12S rRNA gene has been reported to be an important cause of non-syndromic hereditary hearing loss. However, remarkable inter-familial and intra-familial variations in the phenotypes of the

mutation preclude precise prognosis during genetic counseling. Hence, this study was performed to explore the factors which might contribute to the differences in the phenotypes, including aminoglycoside exposure, mutation load and mitochondrial DNA (mtDNA) background. Also reported were the prevalence and the clinical features of the m.1555A>G mutation in hearing-impaired Taiwanese patients.

Patients and Methods

Mutations in the 12S rRNA gene were screened in a panel of 315 unrelated Taiwanese families with idiopathic sensorineural hearing loss. Clinical features in families with m.1555A>G mutation were analyzed, and the roles of aminoglycoside exposure, mutation load and mtDNA background in disease expression were investigated. Penetrance was then compared among families with different mtDNA backgrounds.

Results

The m.1555A>G mutation was identified in a total of ten (3.2%) families, and was characterized clinically by progressive, post-lingual and bilaterally symmetric sensorineural hearing loss and normal temporal bone radiological results. The m.1555A>G mutation was homoplasmic (i.e. all the mitochondrial DNA carries the mutation) in all matrilineal relatives in these 10 pedigrees. Among the 44 hearing-impaired relatives of the 10 pedigrees, only two recalled definite episodes of aminoglycoside-induced hearing loss. mtDNA backgrounds in these 10 families could be categorized into 6 main haplogroups (A, B, D, F, M7, N*), including three families belonging to haplogroup F, two belonging to haplogroup A, two belonging to haplogroup M7, and three belonging to haplogroups B, N* and D, respectively. Penetrance differed among various haplogroups, and certain haplogroups appeared to be associated with a lower penetrance, like the three haplogroup F families, in which the penetrance ranged from 13 to 33%. Further analysis confirmed a heterogeneous distribution of hearing-impaired subjects among various haplogroups (chi-square test, $p = 0.018$).

Conclusion

The mitochondrial m.1555A>G mutation accounted for 3.2% of the Taiwanese families (0% of the simplex families and 11% of multiplex families respectively) with sensorineural hearing impairment of unknown etiology. Since it was identified in a variety of mtDNA backgrounds, the mutation appeared to arise from multiple origins in Taiwanese. As subjects with various haplogroups demonstrated different penetrance, mtDNA background might exert effects on the disease expression of the m.1555A>G mutation.

PART II. Novel clinical applications of genetic examination in the field of hereditary hearing impairment

Outlines

1. Role of genetic diagnosis in predicting the outcome after cochlear implantation
2. Development of an efficient and low-cost diagnostic tool to promote genetic examination in Taiwanese patients with hearing impairment
3. Application of pre-implantation genetic diagnosis (PGD) to hereditary hearing impairment

1. **Role of genetic diagnosis in predicting the outcome after cochlear implantation in children: Genetic diagnosis and imaging results are the predominant predictors determining the speech perception performance outcome after cochlear implantation in Children.**

Background

Research over time has shown that early identification of hearing loss followed by rehabilitation procedures, such as hearing aid usage commencing during the first 6 months of life, significantly increases the level of language development, speech intelligibility and emotional stability. For those who get limited benefits from hearing aids and fail to reach communication milestones because of the severity of their hearing impairment, cochlear implantation has been demonstrated to be an effective intervention and is currently regarded as the treatment of last resort. Bypassing the sensory organ of the inner ear, cochlear implants (CI) activate auditory nerve fibers directly, transmitting auditory signals through the central neural pathway and ultimately yielding speech understanding in the cortex. The performance outcome with CI, however, varies significantly among implantees. A plethora of factors, including age of implantation, duration of implant use, amount of residual hearing, primary mode of communication before operation, and presence of certain inner ear malformations (IEMs) such as narrow internal auditory canal (IAC), have been proposed to influence the outcome. Still, a panoramic prediction of CI results remains unavailable thus far, largely because pediatric SNHI is extremely heterogeneous in its etiology. As an invasive and expensive surgical procedure, identification of the most crucial predictors of CI outcome is of paramount importance, since it may help steer appropriate rehabilitation programs and expectations by clinical workers, schools and families. The purpose of the study is to investigate the roles of genetic diagnosis, image

results, as well as other prognostic factors in predicting the long-term outcome with cochlear implant (CI) in children.

Patients and Methods

The study prospectively enrolled 67 consecutive implantees who had a minimum of 3 years' experience with the device. Image results of inner ear were obtained, and mutations were screened in 3 genes commonly associated with hearing impairment: *GJB2*, *SLC26A4* and the mitochondria 12S rRNA gene. Speech perception performance, expressed by speech recognition scores of 5 parameters, was compared according to genetic diagnosis and image results, respectively. General linear model was constructed to testify the predicting values of specific genetic and image results after adjusting other prognostic factors.

Results

Twenty-two (33%) children harbored genetic mutations, including 18 with *SLC26A4* mutations and 4 with *GJB2* mutations. When classified by image findings, 33 (49%) children revealed inner ear malformations (IEMs), inclusive of 9 with narrow internal auditory canal (IAC) and 24 with other IEMs. Children with *SLC26A4* or *GJB2* mutations exhibited excellent speech recognition scores, whereas children with narrow IAC performed more poorly as compared to those with other IEMs or those without IEMs. General linear model confirmed that both narrow IAC and *SLC26A4* mutations correlated with the speech perception outcome, indicating that genetic diagnosis and image results are the two predominant factors determining the outcome with CI.

Conclusion

In pediatric CI candidates, both genetic examination and image study might be included in the battery of pre-operative evaluations before proceeding to implantation.

- 2. Development of an efficient and low-cost diagnostic tool to promote genetic examination in Taiwanese patients with hearing impairment: Application of SNaPshot[®] multiplex assays for simultaneous multigene mutation screening in patients with idiopathic sensorineural hearing impairment.**

Background

The genetic basis of idiopathic non-syndromic SNHI is particularly heterogeneous, making the efficient molecular diagnosis of individual patients challenging. More than 100 genes are associated with deafness, and to date, at least 46 genes have been identified to cause non-syndromic hereditary hearing impairment (The

Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>). Although mutations in certain genes including *GJB2*, *SLC26A4* and the mitochondrial 12SrRNA gene have been shown to be much more prevalent than other genes in many populations, comprehensive screening of mutations in these genes using conventional genotyping techniques, such as direct sequencing, remains a laborious task. Based on genetic epidemiological data obtained from previous studies, several high throughput strategies like microarray technology and the Invader assay, have been developed to help screen for mutations. Since both the mutation spectra and the complexity of the mutation spectra in common deafness-associated genes differ among populations, it is possible that each population might require a different strategy for optimal rapid genetic examination. The purpose of the study is to develop a cost-effective and robust genetic diagnostic tool for patients with idiopathic non-syndromic sensorineural hearing impairment.

Patients and Methods

Twenty common sequence variants in *GJB2*, *SLC26A4*, and the mitochondrial 12S rRNA gene were selected based on our previous epidemiological study. These variants were analyzed using the SNaPshot technique. The efficacies of the SNaPshot multiplex assays were determined by using a prospective cohort composed of 214 unrelated Taiwanese patients with idiopathic sensorineural hearing impairment. The results of the assays were compared to the results obtained by direct sequencing.

Results

We developed a diagnostic technique consisting of two consecutive panels of SNaPshot multiplex assays, with each panel screening 10 common sequence variants. Theoretically, this design can detect more than 98% of the known deafness-associated sequence variants in Taiwanese individuals. A total of 126 (58.9%) patients were diagnosed as having at least one sequence variant using the SNaPshot multiplex assays. In total, the SNaPshot assays yielded an accuracy of more than 99%.

Conclusion

The strengths of SNaPshot multiplex assays include high accuracy, high sensitivity, high flexibility (the examination panel can be easily expanded for additional mutations), low cost (<10 US dollars per patient), and easy implementation for any institute with a DNA sequencer. Although only 20 to 30 mutations can be examined in two to three runs of the SNaPshot assay, this technology may be suitable for first-pass screening of deafness-associated mutations in populations with a relatively homogeneous ethnic background.

3. **Application of pre-implantation genetic diagnosis (PGD) to hereditary hearing impairment: Pre-implantation genetic diagnosis (embryo screening) for enlarged vestibular aqueduct due to *SLC26A4* mutation.**

Background

Once the mutations responsible for deafness in a family are confirmed, pre-natal diagnosis (PND) using chorionic villus sampling or amniocentesis can be performed to screen and subsequently terminate an affected pregnancy. However, PND is not an acceptable option to many families for ethical, psychological or religious reasons. For these families, pre-implantation genetic diagnosis (PGD) offers an alternative, with the opportunity of beginning a pregnancy with a disease-free embryo, thus circumventing the need for late diagnosis and termination. PGD has been performed for many monogenic disorders, including cystic fibrosis, beta-thalassemia, myotonic dystrophy, Huntington's disease and fragile X syndrome. However, the application of PGD to hereditary hearing impairment has not been explored.

Patients and Methods

In the present study, we reported the development and application of PGD protocols to address enlarged vestibular aqueduct (EVA), which is a common type of hereditary hearing impairment associated with mutations in the *SLC26A4* gene. The family requesting PGD had a history of EVA, segregating the *SLC26A4* c.919-2A>G mutation. In short, the PGD process was composed of two steps: the development of a single-cell testing protocol and clinical PGD cycles (i.e., selection and implantation of unaffected embryos using the single-cell testing protocol).

Results

First, protocols for genetic testing in a single cell were established for the c.919-2A>G mutation using GenomiPhi technology and primer extension mini-sequencing. These protocols were validated on single lymphocytes collected from both parents and their affected child. Two clinical PGD cycles were then performed for the parents, with the second cycle successfully leading to a singleton pregnancy. The baby was homozygous for the wild type *SLC26A4* allele and revealed a normal audiological phenotype after birth.

Conclusion

To our knowledge, there has not ever been reported in the literature describing successful PGD in families with genetic hearing impairment. In our opinion, the

application of PGD in the field of hereditary hearing impairment involves fewer ethical controversies than other novel applications of PGD and traditional indications for PGD for other monogenic diseases. Therefore, the approach demonstrated in the present study can also be used in a large number of families with other types of hereditary hearing impairment.





八、参考文献

- Abe, S., Yamaguchi, T., Usami, S. 2007. Application of deafness diagnostic screening panel based on deafness mutation/gene database using invader assay. *Genet Test* 11, 333-40.
- Abe, S., Kelley, P.M., Kimberling, W.J., Usami, S.I. 2001. Connexin 26 gene (GJB2) mutation modulates the severity of hearing loss associated with the 1555A-->G mitochondrial mutation. *Am J Med Genet* 103, 334-8.
- Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Kelley, P.M., Kimberling, W.J. 2000. Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 37, 41-3.
- Abe, S., Katagiri, T., Saito-Hisaminato, A., Usami, S., Inoue, Y., Tsunoda, T., Nakamura, Y. 2003. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. *Am J Hum Genet* 72, 73-82.
- Abe, S., Usami, S., Shinkawa, H., Weston, M.D., Overbeck, L.D., Hoover, D.M., Kenyon, J.B., Horai, S., Kimberling, W.J. 1998. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in Japanese pedigrees of sensorineural hearing loss associated with the A1555G mutation. *Eur J Hum Genet* 6, 563-9.
- Adato, A., Weil, D., Kalinski, H., Pel-Or, Y., Ayadi, H., Petit, C., Korostishevsky, M., Bonne-Tamir, B. 1997. Mutation profile of all 49 exons of the human myosin VIIA gene, and haplotype analysis, in Usher 1B families from diverse origins. *Am J Hum Genet* 61, 813-21.
- Ahmad, S., Tang, W., Chang, Q., Qu, Y., Hibshman, J., Li, Y., Sohl, G., Willecke, K., Chen, P., Lin, X. 2007. Restoration of connexin26 protein level in the cochlea completely rescues hearing in a mouse model of human connexin30-linked deafness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1337-41.
- Albert, S., Blons, H., Jonard, L., Feldmann, D., Chauvin, P., Loundon, N., Sergent-Allaoui, A., Houang, M., Joannard, A., Schmerber, S., Delobel, B., Leman, J., Journal, H., Catros, H., Dollfus, H., Eliot, M.M., David, A., Calais,

C., Drouin-Garraud, V., Obstoy, M.F., Tran Ba Huy, P., Lacombe, D., Duriez, F., Francannet, C., Bitoun, P., Petit, C., Garabedian, E.N., Couderc, R., Marlin, S., Denoyelle, F. 2006. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet* 14, 773-9.

Anagnostopoulos, A.V. 2002. A compendium of mouse knockouts with inner ear defects. *Trends Genet* 18, 499.

Antonelli, P.J., Varela, A.E., Mancuso, A.A. 1999. Diagnostic yield of high-resolution computed tomography for pediatric sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 109, 1642-7.

Azaiez, H., Yang, T., Prasad, S., Sorensen, J.L., Nishimura, C.J., Kimberling, W.J., Smith, R.J. 2007. Genotype-phenotype correlations for SLC26A4-related deafness. *Hum Genet*. 122, 451-7.

Bacino, C., Prezant, T.R., Bu, X., Fournier, P., Fischel-Ghodsian, N. 1995. Susceptibility mutations in the mitochondrial small ribosomal RNA gene in aminoglycoside induced deafness. *Pharmacogenetics* 5, 165-72.

Balciuniene, J., Dahl, N., Borg, E., Samuelsson, E., Koisti, M.J., Pettersson, U., Jazin, E.E. 1998. Evidence for digenic inheritance of nonsyndromic hereditary hearing loss in a Swedish family. *Am J Hum Genet* 63, 786-93.

Ballana, E., Morales, E., Rabionet, R., Montserrat, B., Ventayol, M., Bravo, O., Gasparini, P., Estivill, X. 2006. Mitochondrial 12S rRNA gene mutations affect RNA secondary structure and lead to variable penetrance in hearing impairment. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 950-7.

Bardien, S., Human, H., Harris, T., Hefke, G., Veikondis, R., Schaaf, H.S., van der Merwe, L., Greinwald, J.H., Fagan, J., de Jong, G. 2009. A rapid method for detection of five known mutations associated with aminoglycoside-induced deafness. *BMC Med Genet* 10, 2.

Batthey, J.F., Jr. 2003. Using genetics to understand auditory function and improve diagnosis. *Ear Hear* 24, 266-9.

- Belintani Piatto, V., Maria Goloni Bertollo, E., Lucia Sartorato, E., Victor Maniglia, J. 2004. Prevalence of the GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) mutation in Brazilian patients with deafness. *Hear Res* 196, 87-93.
- Beltramello, M., Piazza, V., Bukauskas, F.F., Pozzan, T., Mammano, F. 2005. Impaired permeability to Ins(1,4,5)P₃ in a mutant connexin underlies recessive hereditary deafness. *Nature cell biology* 7, 63-9.
- Beltramello, M., Bicego, M., Piazza, V., Ciubotaru, C.D., Mammano, F., D'Andrea, P. 2003. Permeability and gating properties of human connexins 26 and 30 expressed in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 1024-33.
- Belyantseva, I.A., Boger, E.T., Naz, S., Frolenkov, G.I., Sellers, J.R., Ahmed, Z.M., Griffith, A.J., Friedman, T.B. 2005. Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nature cell biology* 7, 148-56.
- Bicego, M., Beltramello, M., Melchionda, S., Carella, M., Piazza, V., Zelante, L., Bukauskas, F.F., Arslan, E., Cama, E., Pantano, S., Bruzzone, R., D'Andrea, P., Mammano, F. 2006. Pathogenetic role of the deafness-related M34T mutation of Cx26. *Hum Mol Genet* 15, 2569-87.
- Boeda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., Perfettini, I., Fath, K.R., Shorte, S., Reiners, J., Houdusse, A., Legrain, P., Wolfrum, U., Richardson, G., Petit, C. 2002. Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *Embo J* 21, 6689-99.
- Brigande, J.V., Heller, S. 2009. Quo vadis, hair cell regeneration? *Nat Neurosci* 12, 679-85.
- Brown, M.D., Sun, F., Wallace, D.C. 1997. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet* 60, 381-7.
- Bykhovskaya, Y., Estivill, X., Taylor, K., Hang, T., Hamon, M., Casano, R.A., Yang, H., Rotter, J.I., Shohat, M., Fischel-Ghodsian, N. 2000. Candidate locus for a nuclear modifier gene for maternally inherited deafness. *Am J Hum Genet* 66,

1905-10.

Campbell, C., Cucci, R.A., Prasad, S., Green, G.E., Edeal, J.B., Galer, C.E., Karniski, L.P., Sheffield, V.C., Smith, R.J. 2001. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* 17, 403-11.

Cassandrini, D., Calevo, M.G., Tessa, A., Manfredi, G., Fattori, F., Meschini, M.C., Carozzo, R., Tonoli, E., Pedemonte, M., Minetti, C., Zara, F., Santorelli, F.M., Bruno, C. 2006. A new method for analysis of mitochondrial DNA point mutations and assess levels of heteroplasmy. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 387-93.

Casselbrant, M.L., Mandel, E.M., Jung, J., Ferrell, R.E., Tekely, K., Szatkiewicz, J.P., Ray, A., Weeks, D.E. 2009. Otitis media: a genome-wide linkage scan with evidence of susceptibility loci within the 17q12 and 10q22.3 regions. *BMC Med Genet* 10, 85.

Chang, Q., Tang, W., Ahmad, S., Zhou, B., Lin, X. 2008. Gap junction mediated intercellular metabolite transfer in the cochlea is compromised in connexin30 null mice. *PLoS One* 3:e4088. Epub 2008 Dec 31.

Chen, S.U., Su, Y.N., Fang, M.Y., Chang, L.J., Tsai, Y.Y., Lin, L.T., Lee, C.N., Yang, Y.S. 2008. PGD of beta-thalassaemia and HLA haplotypes using OmniPlex whole genome amplification. *Reprod Biomed Online* 17, 699-705.

Chiu, Y.S., Wu, C.C., Lu, Y.C., Chen, P.J., Lee, W.Y., Liu, A.Y.Z., Hsu, C.J. 2010. Mutations of the *OTOF* gene in Taiwanese patients with auditory neuropathy. *Audiol Neurotol*; in press.

Choi, B.Y., Madeo, A.C., King, K.A., Zalewski, C.K., Pryor, S.P., Muskett, J.A., Nance, W.E., Butman, J.A., Brewer, C.C., Griffith, A.J. 2009. Segregation of enlarged vestibular aqueducts in families with non-diagnostic SLC26A4 genotypes. *J Med Genet* 46, 856-61.

Cremers, F.P., Kimberling, W.J., Kulm, M., de Brouwer, A.P., van Wijk, E., te Brinke, H., Cremers, C.W., Hoefsloot, L.H., Banfi, S., Simonelli, F., Fleischhauer, J.C., Berger, W., Kelley, P.M., Haralambous, E., Bitner-Glindzicz, M., Webster,

- A.R., Saihan, Z., De Baere, E., Leroy, B.P., Silvestri, G., McKay, G.J., Koenekoop, R.K., Millan, J.M., Rosenberg, T., Joensuu, T., Sankila, E.M., Weil, D., Weston, M.D., Wissinger, B., Kremer, H. 2007. Development of a genotyping microarray for Usher syndrome. *J Med Genet* 44, 153-60.
- Cryns, K., Orzan, E., Murgia, A., Huygen, P.L., Moreno, F., del Castillo, I., Chamberlin, G.P., Azaiez, H., Prasad, S., Cucci, R.A., Leonardi, E., Snoeckx, R.L., Govaerts, P.J., Van de Heyning, P.H., Van de Heyning, C.M., Smith, R.J., Van Camp, G. 2004. A genotype-phenotype correlation for GJB2 (connexin 26) deafness. *J Med Genet* 41, 147-54.
- Cullen, R.D., Higgins, C., Buss, E., Clark, M., Pillsbury, H.C., 3rd, Buchman, C.A. 2004a. Cochlear implantation in patients with substantial residual hearing. *Laryngoscope* 114, 2218-23.
- Cullen, R.D., Buchman, C.A., Brown, C.J., Copeland, B.J., Zdanski, C., Pillsbury, H.C., 3rd, Shores, C.G. 2004b. Cochlear implantation for children with GJB2-related deafness. *Laryngoscope* 114, 1415-9.
- Dahl, H.H., Wake, M., Sarant, J., Poulakis, Z., Siemering, K., Blamey, P. 2003. Language and speech perception outcomes in hearing-impaired children with and without connexin 26 mutations. *Audiol Neurootol* 8, 263-8.
- Dahl, H.H., Tobin, S.E., Poulakis, Z., Rickards, F.W., Xu, X., Gillam, L., Williams, J., Saunders, K., Cone-Wesson, B., Wake, M. 2006. The contribution of GJB2 mutations to slight or mild hearing loss in Australian elementary school children. *J Med Genet* 43, 850-5.
- Dai, P., Yu, F., Han, B., Liu, X., Wang, G., Li, Q., Yuan, Y., Huang, D., Kang, D., Zhang, X., Yuan, H., Yao, K., Hao, J., He, J., He, Y., Wang, Y., Ye, Q., Yu, Y., Lin, H., Liu, L., Deng, W., Zhu, X., You, Y., Cui, J., Hou, N., Xu, X., Zhang, J., Tang, L., Song, R., Lin, Y., Sun, S., Zhang, R., Wu, H., Ma, Y., Zhu, S., Wu, B.L., Han, D., Wong, L.J. 2009. GJB2 mutation spectrum in 2,063 Chinese patients with nonsyndromic hearing impairment. *J Transl Med* 7, 26.
- Dalamon, V., Beheran, A., Diamante, F., Pallares, N., Diamante, V., Elgoyhen, A.B. 2005. Prevalence of GJB2 mutations and the del(GJB6-D13S1830) in Argentinean non-syndromic deaf patients. *Hear Res* 207, 43-9.

- de Wert, G. 2005. Preimplantation genetic diagnosis: the ethics of intermediate cases. *Hum Reprod* 20, 3261-6.
- del Castillo, F.J., Rodriguez-Ballesteros, M., Martin, Y., Arellano, B., Gallo-Teran, J., Morales-Angulo, C., Ramirez-Camacho, R., Cruz Tapia, M., Solanellas, J., Martinez-Conde, A., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M.A., Moreno, F., del Castillo, I. 2003a. Heteroplasmy for the 1555A>G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in six Spanish families with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 40, 632-6.
- del Castillo, I., Villamar, M., Moreno-Pelayo, M.A., del Castillo, F.J., Alvarez, A., Telleria, D., Menendez, I., Moreno, F. 2002. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 346, 243-9.
- del Castillo, I., Moreno-Pelayo, M.A., Del Castillo, F.J., Brownstein, Z., Marlin, S., Adina, Q., Cockburn, D.J., Pandya, A., Siemering, K.R., Chamberlin, G.P., Ballana, E., Wuyts, W., Maciel-Guerra, A.T., Alvarez, A., Villamar, M., Shohat, M., Abeliovich, D., Dahl, H.H., Estivill, X., Gasparini, P., Hutchin, T., Nance, W.E., Sartorato, E.L., Smith, R.J., Van Camp, G., Avraham, K.B., Petit, C., Moreno, F. 2003b. Prevalence and evolutionary origins of the del(GJB6-D13S1830) mutation in the DFNB1 locus in hearing-impaired subjects: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 73, 1452-8.
- Dennis, C. 2004. Genetics: deaf by design. *Nature* 431, 894-6.
- Denoyelle, F., Marlin, S., Weil, D., Moatti, L., Chauvin, P., Garabedian, E.N., Petit, C. 1999. Clinical features of the prevalent form of childhood deafness, DFNB1, due to a connexin-26 gene defect: implications for genetic counselling. *Lancet* 353, 1298-303.
- Denoyelle, F., Lina-Granade, G., Plauchu, H., Bruzzone, R., Chaib, H., Levi-Acobas, F., Weil, D., Petit, C. 1998. Connexin 26 gene linked to a dominant deafness. *Nature* 393, 319-20.
- DeStefano, A.L., Gates, G.A., Heard-Costa, N., Myers, R.H., Baldwin, C.T. 2003. Genomewide linkage analysis to presbycusis in the Framingham Heart Study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 285-9.

- Ealy, M., Smith, R.J. 2009. The Genetics of otosclerosis. *Hear Res.* Jul 14. [Epub ahead of print]
- Eladari, D., Chambrey, R., Frische, S., Vallet, M., Edwards, A. 2009. Pendrin as a regulator of ECF and blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18, 356-62.
- Estivill, X., Fortina, P., Surrey, S., Rabionet, R., Melchionda, S., D'Agruma, L., Mansfield, E., Rappaport, E., Govea, N., Mila, M., Zelante, L., Gasparini, P. 1998. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness. *Lancet* 351, 394-8.
- Everett, L.A., Morsli, H., Wu, D.K., Green, E.D. 1999. Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9727-32.
- Everett, L.A., Belyantseva, I.A., Noben-Trauth, K., Cantos, R., Chen, A., Thakkar, S.I., Hoogstraten-Miller, S.L., Kachar, B., Wu, D.K., Green, E.D. 2001. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 10, 153-61.
- Everett, L.A., Glaser, B., Beck, J.C., Idol, J.R., Buchs, A., Heyman, M., Adawi, F., Hazani, E., Nassir, E., Baxevanis, A.D., Sheffield, V.C., Green, E.D. 1997. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* 17, 411-22.
- Fischel-Ghodsian, N. 1999. Mitochondrial deafness mutations reviewed. *Hum Mutat* 13, 261-70.
- Fransen, E., Van Laer, L., Lemkens, N., Caethoven, G., Flothmann, K., Govaerts, P., Van de Heyning, P., Van Camp, G. 2004. A novel Z-score-based method to analyze candidate genes for age-related hearing impairment. *Ear Hear* 25, 133-41.
- Friedman, R.A., Van Laer, L., Huentelman, M.J., Sheth, S.S., Van Eyken, E., Corneveaux, J.J., Tembe, W.D., Halperin, R.F., Thorburn, A.Q., Thys, S., Bonneux, S., Fransen, E., Huyghe, J., Pyykko, I., Cremers, C.W., Kremer, H., Dhooge, I., Stephens, D., Orzan, E., Pfister, M., Bille, M., Parving, A., Sorri,

- M., Van de Heyning, P.H., Makmura, L., Ohmen, J.D., Linthicum, F.H., Jr., Fayad, J.N., Pearson, J.V., Craig, D.W., Stephan, D.A., Van Camp, G. 2009. GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet* 18, 785-96.
- Frolenkov, G.I., Belyantseva, I.A., Friedman, T.B., Griffith, A.J. 2004. Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nature reviews* 5, 489-98.
- Fu, Q.J., Hsu, C.J., Horng, M.J. 2004. Effects of speech processing strategy on Chinese tone recognition by nucleus-24 cochlear implant users. *Ear Hear* 25, 501-8.
- Fukushima, K., Sugata, K., Kasai, N., Fukuda, S., Nagayasu, R., Toida, N., Kimura, N., Takishita, T., Gunduz, M., Nishizaki, K. 2002. Better speech performance in cochlear implant patients with GJB2-related deafness. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 62, 151-7.
- Gantz, B.J., Turner, C.W. 2003. Combining acoustic and electrical hearing. *Laryngoscope* 113, 1726-30.
- Gardner, P., Oitmaa, E., Messner, A., Hoefsloot, L., Metspalu, A., Schrijver, I. 2006. Simultaneous multigene mutation detection in patients with sensorineural hearing loss through a novel diagnostic microarray: a new approach for newborn screening follow-up. *Pediatrics* 118, 985-94.
- Gasparini, P., Estivill, X., Volpini, V., Totaro, A., Castellvi-Bel, S., Govea, N., Mila, M., Della Monica, M., Ventruto, V., De Benedetto, M., Stanziale, P., Zelante, L., Mansfield, E.S., Sandkuijl, L., Surrey, S., Fortina, P. 1997. Linkage of DFNB1 to non-syndromic neurosensory autosomal-recessive deafness in Mediterranean families. *Eur J Hum Genet* 5, 83-8.
- Gates, G.A., Couropmitree, N.N., Myers, R.H. 1999. Genetic associations in age-related hearing thresholds. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125, 654-9.
- Gates, G.A., Caspary, D.M., Clark, W., Pillsbury, H.C., 3rd, Brown, S.C., Dobie, R.A. 1989. Presbycusis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 100, 266-71.

- Geers, A., Brenner, C., Davidson, L. 2003. Factors associated with development of speech perception skills in children implanted by age five. *Ear Hear* 24, 24S-35S.
- Gillam, M.P., Bartolone, L., Kopp, P., Bevenga, S. 2005. Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome. *Thyroid* 15, 734-41.
- Green, G.E., Scott, D.A., McDonald, J.M., Woodworth, G.G., Sheffield, V.C., Smith, R.J. 1999. Carrier rates in the midwestern United States for GJB2 mutations causing inherited deafness. *Jama* 281, 2211-6.
- Green, G.E., Scott, D.A., McDonald, J.M., Teagle, H.F., Tomblin, B.J., Spencer, L.J., Woodworth, G.G., Knutson, J.F., Gantz, B.J., Sheffield, V.C., Smith, R.J. 2002. Performance of cochlear implant recipients with GJB2-related deafness. *Am J Med Genet* 109, 167-70.
- Guan, M.X., Fischel-Ghodsian, N., Attardi, G. 1996. Biochemical evidence for nuclear gene involvement in phenotype of non-syndromic deafness associated with mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 5, 963-71.
- Guan, M.X., Fischel-Ghodsian, N., Attardi, G. 2001. Nuclear background determines biochemical phenotype in the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Hum Mol Genet* 10, 573-80.
- Gurtler, N., Kim, Y., Mhatre, A., Muller, R., Probst, R., Lalwani, A.K. 2003. GJB2 mutations in the Swiss hearing impaired. *Ear Hear* 24, 440-7.
- Gurtler, N., Schmuziger, N., Kim, Y., Mhatre, A.N., Jungi, M., Lalwani, A.K. 2005. Audiologic testing and molecular analysis of 12S rRNA in patients receiving aminoglycosides. *Laryngoscope* 115, 640-4.
- Hamasaki, K., Rando, R.R. 1997. Specific binding of aminoglycosides to a human rRNA construct based on a DNA polymorphism which causes aminoglycoside-induced deafness. *Biochemistry* 36, 12323-8.
- Hammes, D.M., Novak, M.A., Rotz, L.A., Willis, M., Edmondson, D.M., Thomas, J.F. 2002. Early identification and cochlear implantation: critical factors for

- spoken language development. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 189, 74-8.
- Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K., Winston, R.M. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344, 768-70.
- Harris, A.L. 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Quarterly reviews of biophysics* 34, 325-472.
- Hayry, M. 2004. There is a difference between selecting a deaf embryo and deafening a hearing child. *J Med Ethics* 30, 510-2.
- Hildebrand, M.S., de Silva, M.G., Gardner, R.J., Rose, E., de Graaf, C.A., Bahlo, M., Dahl, H.H. 2006. Cochlear implants for DFNA17 deafness. *Laryngoscope* 116, 2211-5.
- Hildebrand, M.S., Tack, D., McMordie, S.J., DeLuca, A., Hur, I.A., Nishimura, C., Huygen, P., Casavant, T.L., Smith, R.J. 2008. Audioprofile-directed screening identifies novel mutations in *KCNQ4* causing hearing loss at the DFNA2 locus. *Genet Med* 10, 797-804.
- Hilgert, N., Smith, R.J., Van Camp, G. 2008. Forty-six genes causing nonsyndromic hearing impairment: Which ones should be analyzed in DNA diagnostics? *Mutat Res.* 681, 189-96.
- Huculak, C., Bruyere, H., Nelson, T.N., Kozak, F.K., Langlois, S. 2006. V37I connexin 26 allele in patients with sensorineural hearing loss: evidence of its pathogenicity. *Am J Med Genet A* 140, 2394-400.
- Hutchin, T.P., Cortopassi, G.A. 1997. Multiple origins of a mitochondrial mutation conferring deafness. *Genetics* 145, 771-6.
- Hwa, H.L., Ko, T.M., Hsu, C.J., Huang, C.H., Chiang, Y.L., Oong, J.L., Chen, C.C., Hsu, C.K. 2003. Mutation spectrum of the connexin 26 (*GJB2*) gene in Taiwanese patients with prelingual deafness. *Genet Med* 5, 161-5.
- Izumikawa, M., Minoda, R., Kawamoto, K., Abrashkin, K.A., Swiderski, D.L., Dolan, D.F., Brough, D.E., Raphael, Y. 2005. Auditory hair cell replacement and

hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 11, 271-6.

Johnson, K.R., Zheng, Q.Y. 2002. Ahl2, a second locus affecting age-related hearing loss in mice. *Genomics* 80, 461-4.

Johnson, K.R., Erway, L.C., Cook, S.A., Willott, J.F., Zheng, Q.Y. 1997. A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res* 114, 83-92.

Kalay, E., Caylan, R., Kremer, H., de Brouwer, A.P., Karaguzel, A. 2005. GJB2 mutations in Turkish patients with ARNSHL: prevalence and two novel mutations. *Hear Res* 203, 88-93.

Karlsson, K.K., Harris, J.R., Svartengren, M. 1997. Description and primary results from an audiometric study of male twins. *Ear Hear* 18, 114-20.

Kelsell, D.P., Dunlop, J., Stevens, H.P., Lench, N.J., Liang, J.N., Parry, G., Mueller, R.F., Leigh, I.M. 1997. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387, 80-3.

Kim, L.S., Jeong, S.W., Huh, M.J., Park, Y.D. 2006. Cochlear implantation in children with inner ear malformations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115, 205-14.

Kimberling, W.J. 2005. Estimation of the frequency of occult mutations for an autosomal recessive disease in the presence of genetic heterogeneity: application to genetic hearing loss disorders. *Hum Mutat* 26, 462-70.

Klockars, T., Kentala, E. 2007. Inheritance of Meniere's disease in the Finnish population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133, 73-7.

Kobayashi, K., Oguchi, T., Asamura, K., Miyagawa, M., Horai, S., Abe, S., Usami, S. 2005. Genetic features, clinical phenotypes, and prevalence of sensorineural hearing loss associated with the 961delT mitochondrial mutation. *Auris Nasus Larynx* 32, 119-24.

Konings, A., Van Laer, L., Pawelczyk, M., Carlsson, P.I., Bondeson, M.L., Rajkowska, E., Dudarewicz, A., Vandeveld, A., Franssen, E., Huyghe, J., Borg, E., Sliwiska-Kowalska, M., Van Camp, G. 2007. Association between variations

in CAT and noise-induced hearing loss in two independent noise-exposed populations. *Hum Mol Genet* 16, 1872-83.

Konings, A., Van Laer, L., Michel, S., Pawelczyk, M., Carlsson, P.I., Bondeson, M.L., Rajkowska, E., Dudarewicz, A., Vandeveld, A., Fransen, E., Huyghe, J., Borg, E., Sliwiska-Kowalska, M., Van Camp, G. 2009. Variations in HSP70 genes associated with noise-induced hearing loss in two independent populations. *Eur J Hum Genet* 17, 329-35.

Kudo, T., Ikeda, K., Oshima, T., Kure, S., Tammasaeng, M., Prasansuk, S., Matsubara, Y. 2001. GJB2 (connexin 26) mutations and childhood deafness in Thailand. *Otol Neurotol* 22, 858-61.

Kudo, T., Ikeda, K., Kure, S., Matsubara, Y., Oshima, T., Watanabe, K., Kawase, T., Narisawa, K., Takasaka, T. 2000. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) responsible for childhood deafness in the Japanese population. *Am J Med Genet* 90, 141-5.

Lecain, E., Robert, J.C., Thomas, A., Tran Ba Huy, P. 2000. Gastric proton pump is expressed in the inner ear and choroid plexus of the rat. *Hear Res* 149, 147-54.

Lesperance, M.M., Emery, S., Majczenko, K., Tajuddin, T., Sliwerska, E., Arnett, J., Burmeister, M. 2009. Combining genetic and genomic approaches to identify novel deafness genes. Presented at the 32nd ARO mid-winter meeting.

Li, X.C., Everett, L.A., Lalwani, A.K., Desmukh, D., Friedman, T.B., Green, E.D., Wilcox, E.R. 1998. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 18, 215-7.

Lim, L.H., Bradshaw, J.K., Guo, Y., Pilipenko, V., Madden, C., Ingala, D., Keddache, M., Choo, D.I., Wenstrup, R., Greinwald, J.H., Jr. 2003. Genotypic and phenotypic correlations of DFNB1-related hearing impairment in the Midwestern United States. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 836-40.

Lin, Y.H., Lin, Y.M., Wang, Y.Y., Yu, I.S., Lin, Y.W., Wang, Y.H., Wu, C.M., Pan, H.A., Chao, S.C., Yen, P.H., Lin, S.W., Kuo, P.L. 2009. The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis. *Am J Pathol* 174, 1857-68.

- Liu, T.C., Hsu, C.J., Horng, M.J. 2000. Tone detection in Mandarin-speaking hearing-impaired subjects. *Audiology* 39, 106-9.
- Lu, J., Qian, Y., Li, Z., Yang, A., Zhu, Y., Li, R., Yang, L., Tang, X., Chen, B., Ding, Y., Li, Y., You, J., Zheng, J., Tao, Z., Zhao, F., Wang, J., Sun, D., Zhao, J., Meng, Y., Guan, M.X. 2010. Mitochondrial haplotypes may modulate the phenotypic manifestation of the deafness-associated 12S rRNA 1555A>G mutation. *Mitochondrion* 10, 69-81.
- Lustig, L.R., Lin, D., Venick, H., Larky, J., Yeagle, J., Chinnici, J., Polite, C., Mhatre, A.N., Niparko, J.K., Lalwani, A.K. 2004. GJB2 gene mutations in cochlear implant recipients: prevalence and impact on outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130, 541-6.
- Lynch, E.D., Lee, M.K., Morrow, J.E., Welch, P.L., Leon, P.E., King, M.C. 1997. Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene *diaphanous*. *Science* 278, 1315-8.
- Maestrini, E., Korge, B.P., Ocana-Sierra, J., Calzolari, E., Cambiaghi, S., Scudder, P.M., Hovnanian, A., Monaco, A.P., Munro, C.S. 1999. A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum Mol Genet* 8, 1237-43.
- Maheshwari, M., Vijaya, R., Ghosh, M., Shastri, S., Kabra, M., Menon, P.S. 2003. Screening of families with autosomal recessive non-syndromic hearing impairment (ARNSHI) for mutations in GJB2 gene: Indian scenario. *Am J Med Genet A* 120, 180-4.
- Man, Y.K., Trollove, C., Tattersall, D., Thomas, A.C., Papakonstantinou, A., Patel, D., Scott, C., Chong, J., Jagger, D.J., O'Toole, E.A., Navsaria, H., Curtis, M.A., Kelsell, D.P. 2007. A deafness-associated mutant human connexin 26 improves the epithelial barrier in vitro. *J Membr Biol* 218, 29-37.
- Marazita, M.L., Ploughman, L.M., Rawlings, B., Remington, E., Arnos, K.S., Nance, W.E. 1993. Genetic epidemiological studies of early-onset deafness in the U.S. school-age population. *Am J Med Genet* 46, 486-91.

- Marlin, S., Garabedian, E.N., Roger, G., Moatti, L., Matha, N., Lewin, P., Petit, C., Denoyelle, F. 2001. Connexin 26 gene mutations in congenitally deaf children: pitfalls for genetic counseling. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127, 927-33.
- Martin, P.E., Coleman, S.L., Casalotti, S.O., Forge, A., Evans, W.H. 1999. Properties of connexin26 gap junctional proteins derived from mutations associated with non-syndromal hereditary deafness. *Hum Mol Genet* 8, 2369-76.
- Matsushiro, N., Doi, K., Fuse, Y., Nagai, K., Yamamoto, K., Iwaki, T., Kawashima, T., Sawada, A., Hibino, H., Kubo, T. 2002. Successful cochlear implantation in prelingual profound deafness resulting from the common 233delC mutation of the GJB2 gene in the Japanese. *Laryngoscope* 112, 255-61.
- Maw, M.A., Allen-Powell, D.R., Goodey, R.J., Stewart, I.A., Nancarrow, D.J., Hayward, N.K., Gardner, R.J. 1995. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *Am J Hum Genet* 57, 629-35.
- McConkey Robbins, A., Koch, D.B., Osberger, M.J., Zimmerman-Phillips, S., Kishon-Rabin, L. 2004. Effect of age at cochlear implantation on auditory skill development in infants and toddlers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130, 570-4.
- Migliosi, V., Modamio-Hoybjor, S., Moreno-Pelayo, M.A., Rodriguez-Ballesteros, M., Villamar, M., Telleria, D., Menendez, I., Moreno, F., Del Castillo, I. 2002. Q829X, a novel mutation in the gene encoding otoferlin (OTOF), is frequently found in Spanish patients with prelingual non-syndromic hearing loss. *J Med Genet* 39, 502-6.
- Morell, R.J., Kim, H.J., Hood, L.J., Goforth, L., Friderici, K., Fisher, R., Van Camp, G., Berlin, C.I., Oddoux, C., Ostrer, H., Keats, B., Friedman, T.B. 1998. Mutations in the connexin 26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with nonsyndromic recessive deafness. *N Engl J Med* 339, 1500-5.
- Nakagami, Y., Favoreto, S., Jr., Zhen, G., Park, S.W., Nguyenvu, L.T., Kuperman, D.A., Dolganov, G.M., Huang, X., Boushey, H.A., Avila, P.C., Erle, D.J. 2008. The epithelial anion transporter pendrin is induced by allergy and rhinovirus

infection, regulates airway surface liquid, and increases airway reactivity and inflammation in an asthma model. *J Immunol* 181, 2203-10.

Nakaya, K., Harbidge, D.G., Wangemann, P., Schultz, B.D., Green, E.D., Wall, S.M., Marcus, D.C. 2007. Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F1314-21.

Nemoto, M., Morita, Y., Mishima, Y., Takahashi, S., Nomura, T., Ushiki, T., Shiroishi, T., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., Kominami, R. 2004. Ahl3, a third locus on mouse chromosome 17 affecting age-related hearing loss. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1283-8.

Nicholas, J.G., Geers, A.E. 2006. Effects of early auditory experience on the spoken language of deaf children at 3 years of age. *Ear Hear* 27, 286-98.

Noben-Trauth, K., Zheng, Q.Y., Johnson, K.R. 2003. Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 35, 21-3.

O'Grady, G., Boyles, A.L., Speer, M., DeRuyter, F., Strittmatter, W., Worley, G. 2007. Apolipoprotein E alleles and sensorineural hearing loss. *Int J Audiol* 46, 183-6.

Oguchi, T., Ohtsuka, A., Hashimoto, S., Oshima, A., Abe, S., Kobayashi, Y., Nagai, K., Matsunaga, T., Iwasaki, S., Nakagawa, T., Usami, S. 2005. Clinical features of patients with GJB2 (connexin 26) mutations: severity of hearing loss is correlated with genotypes and protein expression patterns. *J Hum Genet* 50, 76-83.

Oshima, A., Doi, T., Mitsuoka, K., Maeda, S., Fujiyoshi, Y. 2003. Roles of Met-34, Cys-64, and Arg-75 in the assembly of human connexin 26. Implication for key amino acid residues for channel formation and function. *J Biol Chem* 278, 1807-16.

Papsin, B.C. 2005. Cochlear implantation in children with anomalous cochleovestibular anatomy. *Laryngoscope* 115, 1-26.

- Park, H.J., Shaukat, S., Liu, X.Z., Hahn, S.H., Naz, S., Ghosh, M., Kim, H.N., Moon, S.K., Abe, S., Tukamoto, K., Riazuddin, S., Kabra, M., Erdenetungalag, R., Radnaabazar, J., Khan, S., Pandya, A., Usami, S.I., Nance, W.E., Wilcox, E.R., Riazuddin, S., Griffith, A.J. 2003. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet* 40, 242-8.
- Pawelczyk, M., Van Laer, L., Fransen, E., Rajkowska, E., Konings, A., Carlsson, P.I., Borg, E., Van Camp, G., Sliwinska-Kowalska, M. 2009. Analysis of gene polymorphisms associated with K ion circulation in the inner ear of patients susceptible and resistant to noise-induced hearing loss. *Ann Hum Genet* 73, 411-21.
- Pennings, G., Schots, R., Liebaers, I. 2002. Ethical considerations on preimplantation genetic diagnosis for HLA typing to match a future child as a donor of haematopoietic stem cells to a sibling. *Hum Reprod* 17, 534-8.
- Pennings, R.J., Damen, G.W., Snik, A.F., Hoefsloot, L., Cremers, C.W., Mylanus, E.A. 2006. Audiologic performance and benefit of cochlear implantation in Usher syndrome type I. *Laryngoscope* 116, 717-22.
- Petit, C. 1996. Genes responsible for human hereditary deafness: symphony of a thousand. *Nat Genet* 14, 385-91.
- Petit, C., Levilliers, J., Hardelin, J.P. 2001. Molecular genetics of hearing loss. *Annu Rev Genet* 35, 589-646.
- Piazza, V., Beltramello, M., Menniti, M., Colao, E., Malatesta, P., Argento, R., Chiarella, G., Gallo, L.V., Catalano, M., Perrotti, N., Mammano, F., Cassandro, E. 2005. Functional analysis of R75Q mutation in the gene coding for Connexin 26 identified in a family with nonsyndromic hearing loss. *Clin Genet* 68, 161-6.
- Prasad, S., Kolln, K.A., Cucci, R.A., Trembath, R.C., Van Camp, G., Smith, R.J. 2004. Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of SLC26A4 by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations. *Am J Med Genet A* 124, 1-9.

- Pryor, S.P., Madeo, A.C., Reynolds, J.C., Sarlis, N.J., Arnos, K.S., Nance, W.E., Yang, Y., Zalewski, C.K., Brewer, C.C., Butman, J.A., Griffith, A.J. 2005. SLC26A4/PDS genotype-phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* 42, 159-65.
- Rechitsky, S., Verlinsky, O., Chistokhina, A., Sharapova, T., Ozen, S., Masciangelo, C., Kuliev, A., Verlinsky, Y. 2002. Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition. *Reprod Biomed Online* 5, 148-55.
- Renwick, P., Ogilvie, C.M. 2007. Preimplantation genetic diagnosis for monogenic diseases: overview and emerging issues. *Expert Rev Mol Diagn* 7, 33-43.
- Riazuddin, S., Castelein, C.M., Ahmed, Z.M., Lalwani, A.K., Mastroianni, M.A., Naz, S., Smith, T.N., Liburd, N.A., Friedman, T.B., Griffith, A.J., Wilcox, E.R. 2000. Dominant modifier DFNM1 suppresses recessive deafness DFNB26. *Nat Genet* 26, 431-4.
- Rieder, M.J., Taylor, S.L., Tobe, V.O., Nickerson, D.A. 1998. Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 26, 967-73.
- Robertson, J.A. 2003. Extending preimplantation genetic diagnosis: medical and non-medical uses. *J Med Ethics* 29, 213-6.
- Rodriguez-Ballesteros, M., del Castillo, F.J., Martin, Y., Moreno-Pelayo, M.A., Morera, C., Prieto, F., Marco, J., Morant, A., Gallo-Teran, J., Morales-Angulo, C., Navas, C., Trinidad, G., Tapia, M.C., Moreno, F., del Castillo, I. 2003. Auditory neuropathy in patients carrying mutations in the otoferlin gene (OTOF). *Hum Mutat* 22, 451-6.
- Rouillon, I., Marcolla, A., Roux, I., Marlin, S., Feldmann, D., Couderc, R., Jonard, L., Petit, C., Denoyelle, F., Garabedian, E.N., Loundon, N. 2006. Results of cochlear implantation in two children with mutations in the OTOF gene. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 70, 689-96.

- 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. 2006. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127, 277-89.
- Rubinstein, J.T., Parkinson, W.S., Tyler, R.S., Gantz, B.J. 1999. Residual speech recognition and cochlear implant performance: effects of implantation criteria. *Am J Otol* 20, 445-52.
- Scott, D.A., Wang, R., Kreman, T.M., Sheffield, V.C., Karniski, L.P. 1999. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 21, 440-3.
- Segade, F., Daly, K.A., Allred, D., Hicks, P.J., Cox, M., Brown, M., Hardisty-Hughes, R.E., Brown, S.D., Rich, S.S., Bowden, D.W. 2006. Association of the FBXO11 gene with chronic otitis media with effusion and recurrent otitis media: the Minnesota COME/ROM Family Study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 729-33.
- Shibata, T., Hibino, H., Doi, K., Suzuki, T., Hisa, Y., Kurachi, Y. 2006. Gastric type H⁺,K⁺-ATPase in the cochlear lateral wall is critically involved in formation of the endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol* 291, C1038-48.
- Singh, R., Wangemann, P. 2008. Free radical stress-mediated loss of Kcnj10 protein expression in stria vascularis contributes to deafness in Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F139-48.
- Sinnathuray, A.R., Toner, J.G., Clarke-Lytle, J., Geddis, A., Patterson, C.C., Hughes, A.E. 2004a. Connexin 26 (GJB2) gene-related deafness and speech intelligibility after cochlear implantation. *Otol Neurotol* 25, 935-42.
- Sinnathuray, A.R., Toner, J.G., Geddis, A., Clarke-Lytle, J., Patterson, C.C., Hughes, A.E. 2004b. Auditory perception and speech discrimination after cochlear implantation in patients with connexin 26 (GJB2) gene-related deafness. *Otol Neurotol* 25, 930-4.
- Skerrett, I.M., Di, W.L., Kasperek, E.M., Kelsell, D.P., Nicholson, B.J. 2004. Aberrant gating, but a normal expression pattern, underlies the recessive phenotype of

the deafness mutant Connexin26M34T. *FASEB J* 18, 860-2.

Snoeckx, R.L., Huygen, P.L., Feldmann, D., Marlin, S., Denoyelle, F., Waligora, J., Mueller-Malesinska, M., Pollak, A., Ploski, R., Murgia, A., Orzan, E., Castorina, P., Ambrosetti, U., Nowakowska-Szyrwinska, E., Bal, J., Wiszniewski, W., Janecke, A.R., Nekahm-Heis, D., Seeman, P., Bendova, O., Kenna, M.A., Frangulov, A., Rehm, H.L., Tekin, M., Incesulu, A., Dahl, H.H., du Sart, D., Jenkins, L., Lucas, D., Bitner-Glindzicz, M., Avraham, K.B., Brownstein, Z., del Castillo, I., Moreno, F., Blin, N., Pfister, M., Sziklai, I., Toth, T., Kelley, P.M., Cohn, E.S., Van Maldergem, L., Hilbert, P., Roux, A.F., Mondain, M., Hoefsloot, L.H., Cremers, C.W., Lopponen, T., Lopponen, H., Parving, A., Gronskov, K., Schrijver, I., Roberson, J., Gualandi, F., Martini, A., Lina-Granade, G., Pallares-Ruiz, N., Correia, C., Fialho, G., Cryns, K., Hilgert, N., Van de Heyning, P., Nishimura, C.J., Smith, R.J., Van Camp, G. 2005. GJB2 mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *Am J Hum Genet* 77, 945-57.

Spicer, S.S., Schulte, B.A. 1996. The fine structure of spiral ligament cells relates to ion return to the stria and varies with place-frequency. *Hear Res* 100, 80-100.

Spits, C., Sermon, K. 2009. PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat Diagn* 29, 50-6.

Stankovic, K.M., Brown, D., Alper, S.L., Adams, J.C. 1997. Localization of pH regulating proteins H⁺ATPase and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in the guinea pig inner ear. *Hear Res* 114, 21-34.

Steel, K.P., Kros, C.J. 2001. A genetic approach to understanding auditory function. *Nat Genet* 27, 143-9.

Su, C.C., Yang, J.J., Shieh, J.C., Su, M.C., Li, S.Y. 2007. Identification of novel mutations in the KCNQ4 gene of patients with nonsyndromic deafness from Taiwan. *Audiol Neurootol* 12, 20-6.

Suzuki, H., Oshima, A., Tsukamoto, K., Abe, S., Kumakawa, K., Nagai, K., Satoh, H., Kanda, Y., Iwasaki, S., Usami, S.I. 2007. Clinical characteristics and genotype-phenotype correlation of hearing loss patients with SLC26A4 mutations. *Acta Otolaryngol*, 1-6.

- Taitelbaum-Swead, R., Brownstein, Z., Muchnik, C., Kishon-Rabin, L., Kronenberg, J., Megirov, L., Frydman, M., Hildesheimer, M., Avraham, K.B. 2006. Connexin-associated deafness and speech perception outcome of cochlear implantation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 495-500.
- Teggi, R., Lanzani, C., Zagato, L., Delli Carpini, S., Manunta, P., Bianchi, G., Bussi, M. 2008. Gly460Trp alpha-adducin mutation as a possible mechanism leading to endolymphatic hydrops in Meniere's syndrome. *Otol Neurotol* 29, 824-8.
- Tessa, A., Giannotti, A., Tieri, L., Vilarinho, L., Marotta, G., Santorelli, F.M. 2001. Maternally inherited deafness associated with a T1095C mutation in the mtDNA. *Eur J Hum Genet* 9, 147-9.
- Thonnissen, E., Rabionet, R., Arbones, M.L., Estivill, X., Willecke, K., Ott, T. 2002. Human connexin26 (GJB2) deafness mutations affect the function of gap junction channels at different levels of protein expression. *Hum Genet* 111, 190-7.
- Tono, T., Ushisako, Y., Kiyomizu, K., Usami, S., Abe, S., Shinkawa, H., Komune, S. 1998. Cochlear implantation in a patient with profound hearing loss with the A1555G mitochondrial mutation. *Am J Otol* 19, 754-7.
- Torroni, A., Petrozzi, M., D'Urbano, L., Sellitto, D., Zeviani, M., Carrara, F., Carducci, C., Leuzzi, V., Carelli, V., Barboni, P., De Negri, A., Scozzari, R. 1997. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet* 60, 1107-21.
- Torroni, A., Cruciani, F., Rengo, C., Sellitto, D., Lopez-Bigas, N., Rabionet, R., Govea, N., Lopez De Munain, A., Sarduy, M., Romero, L., Villamar, M., del Castillo, I., Moreno, F., Estivill, X., Scozzari, R. 1999. The A1555G mutation in the 12S rRNA gene of human mtDNA: recurrent origins and founder events in families affected by sensorineural deafness. *Am J Hum Genet* 65, 1349-58.
- Tsakamoto, K., Suzuki, H., Harada, D., Namba, A., Abe, S., Usami, S. 2003. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular

aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur J Hum Genet* 11, 916-22.

Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K., Suzuki, T. 2005. Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J Biol Chem* 280, 1613-24.

Unal, M., Tamer, L., Dogruer, Z.N., Yildirim, H., Vayisoglu, Y., Camdeviren, H. 2005. N-acetyltransferase 2 gene polymorphism and presbycusis. *Laryngoscope* 115, 2238-41.

Usami, S., Abe, S., Weston, M.D., Shinkawa, H., Van Camp, G., Kimberling, W.J. 1999. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet* 104, 188-92.

Usami, S., Abe, S., Kasai, M., Shinkawa, H., Moeller, B., Kenyon, J.B., Kimberling, W.J. 1997. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope* 107, 483-90.

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. 2000. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet* 37, 38-40.

Van Eyken, E., Van Laer, L., Fransen, E., Topsakal, V., Lemkens, N., Laureys, W., Nelissen, N., Vandeveld, A., Wienker, T., Van De Heyning, P., Van Camp, G. 2006. KCNQ4: a gene for age-related hearing impairment? *Hum Mutat* 27, 1007-16.

Van Eyken, E., Van Camp, G., Fransen, E., Topsakal, V., Hendrickx, J.J., Demeester, K., Van de Heyning, P., Maki-Torkko, E., Hannula, S., Sorri, M., Jensen, M., Parving, A., Bille, M., Baur, M., Pfister, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Orzan, E., Espeso, A., Stephens, D., Verbruggen, K., Huyghe, J., Dhooge, I., Huygen, P., Kremer, H., Cremers, C.W., Kunst, S., Manninen, M., Pyykko, I., Lacava, A., Steffens, M., Wienker, T.F., Van Laer, L. 2007. Contribution of the N-acetyltransferase 2 polymorphism NAT2*6A to age-related hearing

impairment. *J Med Genet* 44, 570-8.

Van Laer, L., Van Eyken, E., Fransen, E., Huyghe, J.R., Topsakal, V., Hendrickx, J.J., Hannula, S., Maki-Torkko, E., Jensen, M., Demeester, K., Baur, M., Bonaconsa, A., Mazzoli, M., Espeso, A., Verbruggen, K., Huyghe, J., Huygen, P., Kunst, S., Manninen, M., Konings, A., Diaz-Lacava, A.N., Steffens, M., Wienker, T.F., Pyykko, I., Cremers, C.W., Kremer, H., Dhooge, I., Stephens, D., Orzan, E., Pfister, M., Bille, M., Parving, A., Sorri, M., Van de Heyning, P.H., Van Camp, G. 2008. The grainyhead like 2 gene (GRHL2), alias TFCP2L3, is associated with age-related hearing impairment. *Hum Mol Genet* 17, 159-69.

Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Masciangelo, C., Lederer, K., Kuliev, A. 2002. Preimplantation diagnosis for early-onset Alzheimer disease caused by V717L mutation. *Jama* 287, 1018-21.

Vermeire, K., Brokx, J.P., Wuyts, F.L., Cochet, E., Hofkens, A., De Bodt, M., Van de Heyning, P.H. 2006. Good speech recognition and quality-of-life scores after cochlear implantation in patients with DFNA9. *Otol Neurotol* 27, 44-9.

Verpy, E., Leibovici, M., Zwaenepoel, I., Liu, X.Z., Gal, A., Salem, N., Mansour, A., Blanchard, S., Kobayashi, I., Keats, B.J., Slim, R., Petit, C. 2000. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher syndrome type 1C. *Nat Genet* 26, 51-5.

Vrabec, J.T., Liu, L., Li, B., Leal, S.M. 2008. Sequence variants in host cell factor C1 are associated with Meniere's disease. *Otol Neurotol* 29, 561-6.

Wang, Q.J., Zhao, Y.L., Rao, S.Q., Guo, Y.F., Yuan, H., Zong, L., Guan, J., Xu, B.C., Wang, D.Y., Han, M.K., Lan, L., Zhai, S.Q., Shen, Y. 2007. A distinct spectrum of SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct in China. *Clin Genet* 72, 245-54.

Wang, Y.C., Kung, C.Y., Su, M.C., Su, C.C., Hsu, H.M., Tsai, C.C., Lin, C.C., Li, S.Y. 2002. Mutations of Cx26 gene (GJB2) for prelingual deafness in Taiwan. *Eur J Hum Genet* 10, 495-8.

Wangemann, P. 2006. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis

and the endocochlear potential. *J Physiol* 576, 11-21.

- Wangemann, P., Nakaya, K., Wu, T., Maganti, R.J., Itza, E.M., Sanneman, J.D., Harbidge, D.G., Billings, S., Marcus, D.C. 2007. Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, F1345-53.
- Wangemann, P., Kim, H.M., Billings, S., Nakaya, K., Li, X., Singh, R., Sharlin, D.S., Forrest, D., Marcus, D.C., Fong, P. 2009. Developmental delays consistent with cochlear hypothyroidism contribute to failure to develop hearing in mice lacking *Slc26a4*/pendrin expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1435-47.
- Wangemann, P., Itza, E.M., Albrecht, B., Wu, T., Jabba, S.V., Maganti, R.J., Lee, J.H., Everett, L.A., Wall, S.M., Royaux, I.E., Green, E.D., Marcus, D.C. 2004. Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BMC Med* 2, 30.
- Wattanasirichaigoon, D., Limwongse, C., Jariengprasert, C., Yenchitsomanus, P.T., Tocharoenthanaphol, C., Thongnoppakhun, W., Thawil, C., Charoenpipop, D., Pho-iam, T., Thongpradit, S., Duggal, P. 2004. High prevalence of V37I genetic variant in the connexin-26 (GJB2) gene among non-syndromic hearing-impaired and control Thai individuals. *Clin Genet* 66, 452-60.
- White, T.W., Deans, M.R., Kelsell, D.P., Paul, D.L. 1998. Connexin mutations in deafness. *Nature* 394, 630-1.
- Wu, C.C., Yeh, T.H., Chen, P.J., Hsu, C.J. 2005a. Prevalent SLC26A4 mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct and/or Mondini dysplasia: a unique spectrum of mutations in Taiwan, including a frequent founder mutation. *Laryngoscope* 115, 1060-4.
- Wu, C.C., Chen, Y.S., Chen, P.J., Hsu, C.J. 2005b. Common clinical features of children with enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia. *Laryngoscope* 115, 132-7.
- Wu, C.C., Chiu, Y.H., Chen, P.J., Hsu, C.J. 2007. Prevalence and clinical features of

the mitochondrial m.1555A>G mutation in Taiwanese patients with idiopathic sensorineural hearing loss and association of haplogroup F with low penetrance in three families. *Ear Hear* 28, 332-42.

Wu, C.C., Lee, Y.C., Chen, P.J., Hsu, C.J. 2008a. Predominance of genetic diagnosis and imaging results as predictors in determining the speech perception performance outcome after cochlear implantation in children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 162, 269-76.

Wu, C.C., Chen, P.J., Chiu, Y.H., Lu, Y.C., Wu, M.C., Hsu, C.J. 2008b. Prospective mutation screening of three common deafness genes in a large Taiwanese Cohort with idiopathic bilateral sensorineural hearing impairment reveals a difference in the results between families from hospitals and those from rehabilitation facilities. *Audiol Neurootol* 13, 172-81.

Wu, C.C., Lu, Y.C., Chen, P.J., Liu, A.Y., Hwu, W.L., Hsu, C.J. 2009a. Application of SNaPshot multiplex assays for simultaneous multigene mutation screening in patients with idiopathic sensorineural hearing impairment. *Laryngoscope* 119, 2411-6.

Wu, C.C., Lu, Y.C., Chen, P.J., Yeh, P.L., Su, Y.N., Hwu, W.L., Hsu, C.J. 2009b. Phenotypic Analyses and Mutation Screening of the SLC26A4 and FOXI1 Genes in 101 Taiwanese Families with Bilateral Nonsyndromic Enlarged Vestibular Aqueduct (DFNB4) or Pendred Syndrome. *Audiol Neurootol* 15, 57-66.

Yan, Q., Li, X., Faye, G., Guan, M.X. 2005. Mutations in MTO2 related to tRNA modification impair mitochondrial gene expression and protein synthesis in the presence of a paromomycin resistance mutation in mitochondrial 15 S rRNA. *J Biol Chem* 280, 29151-7.

Yang, J.J., Huang, S.H., Chou, K.H., Liao, P.J., Su, C.C., Li, S.Y. 2007a. Identification of mutations in members of the connexin gene family as a cause of nonsyndromic deafness in Taiwan. *Audiol Neurootol* 12, 198-208.

Yang, J.J., Tsai, C.C., Hsu, H.M., Shiao, J.Y., Su, C.C., Li, S.Y. 2005. Hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia is caused by splice-site mutation in the PDS gene. *Hear Res* 199, 22-30.

- Yang, T., Vidarsson, H., Rodrigo-Blomqvist, S., Rosengren, S.S., Enerback, S., Smith, R.J. 2007b. Transcriptional control of SLC26A4 is involved in Pendred syndrome and nonsyndromic enlargement of vestibular aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet* 80, 1055-63.
- Yang, T., Gurrola, J.G., 2nd, Wu, H., Chiu, S.M., Wangemann, P., Snyder, P.M., Smith, R.J. 2009. Mutations of KCNJ10 together with mutations of SLC26A4 cause digenic nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct syndrome. *Am J Hum Genet* 84, 651-7.
- Yasunaga, S., Grati, M., Cohen-Salmon, M., El-Amraoui, A., Mustapha, M., Salem, N., El-Zir, E., Loiselet, J., Petit, C. 1999. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 21, 363-9.
- Young, W.Y., Zhao, L., Qian, Y., Wang, Q., Li, N., Greinwald, J.H., Jr., Guan, M.X. 2005. Extremely low penetrance of hearing loss in four Chinese families with the mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 1244-51.
- Yu, I.S., Lin, S.R., Huang, C.C., Tseng, H.Y., Huang, P.H., Shi, G.Y., Wu, H.L., Tang, C.L., Chu, P.H., Wang, L.H., Wu, K.K., Lin, S.W. 2004. TXAS-deleted mice exhibit normal thrombopoiesis, defective hemostasis, and resistance to arachidonate-induced death. *Blood* 104, 135-42.
- Zhao, H., Li, R., Wang, Q., Yan, Q., Deng, J.H., Han, D., Bai, Y., Young, W.Y., Guan, M.X. 2004a. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. *Am J Hum Genet* 74, 139-52.
- Zhao, L., Young, W.Y., Li, R., Wang, Q., Qian, Y., Guan, M.X. 2004b. Clinical evaluation and sequence analysis of the complete mitochondrial genome of three Chinese patients with hearing impairment associated with the 12S rRNA T1095C mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1503-8.

Websites accessed:

Connexin-deafness Homepage, <http://davinci.crg.es/deafness/index.php>

Ensembl, www.ensembl.org/index.html

GENDEAF Homepage, <http://audiology.unife.it/www.gendeaf.org/index.html>

Hereditary Hearing Loss Homepage, <http://webhost.ua.ac.be/hhh/>

Japanese Science and Technology Agency (JST database:

<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp>)

MitoMap, <http://www.mitomap.org/>

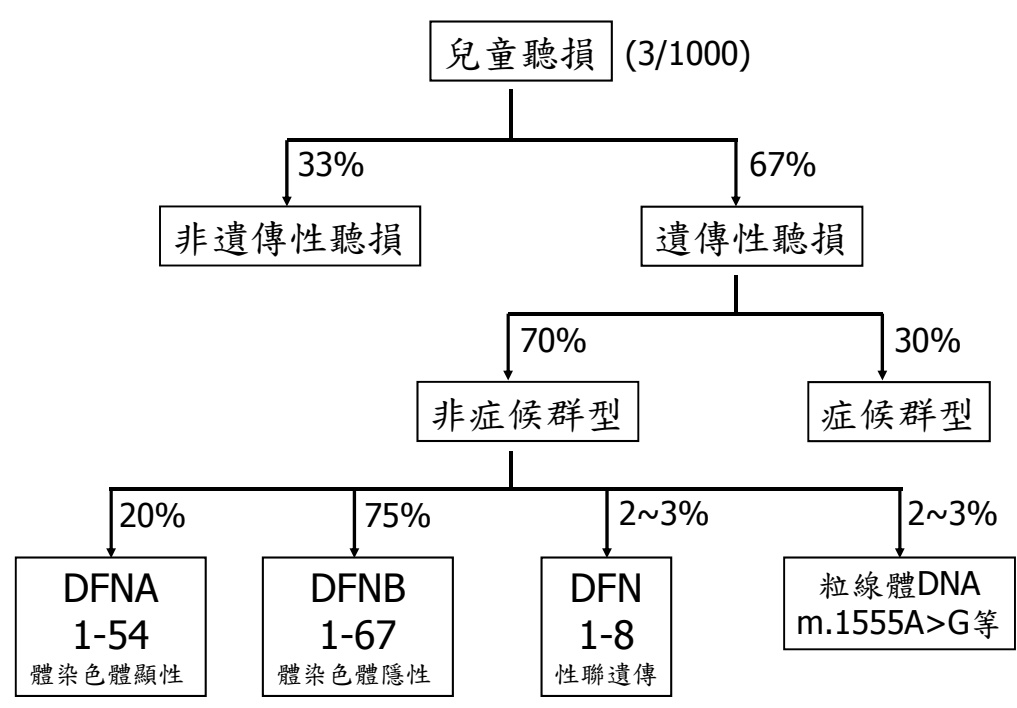
Pendred/BOR Homepage, <http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/>

SNP database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>



九、圖表

圖一

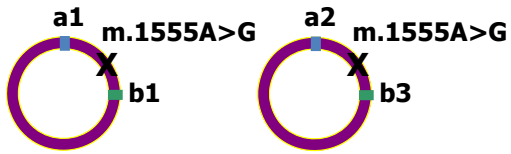


遺傳性聽損之分類與流行病學分佈

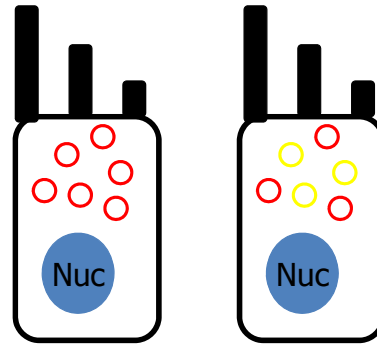
在已開發國家如台灣，剛出生的嬰兒約 1000 人中有 3 人會合併中至重度聽損，其中三分之二可歸因於遺傳因素；而遺傳性聽損又可依是否合併身體其他器官的異常，區分為「症候群型」(syndromic)與「非症候群型」(non-syndromic)兩類，其中以後者為多數，兩者比例約為 30：70。

圖二

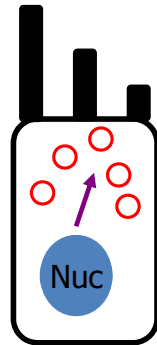
1. mtDNA background



2. Homoplasmy vs. heteroplasmy



3. Nuclear factors



4. Environmental factors: aminoglycoside?

四種可能影響粒線體 m.1555A>G 突變臨床表徵的機制

導致粒線體 m.1555A>G 突變家族內或家族間表現型的差異，可能來自下列四個機制：

1. 粒線體基因體(mitochondrial genome)之「單套群」(haplogroup)
2. 粒線體 1555A>G 突變之「同質」(homoplasmy)或「異質」(heteroplasmy)
3. 細胞核基因的影響
4. 外在環境的影響

圖三

_____ 先生/小姐
帶有粒線體12S rRNA 1555A>G變異，
請勿投與Aminoglycoside類藥物，以防止聽力惡化。



台大醫院耳鼻喉部 許權振 教授 敬上

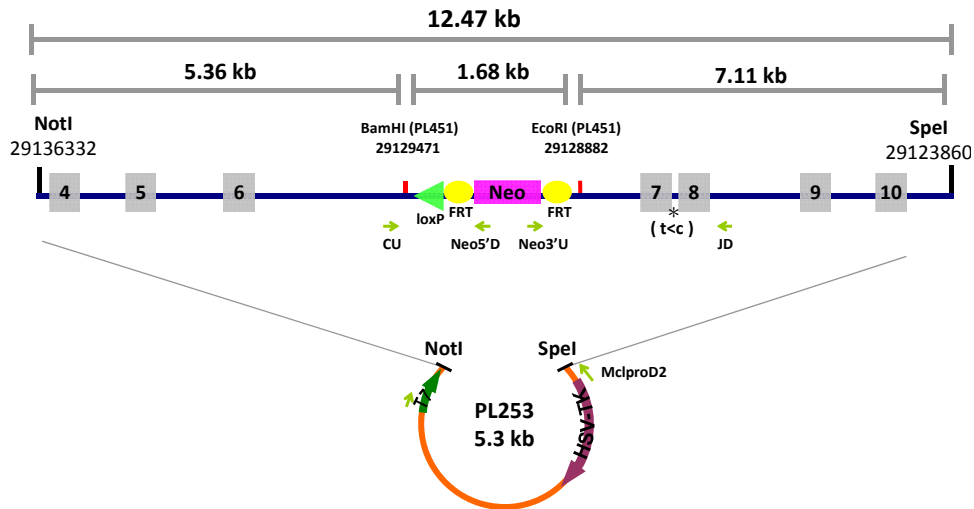
可供粒線體 m.1555A>G 突變病人隨身攜帶之小卡片

若病人檢測出帶有粒線體 12S rRNA 基因的 m.1555A>G 突變，我們會特別告知病人應特別注意胺基酸甘醣體之類的藥物，並發予可供病人隨身攜帶之小卡片，以確實防止他科臨床醫師投與這些病人此類的藥物治療，杜絕其聽力之急遽惡化。

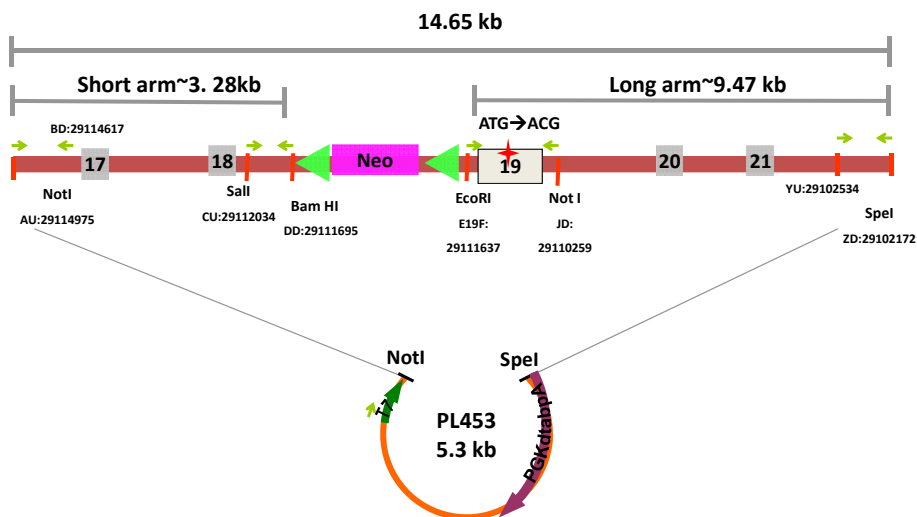


圖四

Slc26a4 c.919-2A>G
(bMQ-323G13)



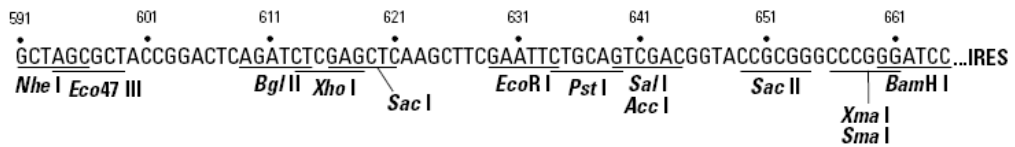
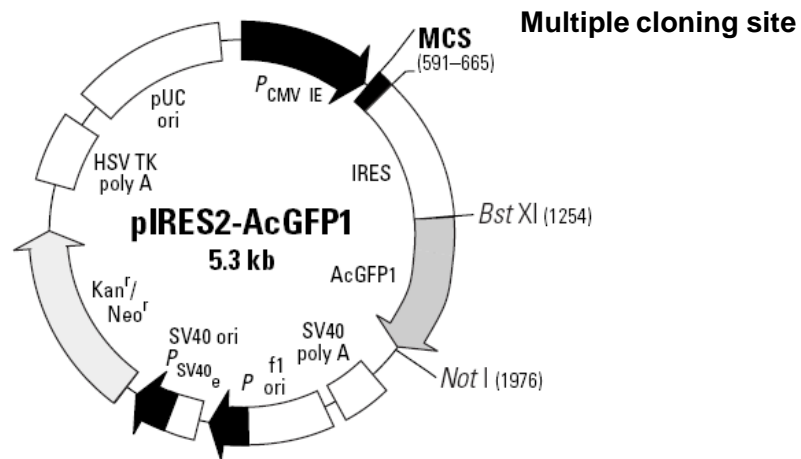
Slc26a4 p.H723R
(bMQ-323G13)



Slc26a4 基因 c.919-2A>G 變異及 p.H723R 變異之 plasmid constructs

為培育 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 及 p.H723R 突變基因置換鼠的進行步驟，本研究設計並構築含抗生素篩檢基因之 *Slc26a4* 基因 c.919-2A>G 或 p.H723R 突變之基因替換質體(plasmid construct)。

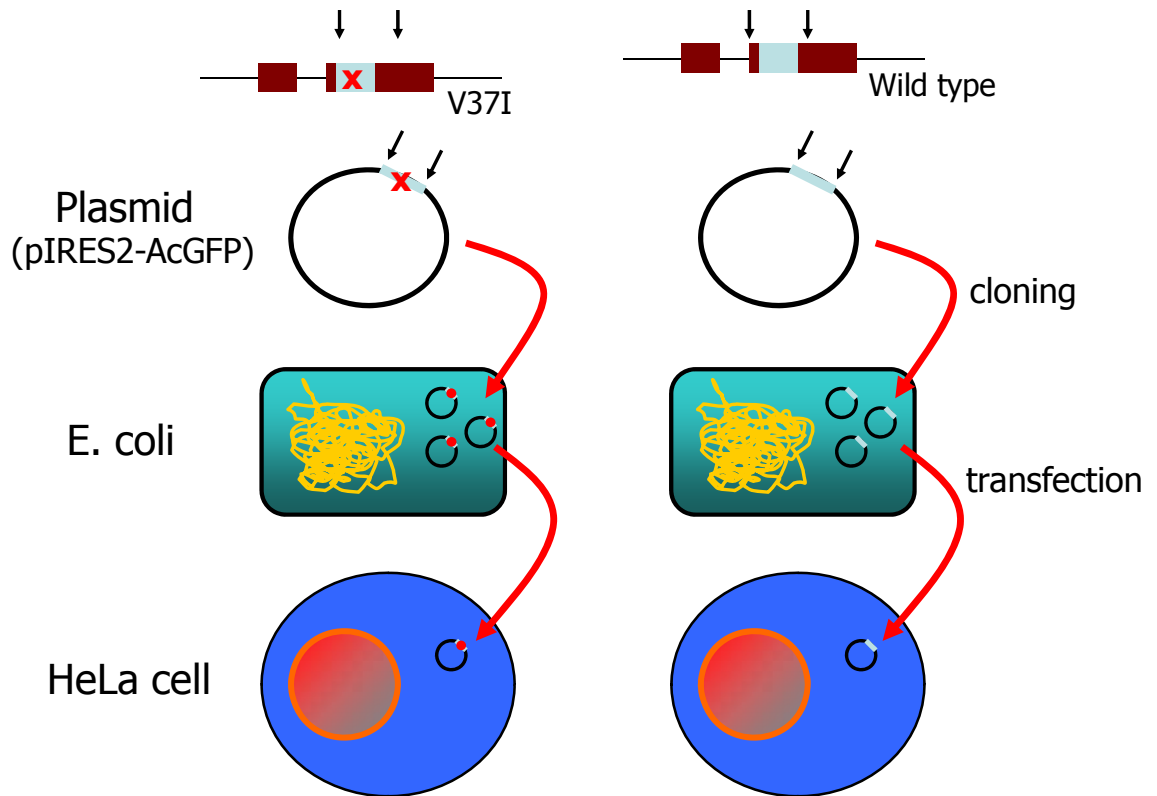
圖五



pIRES2-AcGFP1 質體

本研究選用 pIRES2-AcGFP1 質體進行基因選殖。本研究以 PCR 大量複製分別帶「野生型」(wild type) *GJB2* 基因序列及帶 p.V371 變異 *GJB2* 基因序列的 DNA 片段後，以限制酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 處理，使該二複製之 DNA 產物嵌入 pIRES2-AcGFP1 質體，之後植入該質體於 *E. coli* 中。

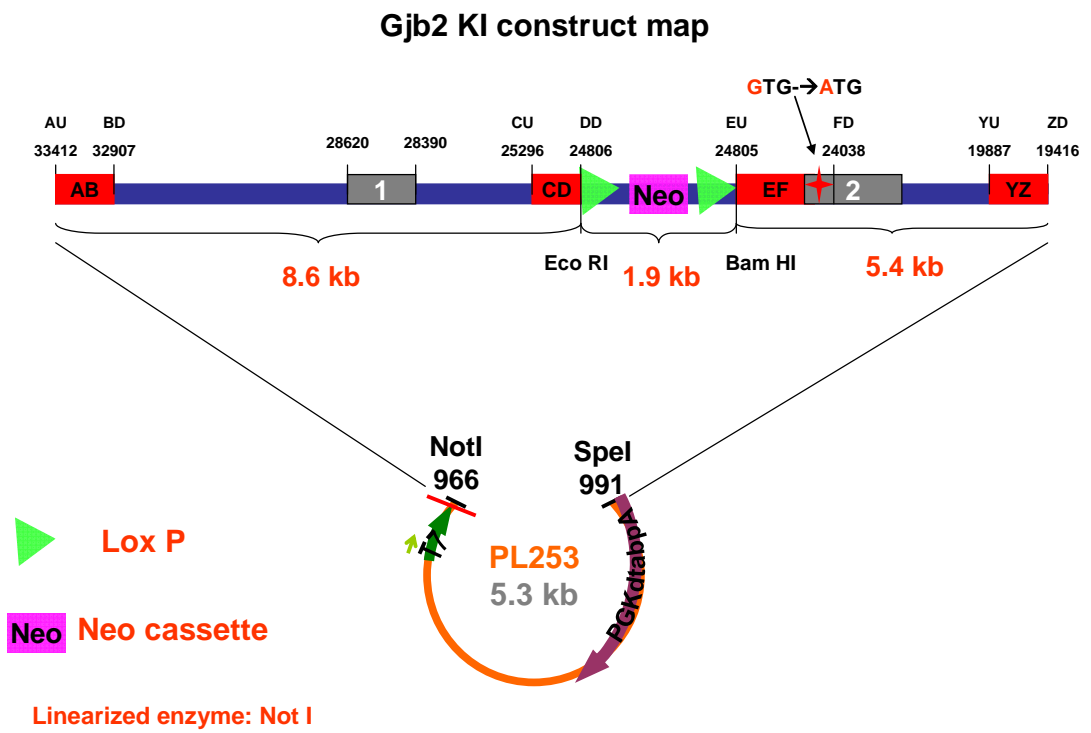
圖六



於細胞株之功能性基因研究之流程

本研究藉由基因選殖及轉染等技術，分別建立帶野生型 *GJB2* 基因質體及帶 p.V37I 變異 *GJB2* 基因質體的 HeLa 細胞株後，再比較兩組間 connexin26 蛋白質「量」和「質」的差異，以釐清 p.V37I 變異對於 *GJB2* 基因表現的影響。

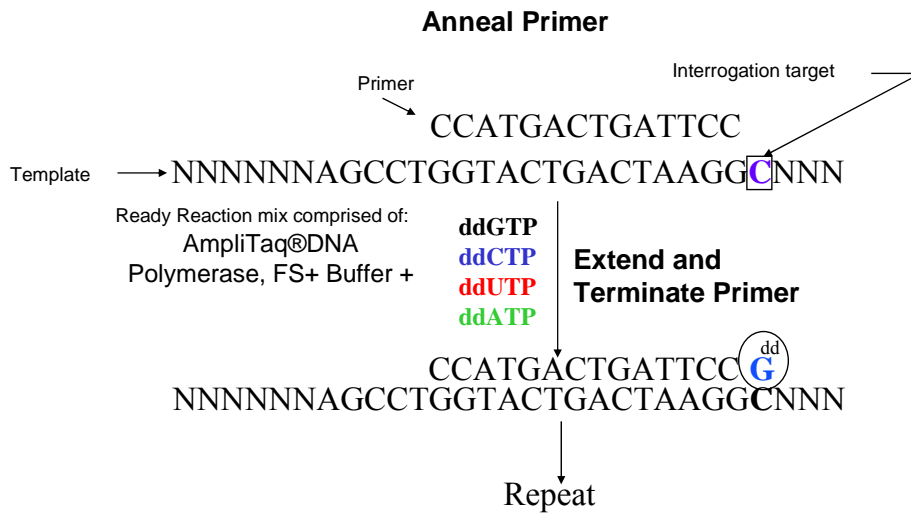
圖七



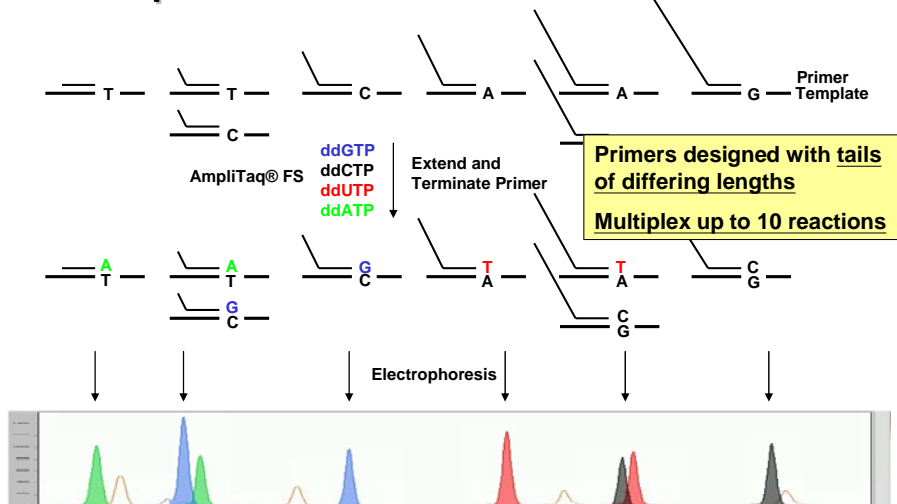
Gjb2 基因 p.V37I 變異之 plasmid construct

為培育 Gjb2 基因 p.V37I 變異基因置換鼠的進行步驟，本研究所設計並構築含抗生素篩檢基因之 Gjb2 基因 p.V37I 變異之基因替換質體(plasmid construct)。

SNaPshot ddNTP Primer Extension Kit



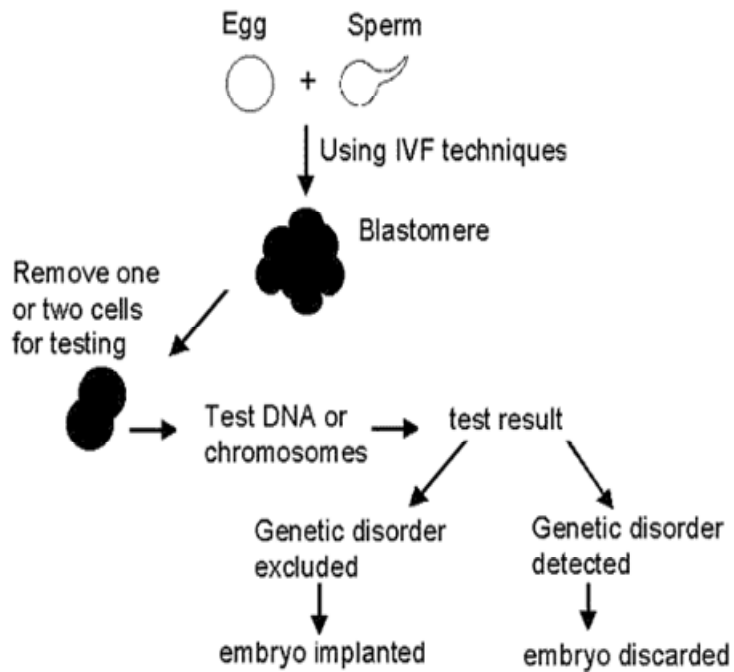
Single Tube Multiplexed SBE Reactions



SNaPshot 基本原理

SNaPshot 基因檢測使用 SNaPshot™ kit (ABI)，同時於多個突變位點進行 multiplex PCR 反應後，利用 primer extension 技術，藉由電泳位差及螢光顏色分析其核苷酸之變異。

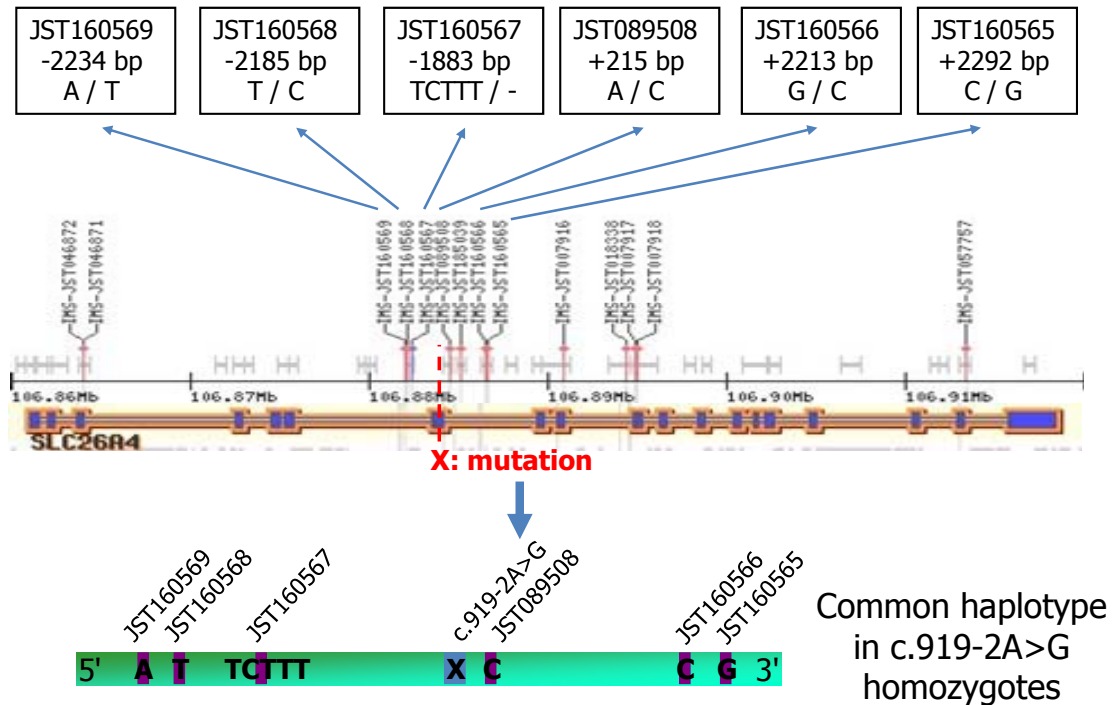
圖九



胚胎著床前基因診斷(PGD)流程簡圖

胚胎著床前基因診斷(pre-implantation genetic diagnosis, PGD)流程主要包含二步驟：研發單一細胞 c.919-2A>G 突變點檢測技術，其後以人工生殖技術，誘導排卵並進行體外受精，於胚胎培育成八細胞期時，進行胚胎切片以作單一細胞基因診斷，篩選後將正常胚胎植入母體子宮。(IVF, in vitro fertilization)

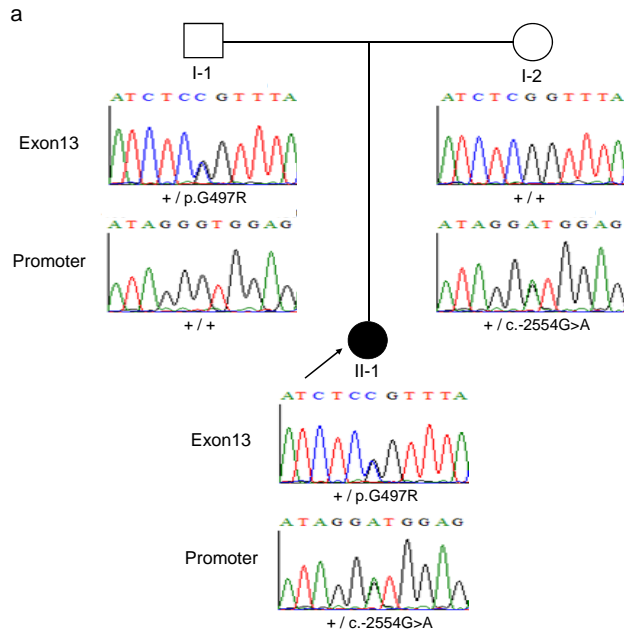
圖十



SLC26A4 基因 c.919-2A>G 突變源自一起始點變異

16 名 c.919-2A>G 同型合子突變之初始受試者，於 JST160568、JST089508、JST160566 及 JST160565 等四處顯現出獨特之基因型，而統計由此 4 個單一核苷酸多型性變異及 c.919-2A>G 突變所組成的「單套型」(haplotype)，則發現 16 名初始受試者合計 32 條染色體中，30 條染色體(94%)的單套型是相同的，顯示所有病人之 c.919-2A>G 突變可能來自共同的祖先。

圖十一



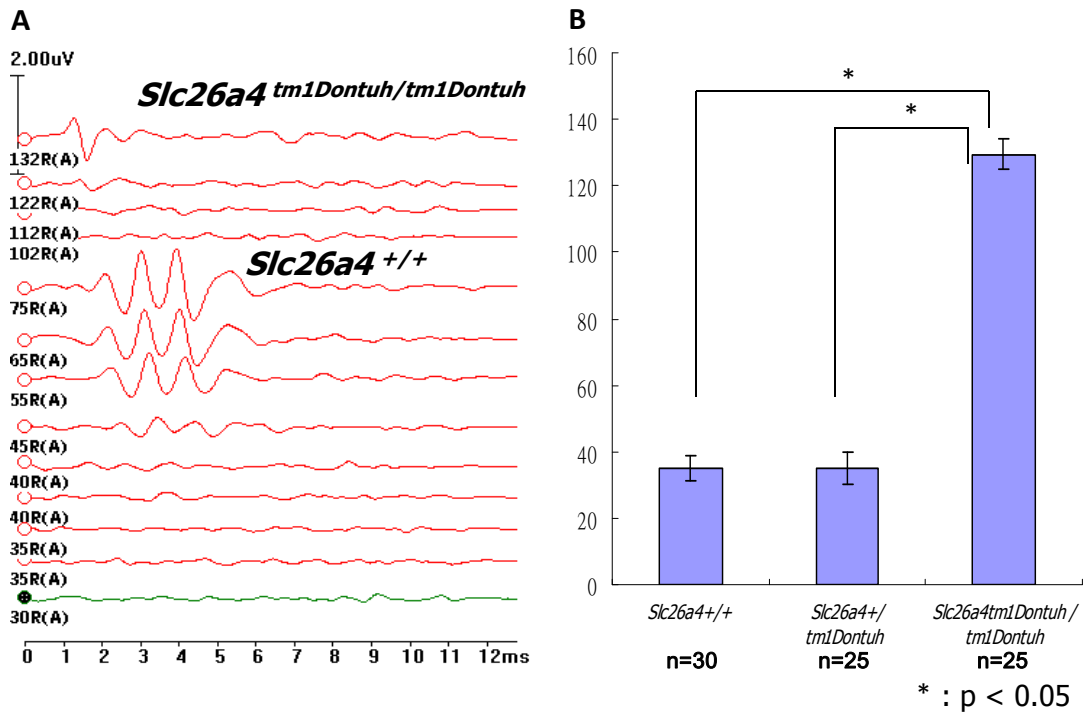
b

Bos taurus	AAACAGGTGAA-----TTCTA-----AAGTGAGTAATTTGATGIGTTTAATAATAACA
Homo sapiens	AAACAGGAGAAGGTTGCCTTATAAAGCCCAAGTGAGTAATCTAAGGTGTTTAATATCACF
Macaca mulatta	AAACAGGTGAAGGTTGCCTTGTAAAGCCCAAGTGAGTAATCTAAGGTGTTTAATATCACF
Rattus norvegicus	AAATAGGTGAGACTTGATTTAGAAAGCTRGCCTGAGTAATCAGAGGTGTTCAACGTAACA
Mus musculus	AAATAGGTGAGACTTGATTTAGAAAGCCAGTGTGAGTAA ^Y CGGAR ^Y GTGTTI---GTAACA
	↓
Bos taurus	AATAAATTGGGTGGAGAGAGCCAGCTGTTACCACCTCCTACTCTTCTGTTTTCAAAAGGC
Homo sapiens	ATTAAATAGGGTGGAGAGAGCAAGCTGTTATTTCCCTCCTACTCTTCTGTTTTAAAAAGC
Macaca mulatta	ATTAAATAGGGTGGAGAGAGCAAGCTGTTATTTCCCTCCTACTCTTCTGTTTTCAAAAGC
Rattus norvegicus	A-----GAT-GGGAGA-CCAGCTGTGTTTAGCTCCCAGTCTT-TCTCTTTAAAGAGI
Mus musculus	A-----GAT-GGGAGA-CCAGCTGTGTTTAGCTCCCAGTCTTTTCTCTTTAAAAAGC

SLC26A4 基因促進區之 c.-2554G>A 變異

SLC26A4 基因促進區之 c.-2554G>A 變異雖非為演化上高度保留之核苷酸(b)，但於家族樹分析中，與 p.G497R 突變分別位於不同染色體上，而與聽損表現型一同出現(a)，故不能排除其致病性。

圖十二



Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之聽力表徵

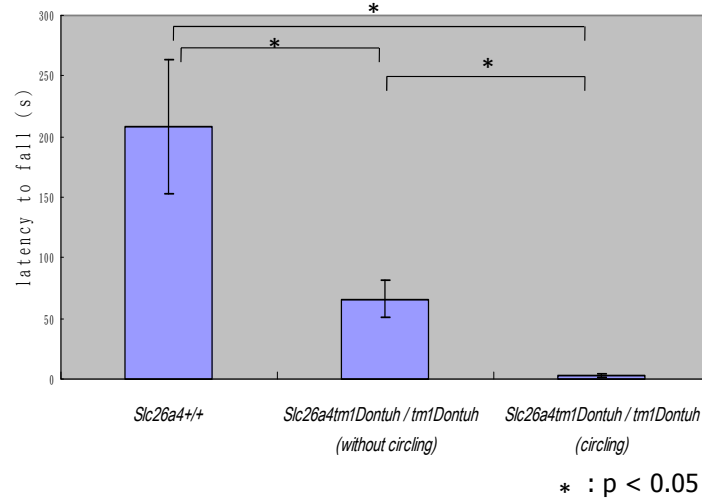
- A. c.919-2A>G 突變同型合子基因置換鼠 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之聽性腦幹反應檢查在 120 分貝刺激下，無聽力波型而呈現極重度之聽損。
- B. c.919-2A>G 突變同型合子基因置換鼠聽力閾值顯較異型合子基因置換鼠 (*Slc26a4*^{+/tm1Dontuh}) 及野生型 (*Slc26a4*^{+/+}) 重，其遺傳模式似與人類相同而為隱性遺傳。

圖十三

A



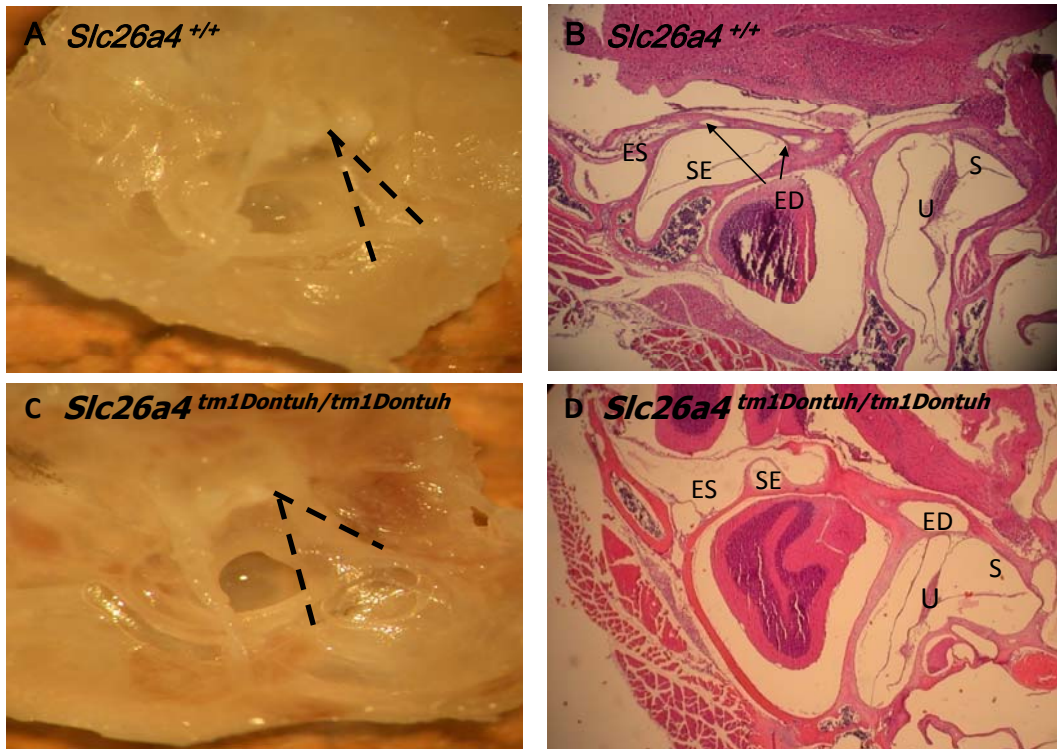
B



Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之平衡覺表徵

- A. 基因置換鼠 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 中約 45%可觀察到歪頭(head-tilting)；
B. Rotorod 試驗可發現 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 小鼠呈現較差之平衡能力，特別是具繞圈圈(circling)行為模式之小鼠

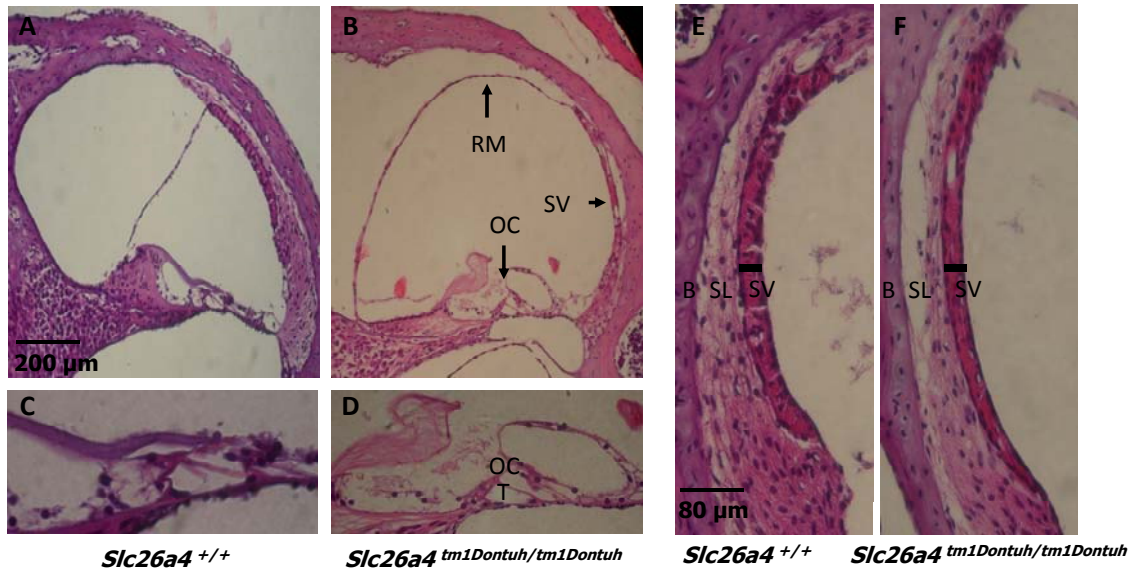
圖十四



Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之解剖學表徵

基因置換鼠 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 於肉眼下即可觀察到前庭導水管擴大(C, 虛線); 在光學顯微鏡下, 亦可觀察到內淋巴囊(endolymphatic sac)擴大(D)。(ED, endolymphatic duct; ES, endolymphatic sac; S, sacculle; SE, semicircular canal; U, utricle)

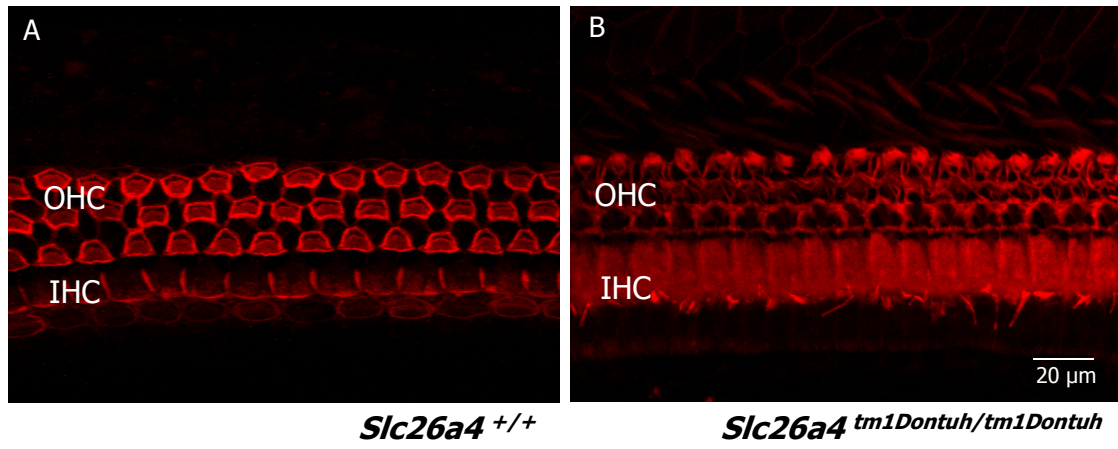
圖十五



Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之組織學表徵

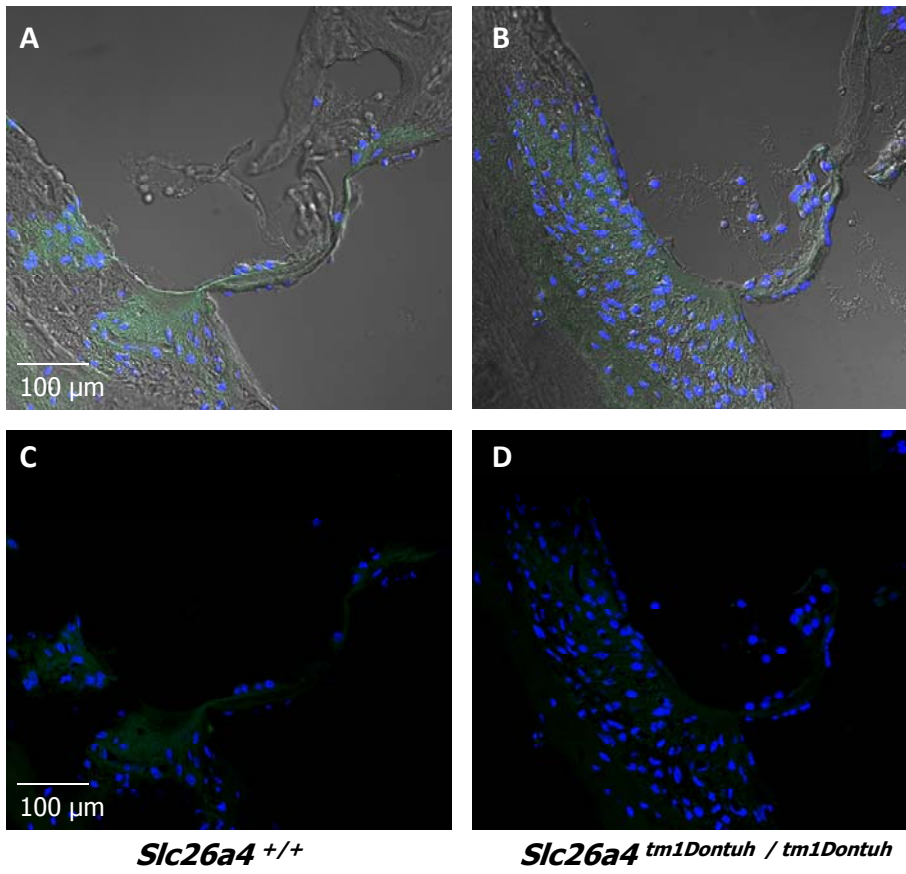
基因置換鼠 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 組織學上呈現內淋巴水腫(endolymphatic hydrops) (B)、毛細胞退化(D)及耳蝸之血管紋(stria vascularis)變薄(F)。(B, bone; OC, organ of Corti; RM, Reissner membrane; SL, spiral ligament; SV, stria vascularis)

圖十六



Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之內耳毛細胞退化
Confocal 螢光顯微鏡可觀察到 *Slc26a4*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠內耳毛細胞退化
(右)。(OHC, outer hair cells; IHC, inner hair cells)

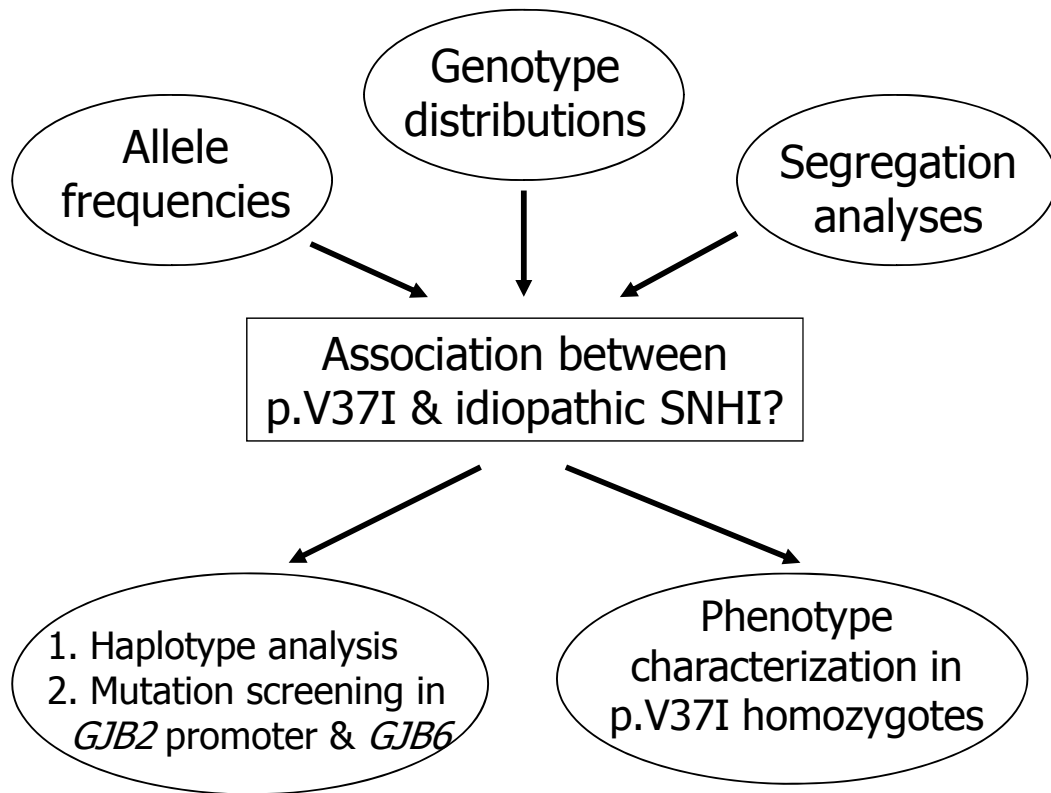
圖十七



Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 內耳之 pendrin 表現

Slc26a4^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 基因置換鼠 pendrin 在內耳 spiral ligament 上之分佈與表現，與 wild type 間並未顯示明顯差異。

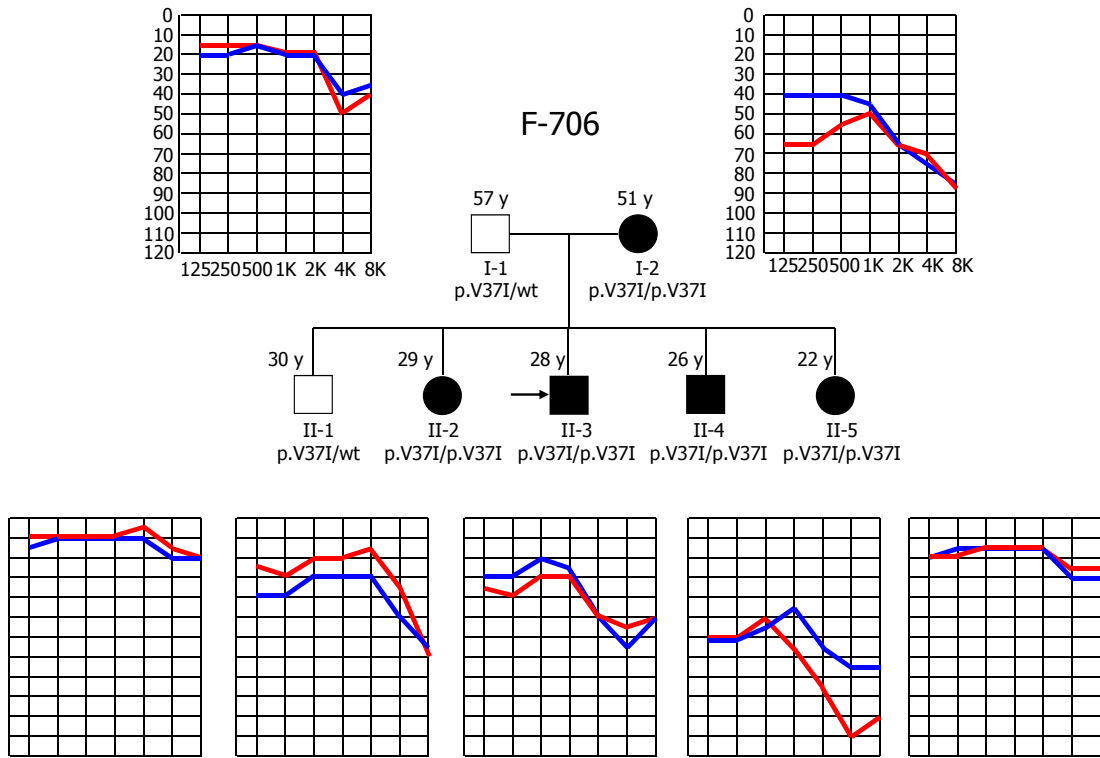
圖十八



***GJB2* 基因 p.V37I 變異與特發性感覺神經性聽損之研究流程**

本研究先依聽力程度分組，比較各組間對偶基因頻率與病人基因型分佈之差異，同時進行家族樹分析，以先釐清 p.V37I 變異與特發性感覺神經性聽損之相關性，其後，進行單套型分析與突變點掃描，並整理 p.V37I 變異之表現型，以研究該變異是否為真實突變、及其致病機制。

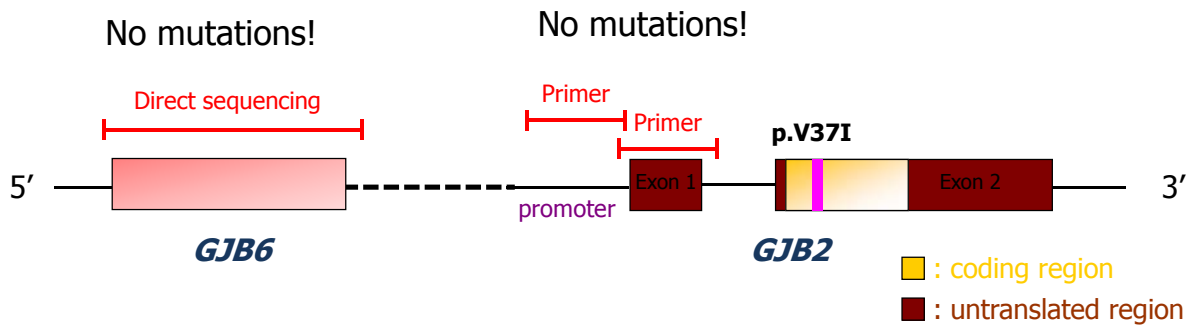
圖十九



p.V37I 變異之家族樹分析

家族樹分析顯示 *GJB2* 基因 p.V37I 同型合子與聽損表現型同時出現。本研究共於 56 個 p.V37I 同型合子家族完成家族樹分析(segregation analysis)。一般而言，p.V37I 同型合子變異與家族成員聽損之表現型一同出現，然亦有 p.V37I 同型合子病人表現接近正常之聽力者(病人 II-5)。

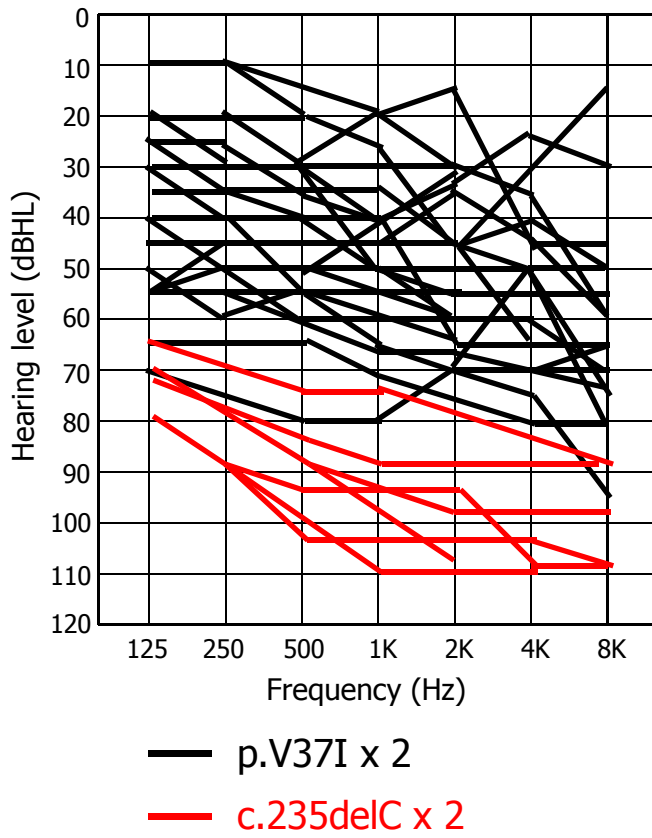
圖二十



於 *GJB2* 基因促進區(promoter)及其上游之 *GJB6* 基因搜尋突變點

為了排除 p.V37I 變異並非真實突變，而係其附近另有一與之形成連鎖不平衡之真實突變導致聽損，本研究進一步於 *GJB2* 基因促進區(promoter)及其上游之 *GJB6* 基因進行突變點搜尋，然均未找到其他突變點。

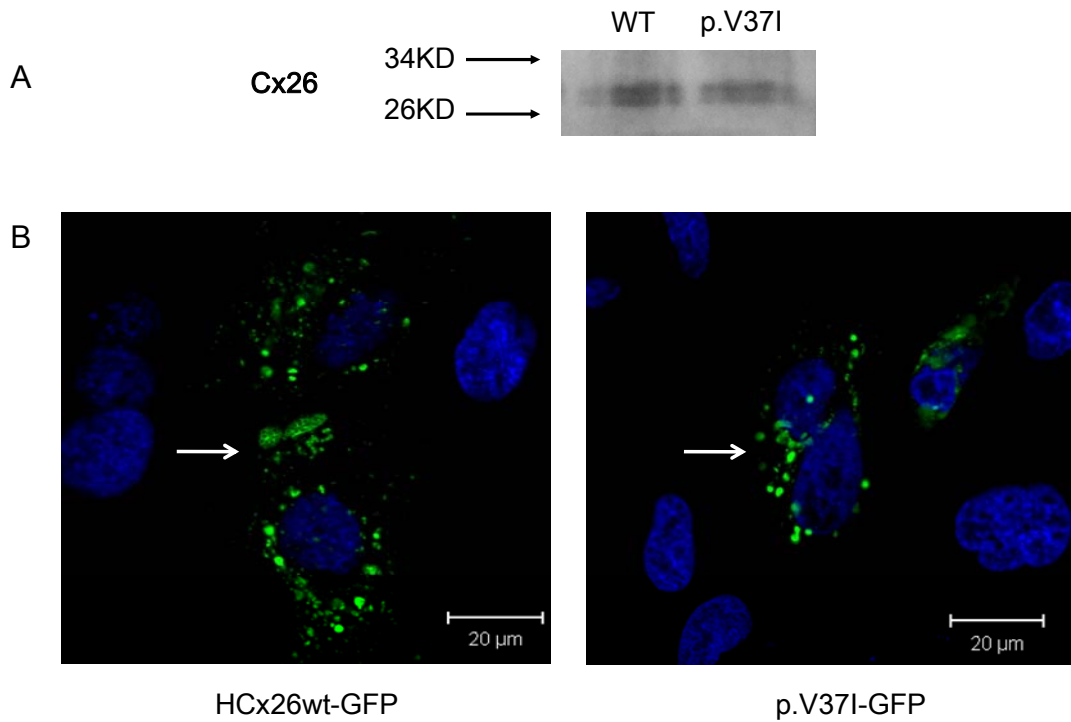
圖二十一



GJB2 基因 p.V37I 與 c.235delC 同型合子之複合聽力圖

另一常見之 GJB2 基因 c.235delC 突變相較，p.V37I 同型合子臨床上顯然表現較輕之聽損表徵。

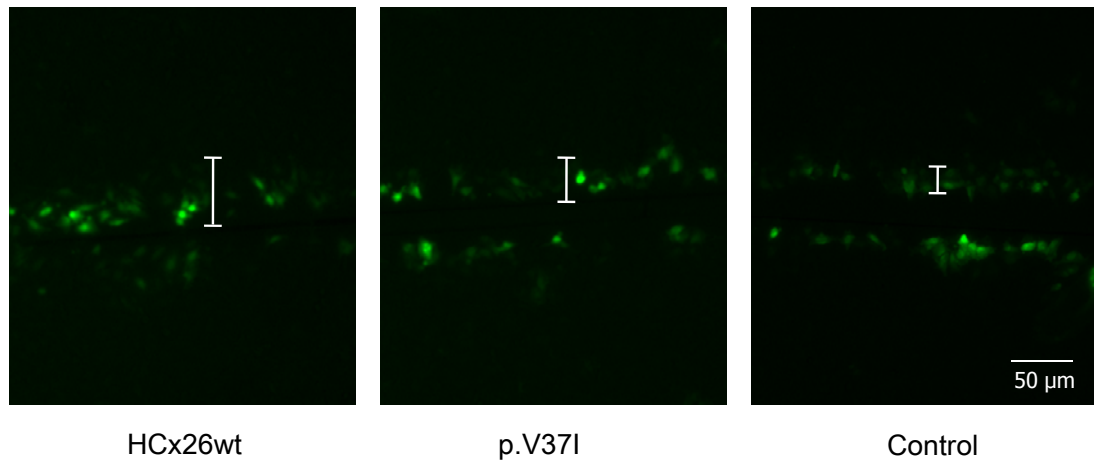
圖二十二



西方點墨法及螢光研究

- A. 西方點墨法顯示野生型 *GJB2* 基因與 p.V37I 變異 *GJB2* 基因於蛋白質量之表現並無差別。
- B. 於轉染野生型 *GJB2* 基因之 transient HeLa 細胞株間，可觀察到由 connexin26 蛋白質所形成漂亮之 gap junction plaque (B 左圖箭頭)，而於轉染 p.V37I 變異 *GJB2* 基因之 HeLa 細胞間，則較少形成明顯之 gap junction plaque (B 右圖箭頭)。(註：平均計算 5 個螢光視野)

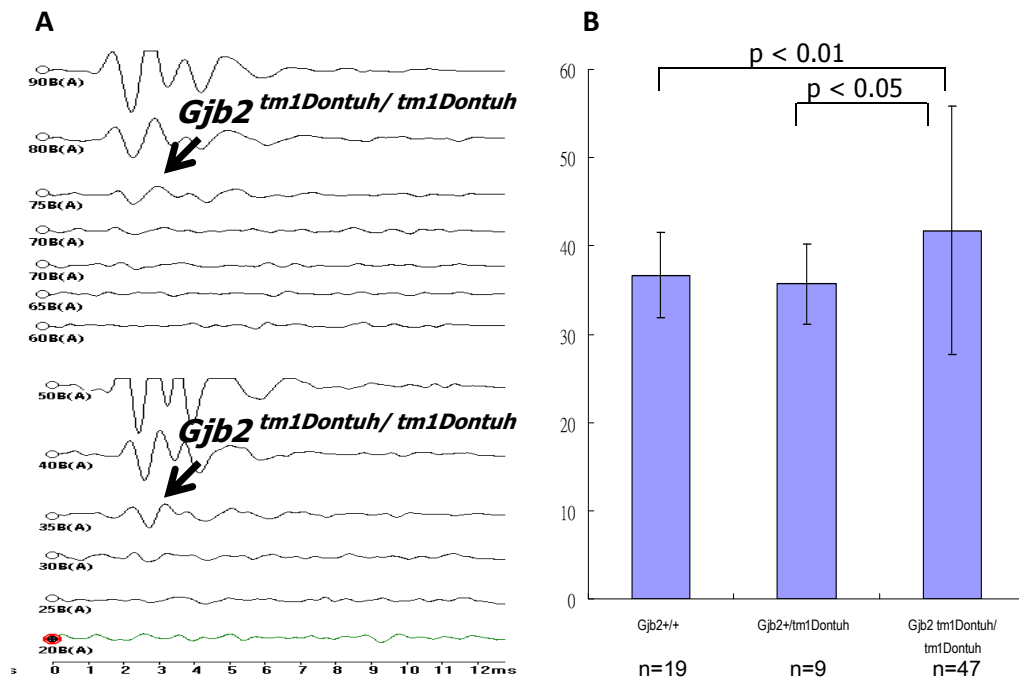
圖二十三



染料運送(dye transfer test)研究

以 scrape dye transfer 的方式，進行 Lucifer Yellow 的運送比較。初步結果顯示，p.V37I 變異 *GJB2* 基因之 HeLa 細胞間，Lucifer Yellow 的運送較野生型略差。惟進一步之確認，或可利用本研究所培育之基因置換鼠 *GJB2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 進行 in vivo 的研究。

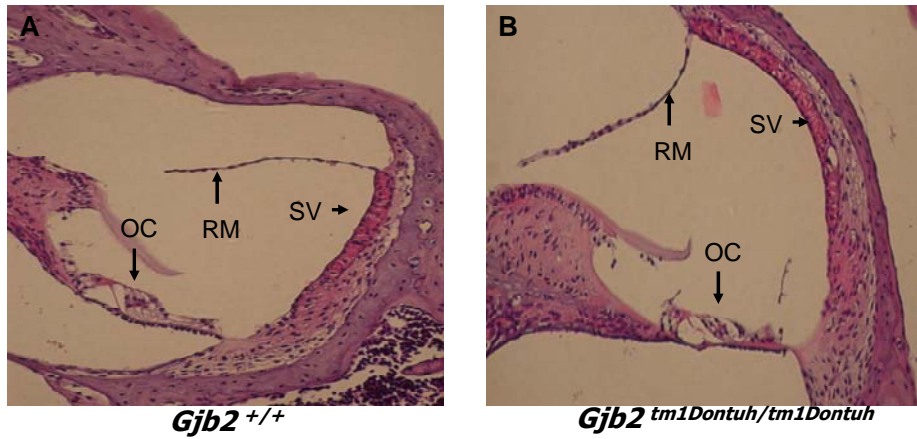
圖二十四



GJB2^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之聽力表徵

p.V37I 變異同型合子基因置換鼠 *GJB2^{tm1Dontuh/tm1Dontuh}* 之聽性腦幹反應檢查(p28 days)顯示聽力閾值變異大，有些為不正常(A 圖上)，有些為正常(A 圖下)。平均值略較異型合子基因置換鼠及野生鼠高，但具統計學上顯著差異，可見其遺傳模式亦與人類相同而為隱性遺傳(B 圖)。

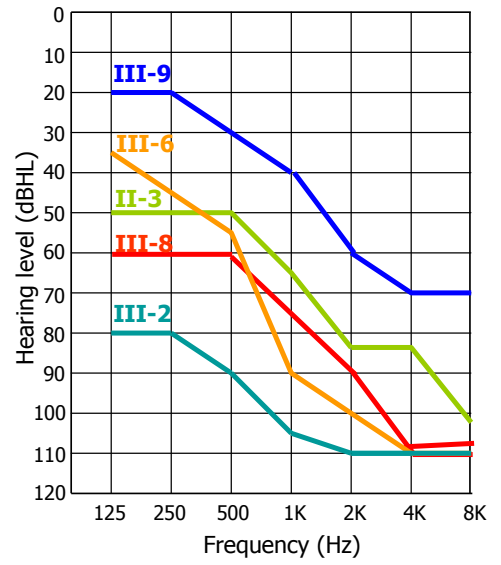
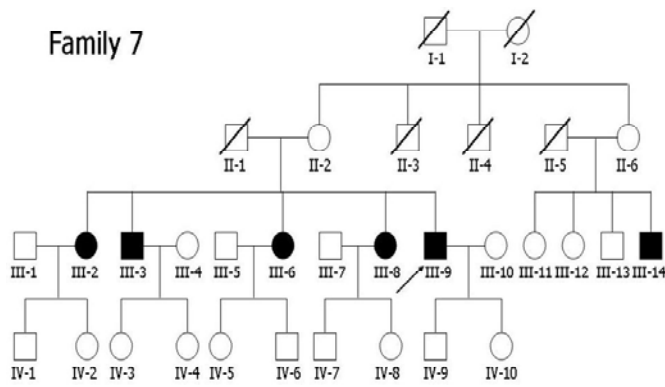
圖二十五



GJB2^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之內耳組織學

p.V37I 變異同型合子基因置換鼠 *GJB2*^{tm1Dontuh/tm1Dontuh} 之內耳組織學上未見明顯變化(下圖 B ; OC, organ of Corti; RM, Reissner membrane; SV, stria vascularis)。

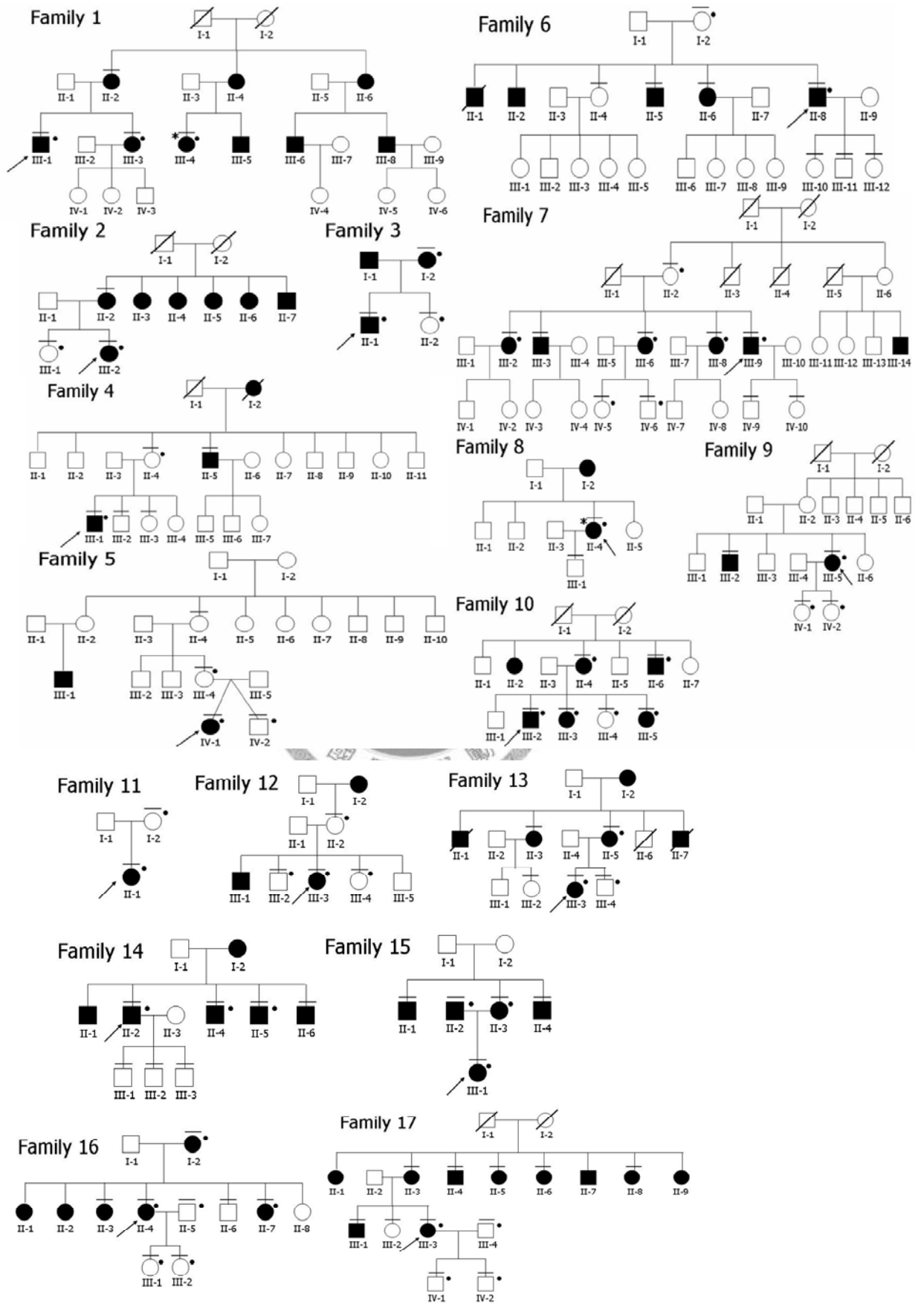
圖二十六



粒線體 m.1555A>G 突變臨床表現型之家族內差異性

同一家族中，雖然患病成員多呈現雙側對稱性、漸進性、學語後感音性聽損，且均顯示正常之顛骨電腦斷層掃描結果，然而彼此間聽損程度卻有極大的差異性。

圖二十七

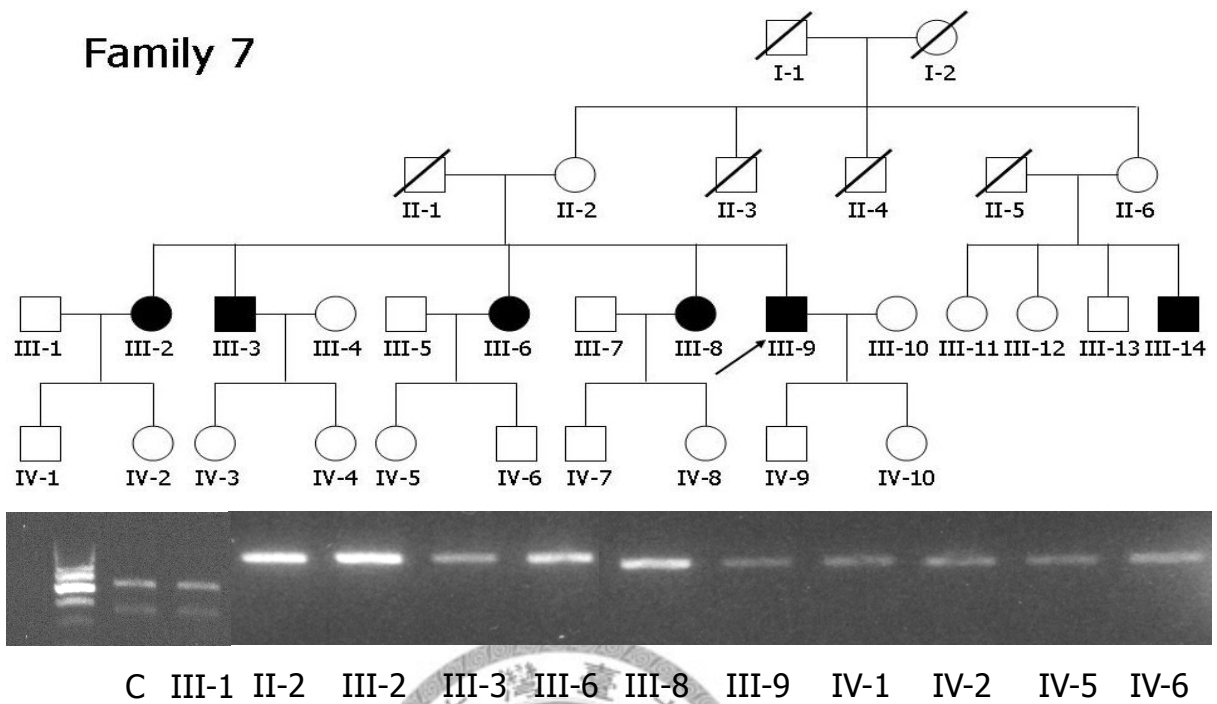


粒線體 m.1555A>G 突變臨床表現型之家族間差異性

不同家族間，其「外顯率」(penetrance)亦大不相同：有些家族中高達近十名成員發病，有些家族則只有一兩名成員發病。以家族內母系血親計算，各家族之外顯率由 13%至 78%不等。(Horizontal lines above the symbols indicate individuals who were interviewed, and dots indicate individuals who received audiologic examination and DNA sampling. Asterisks indicate individual who developed hearing loss after exposure to aminoglycoside.)



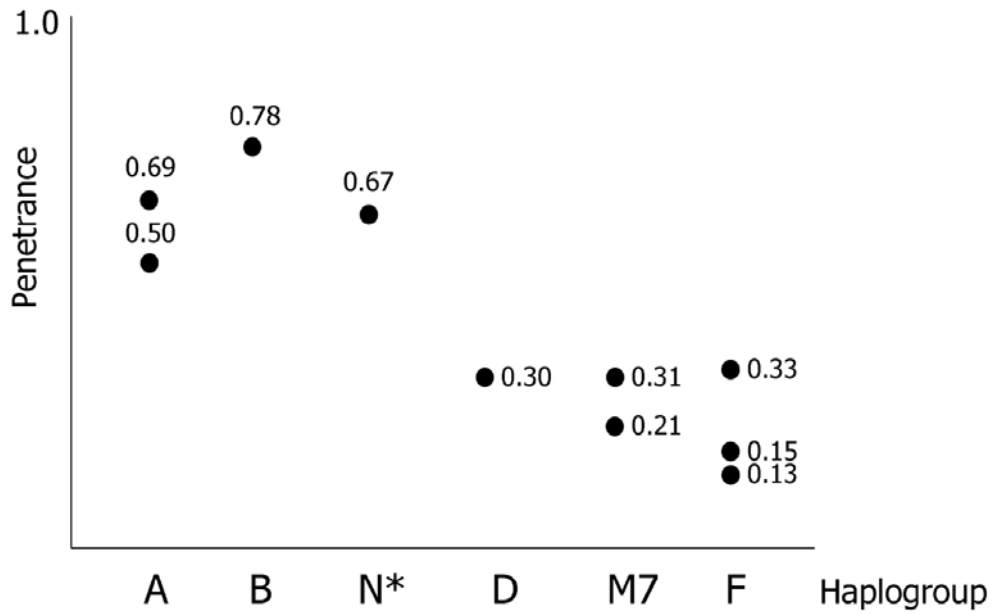
圖二十八



以一家族為例，所有母系遺傳成員皆帶有 m.1555A>G 同質突變

所有帶有粒線體 m.1555A>G 突變的受試者，不論發病與否，皆為同質 (homoplasmic) 突變，可知粒線體 m.1555A>G 突變之突變負荷，顯非決定國人 m.1555A>G 突變臨床表徵之重要因子。(Control: 2 bands; homoplasmic mutation: 1 band; heterplasmly: 3 bands)

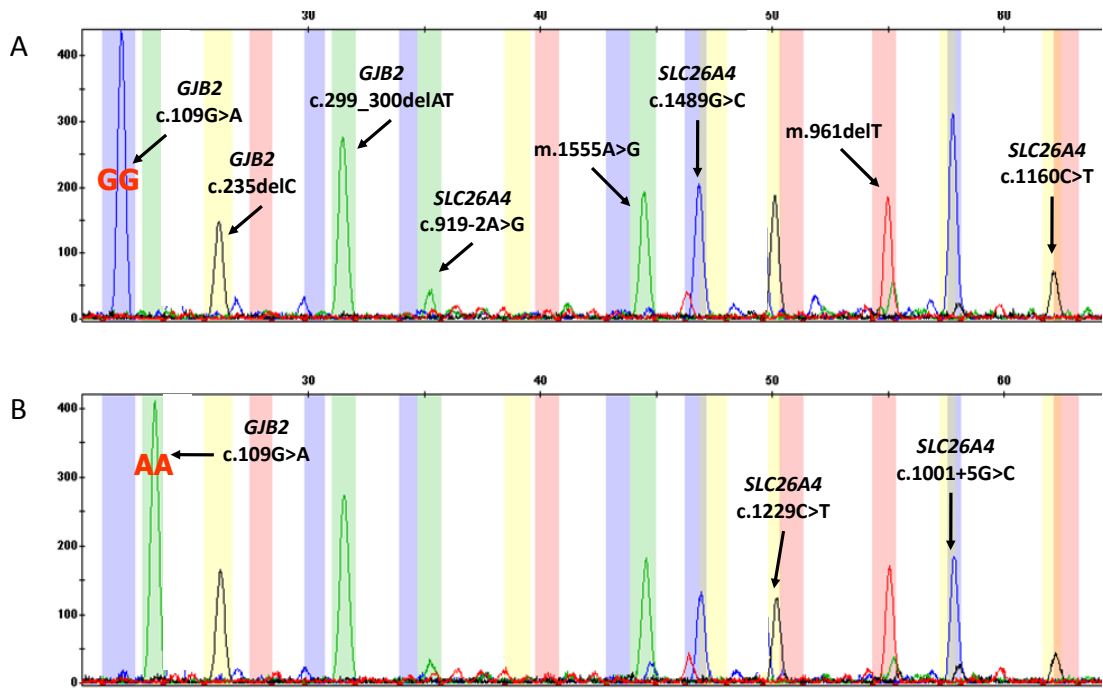
圖二十九



粒線體 m.1555A>G 突變外顯率與粒線體 DNA 單套群之相關性

單套群與表現型之相關性分析則顯示，不同粒線體 DNA 背景之家族間，外顯率亦不相同。而其中單套群 A 與 B 似乎與高外顯率有關，而單套群 F 則與低外顯率有關。(Penetrance = affected matrilineal relatives / total matrilineal relatives)

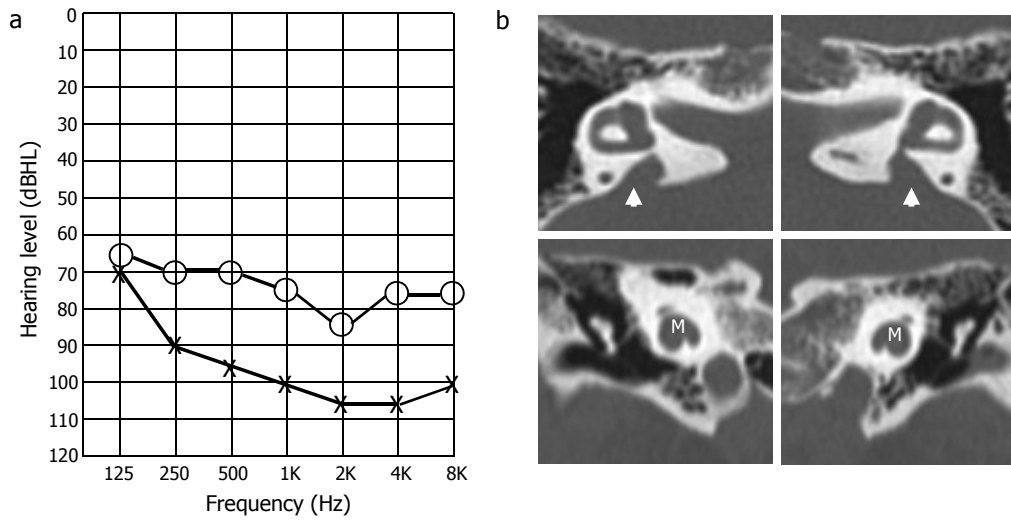
圖三十



SNaPshot 基因檢測之結果圖

每一基因變異點位皆可對應到特定位置之波型，而每一波型則因核苷酸各代表不同顏色，而可清楚區分出同型合子或異型合子等不同基因型。

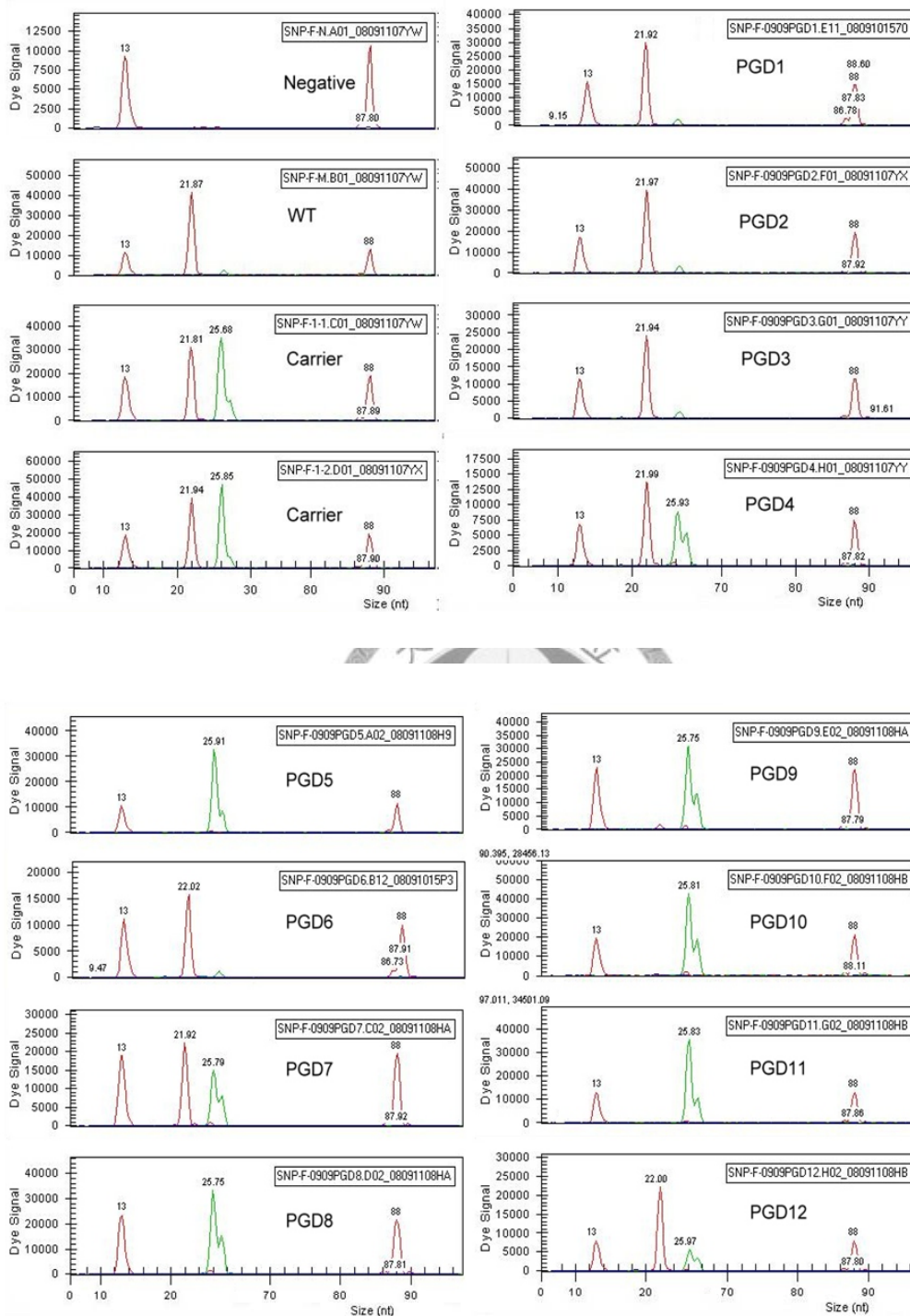
圖三十一



PGD 案例之聽力圖及內耳影像結果

吾人於日前診斷一名患大前庭導水管之男童帶有 *SLC26A4* 基因同型合子 (homozygous) c.919-2A>G 突變。該病童患有兩側重度聽損(圖 a)，電腦斷層掃描則顯示兩側大前庭導水管及 Mondini 氏發育不全(圖 b)。(箭頭：大前庭導水管；M：Mondini 氏發育不全)

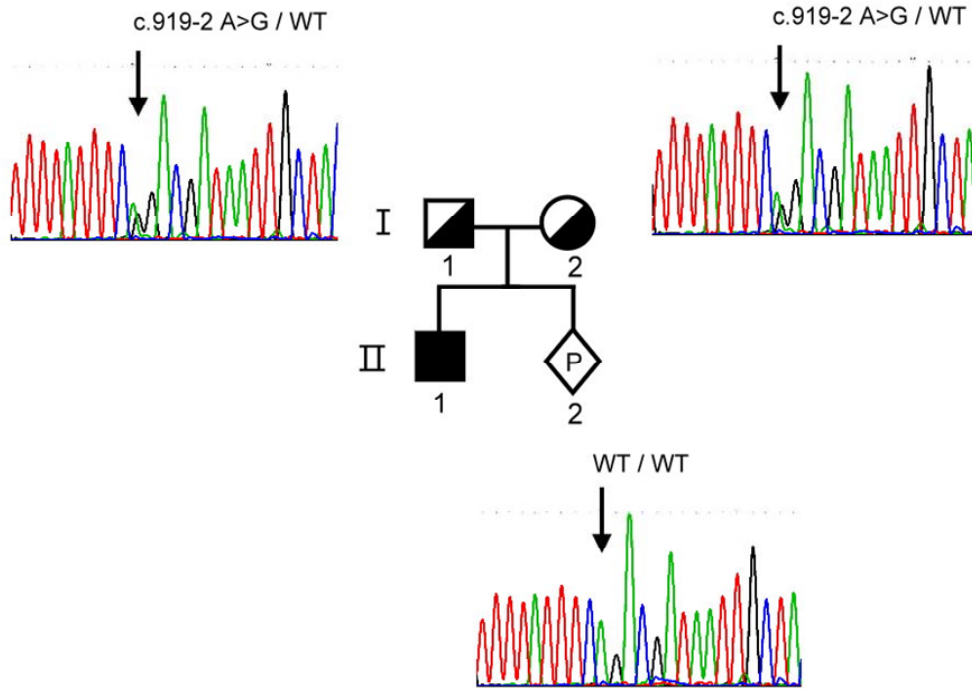
圖三十二



於第二次 PGD 療程所進行 12 個胚胎之基因檢測

於第二次 PGD 療程，本研究共於 12 個胚胎進行切片。共有 4 個胚胎(PGD1、PGD2、PGD3 與 PGD6)為完全正常，3 個胚胎(PGD4、PGD7 與 PGD12)帶單一突變點，另 5 個胚胎(PGD5、PGD8、PGD9、PGD10 與 PGD11) 則帶兩個突變點而會發病。

圖三十三

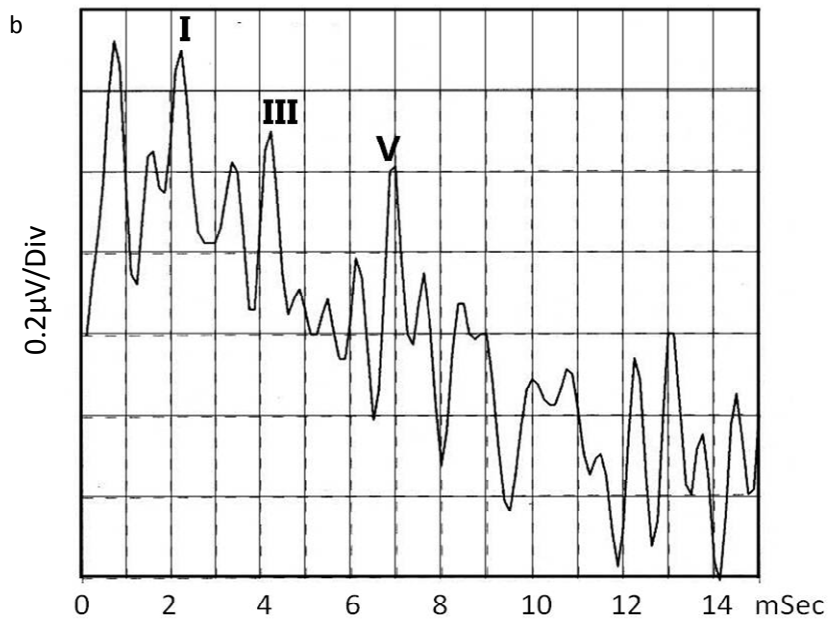
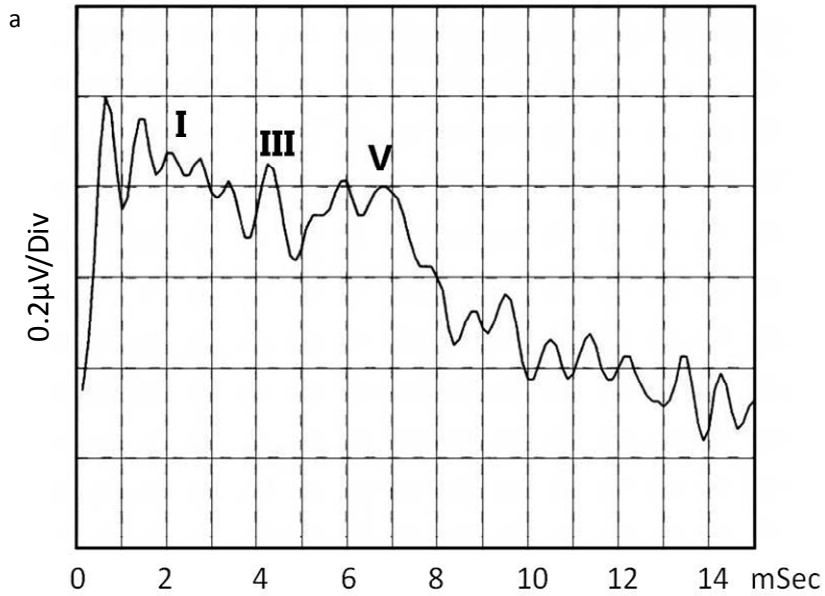


以絨毛膜取樣進行產前診斷

本研究於十一週時所進行之絨毛膜採樣證實胎兒未帶 *SLC26A4* 基因變異。



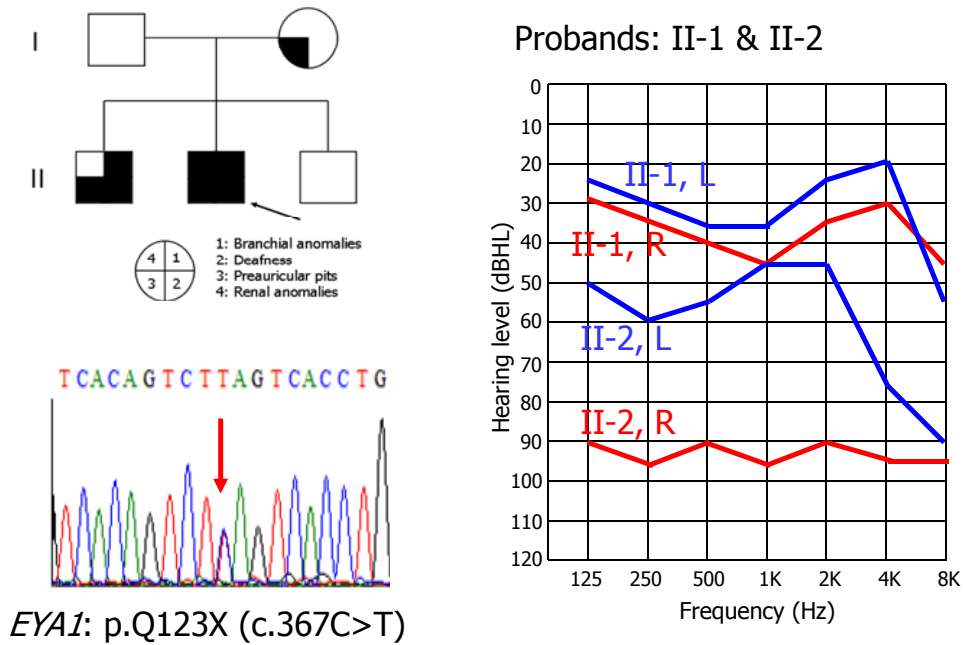
圖三十四



以 AABR (35 dBHL, clicks)進行新生兒聽力篩檢

該名胎兒已於 2009 年 5 月順利出生，出生時接受自動聽性腦幹反應(automated auditory brainstem response, AABR)檢測(35 dBnHL)，顯示聽力完全正常。(a, 右耳；b, 左耳)

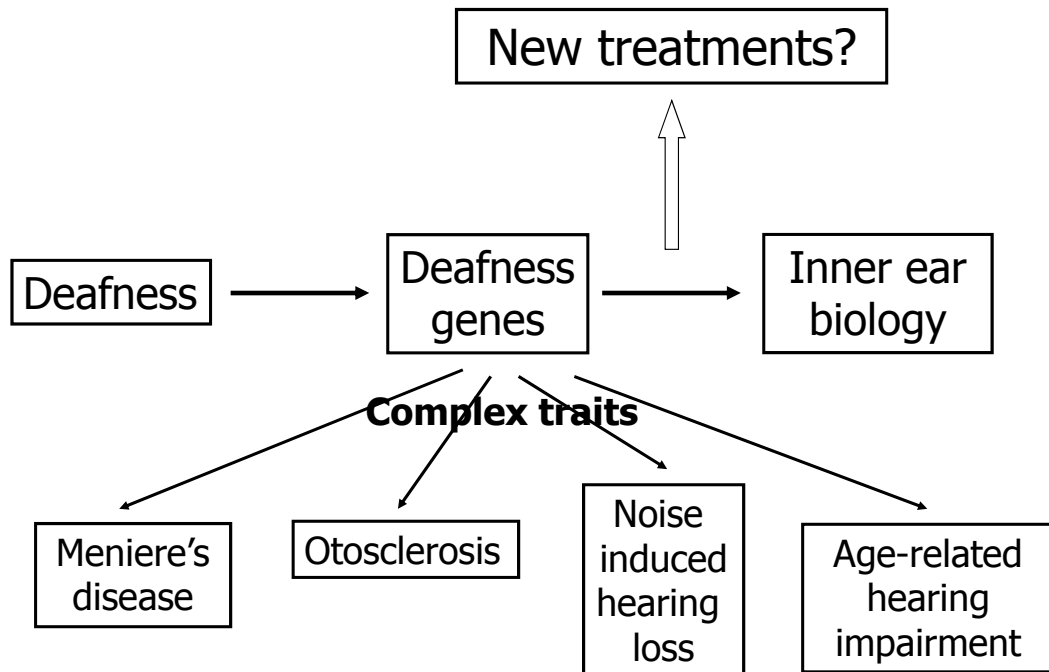
圖三十五



一 BOR 症候群家族及其所帶 *EYA1* 基因 p.Q123X 突變

我們可藉由檢查病人是否具特別之身體表徵，而將之分類為特定的症候群型遺傳性聽損，再針對其基因進行基因檢測。目前我們已利用此方式，區別出 8 個 BOR 症候群家族、6 個第二型 Usher 氏症候群家族、以及 5 個 Alport 氏症候群家族，再分別針對 *EYA1* 基因、*USH2A* 基因及 *COL4A5* 基因等進行突變檢測。本圖顯示本研究於一 BOR 症候群家族檢測出 *EYA1* 基因 p.Q123X 突變，即為適例。

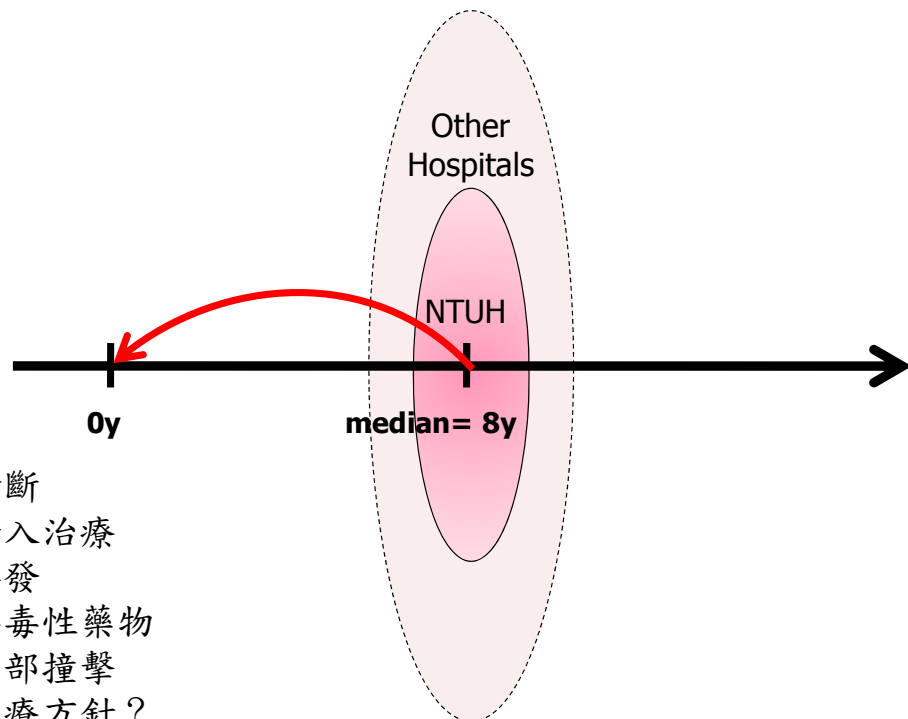
圖三十六



聽損基因研究之未來方向

未來研究的方向，應包括：常見耳聾基因變異致病性與成因之再探索、其他常見耳疾(如：美尼爾氏症、耳硬化症、噪音性聽損和老年性聽損)之基因研究、利用遺傳性聽損基因檢體庫找尋其他耳聾基因、以及新型態治療之研發等。

圖三十七



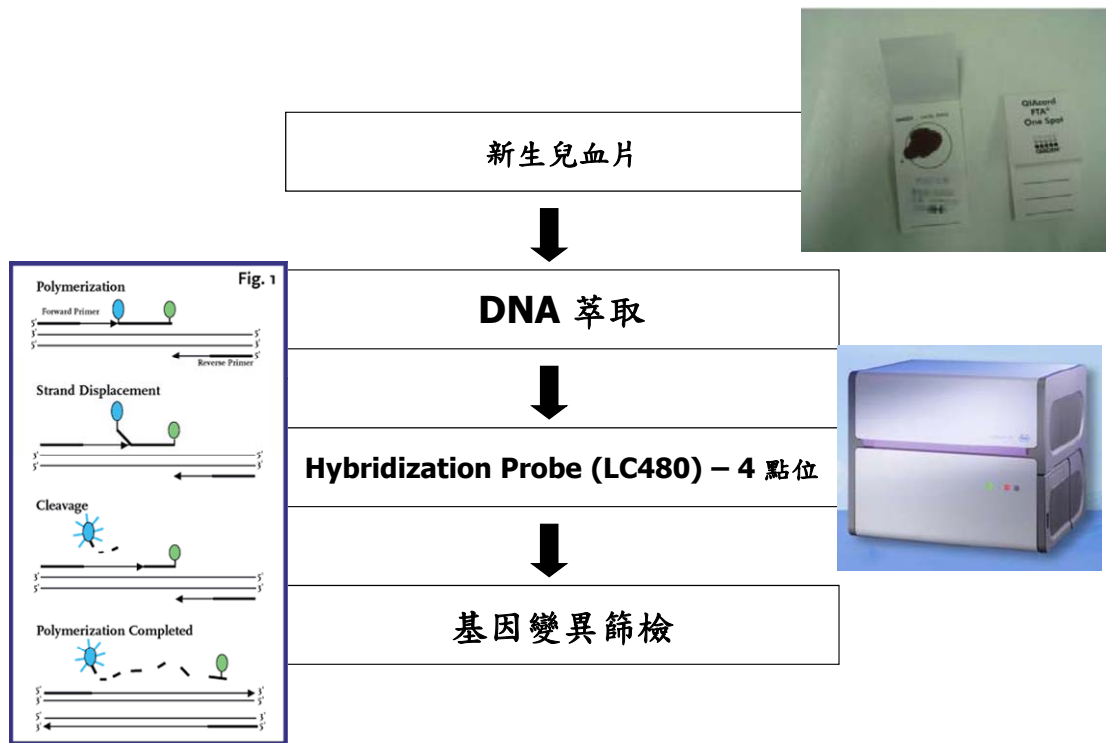
- 早期診斷
- 早期介入治療
- 預防再發
- 預防耳毒性藥物
- 預防頭部撞擊
- 擬定治療方針？

進行新生兒耳聾基因變異篩檢之原因

根據過去的臨床經驗，我們認為，新生兒耳聾基因篩檢可能可以提供以下的幫助：

- (1). 對小朋友的幫助：早期且確定地診斷聽力損失，及早接受聽語治療
- (2). 對父母親的幫助：減少下一胎聽損的機會
- (3). 對疾病本身的幫助：預防聽力的惡化

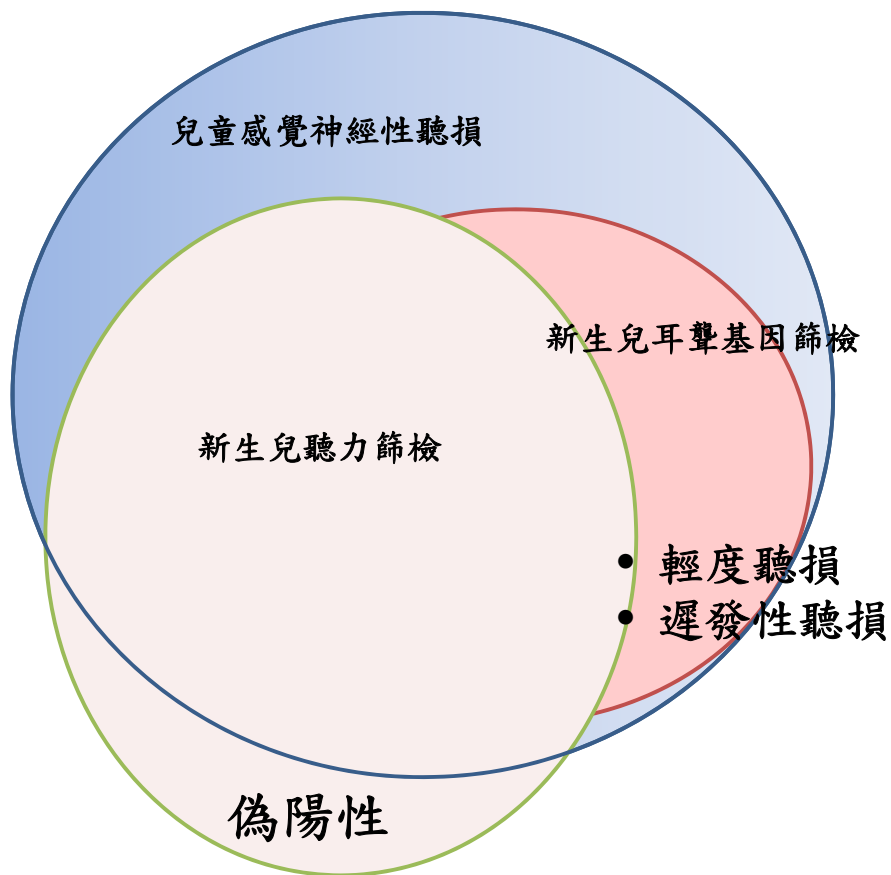
圖三十八



利用新生兒血片進行耳聾基因變異篩檢流程

我們研究團隊，日前已開始利用血片 DNA 萃取技術及 hybridization probe 基因檢測法，著手於新生兒耳聾基因變異篩檢。

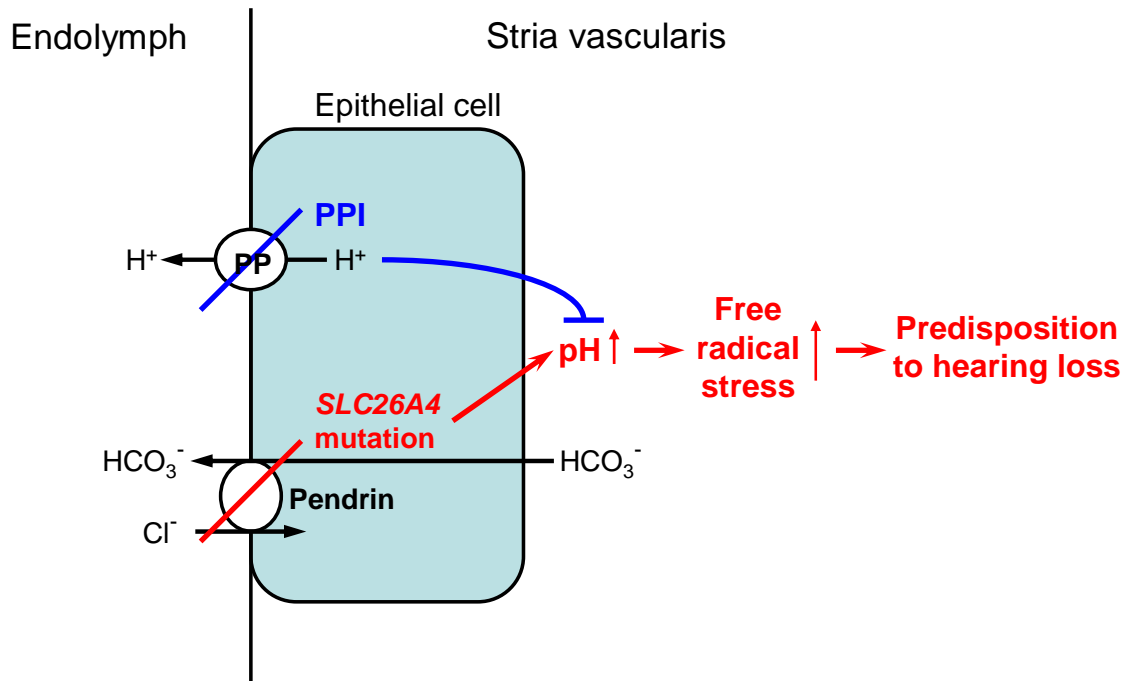
圖三十九



新生兒耳聾基因篩檢，可輔助傳統新生兒聽力篩檢，增加檢出率

我們所進行的新生兒耳聾基因篩檢，初步結果顯示我們現在所採行之新生兒聽力篩檢流程，有可能遺漏較輕度或晚發性之兒童聽損，而此一部分，似可以耳聾基因篩檢加以補足。

圖四十



質離子幫浦阻斷劑(PPI)作用於 *SLC26A4* 基因突變病人急性聽損之可能機制
SLC26A4 基因所製造的蛋白質—pendrin，在內耳之功能為將重碳酸根離子(HCO₃⁻)
從血管紋(stria vascularis)運送至內淋巴，故若發生突變，將導致血管紋內 pH 值
升高，並引起自由基累積及急性聽損。而質離子幫浦於血管紋之功能，則為將質
子從血管紋運送至內淋巴，因此，在質離子幫浦阻斷劑的作用下，恰可防止血管
紋內 pH 值的升高。

表一、420 個家族初始受試者之基本資料

Variables	Total probands (n=420)	Probands from hospitals (n=325)	Probands from rehabilitation facilities (n=95)
Age (yr, median [range])	8 [1-57]	10 [1-57] ^a	5 [1-20] ^a
Gender (M : F)	215 : 205	167 : 158 ^b	48 : 47 ^b
Familial : Sporadic	114 : 306	95 : 230 ^b	19 : 76 ^b
Clinical diagnosis			
Syndromic	29	22 ^c	7 ^c
Non-syndromic	391	303	88
Without IEMs	288	217 ^c	71 ^c
With EVA or MD	85	73 ^c	12 ^c
With other IEMs	18	13 ^c	5 ^c
Cochlear implantation			
Yes : No	89 : 331	58 : 267 ^d	31 : 64 ^d

IEM = inner ear malformation; EVA = enlarged vestibular aqueduct; MD = Mondini's dysplasia (incomplete partition of cochlea).

^a Mann-Whitney *U* test, $p < 0.01$.

^b Chi-square test, $p > 0.05$.

^c Chi-square test for heterogeneity in distribution of clinical diagnosis, $df = 3$, $p > 0.05$.

^d Chi-square test, $p < 0.05$.

表二、於 420 個家族中三段常見耳聾基因之基因變異光譜

Exon	Nucleotide change	Codon change	No. of variant alleles
<i>SLC26A4</i>			
3	c.230A>T	p.K77I	1
3' Int 7	c.919-2A>G	splice acceptor	102
5' Int 8	c.1001+5G>C	splice donor	1
9	c.1115C>T	p.A372V	3
10	c.1160C>T	p.A387V	2
10	c.1229C>T	p.T410M	3
12	c.1343C>T	p.S448L	3
13	c.1489G>C	p.G497R	1
19	c.2162C>T	p.T721M	1
19	c.2168A>G	p.H723R	4
<i>GJB2</i>			
2	c.109G>A*	p.V37I*	129
2	c.124G>A	p.E42K	2
2	c.187G>T	p.V63L	1
2	c.230G>A	p.W77X	1
2	c.235delC	frameshift	38
2	c.299_300delAT	frameshift	8
2	c.427C>T	p.R143W	1
2	c.508_509insAACG	frameshift	1
2	c.571T>C	p.F191L	1
<i>Mito. 12S rRNA</i>			
-	m.1555A>G	-	12
-	m.961delT+C(n)	-	4

* Pathogenicity unclear.

表三、醫院(Group A)及聽語復健中心(Group B)初始受試者中常見耳聾基因變異對偶基因頻率的差異

Genes/Variant alleles	Total Variant alleles no. (%) in the 420 probands ^a	Variant alleles no. (%) in Group A ^b	Variant alleles no. (%) in Group B ^c	Comparison between group A & B p-value
<i>SLC26A4</i>				
c.919-2A>G	102 (12.1%)	90 (13.8%)	12 (6.3%)	p < 0.05 ^d
Others	19 (2.3%)	15 (2.3%)	4 (2.1%)	p > 0.05 ^e
Total	121 (14.4%)	105 (16.2%)	16 (8.4%)	p < 0.05 ^d
<i>GJB2</i>				
p.V37I	129 (15.4%)	103 (15.8%)	26 (13.7%)	p > 0.05 ^d
c.235delC	38 (4.5%)	26 (4.0%)	12 (6.3%)	p > 0.05 ^d
Others	15 (1.8%)	11 (1.7%)	4 (2.1%)	p > 0.05 ^e
Total	182 (21.7%)	140 (21.5%)	42 (22.1%)	p > 0.05 ^d
<i>Mito. 12S rRNA</i>				
m.1555A>G	12 (2.9%)	11 (3.4%)	1 (1.1%)	p > 0.05 ^e
m.961delT+C(n)	4 (1.0%)	3 (0.9%)	1 (1.1%)	-
Total	16 (3.8%)	14 (4.3%)	2 (2.1%)	p > 0.05 ^e

^a 840 *GJB2* and *SLC26A4* alleles, but 420 mitochondria 12S rRNA alleles.

^b 650 *GJB2* and *SLC26A4* alleles, but 325 mitochondria 12S rRNA alleles.

^c 190 *GJB2* and *SLC26A4* alleles, but 95 mitochondria 12S rRNA alleles.

^d Chi-square test.

^e Fisher's exact test.

表四、醫院(Group A)及聽語復健中心(Group B)初始受試者中 *SLC26A4* 基因型分佈的比較

	Probands of group A	Probands of group B
Genotypes	(n=325)	(n=95)
	no. (%)	no. (%)
2 variant alleles detected	40 (12 %) ^a	7 (7%) ^a
1 variant allele detected	25 (8%) ^a	2 (2%) ^a
No variant detected	260 (80%) ^a	86 (91%) ^a

^a Chi-square test for heterogeneity in distribution of genotype prevalence, df = 2, p < 0.05.



表五、醫院(Group A)及聽語復健中心(Group B)初始受試者中聽力學特徵之比較

Variable	Probands of group A (n=325) no. (%)	Probands of group B (n=95) no. (%)	Total (n=420) no. (%)
Hearing loss patterns			
Fluctuating	67 (21%)	13 (14%)	80 (19%)
Progressive	108 (33%)	10 (11%)	118 (28%)
Stationary	150 (46%)	72 (76%)	222 (53%)
	—	$p < 0.01^a$	
Audiogram configurations			
Sloping	196 (60%)	46 (48%)	242 (58%)
Flat type	120 (37%)	46 (48%)	166 (40%)
Low tone	3 (1%)	1 (1%)	4 (1%)
Others	6 (2%)	2 (2%)	8 (2%)
		$p > 0.05^b$	
Hearing levels			
Mild (20~40dBHL)	23 (7%)	4 (4%)	27 (6%)
Moderate (41~70 dBHL)	108 (33%)	16 (17%)	124 (30%)
Severe (71~95 dBHL)	94 (29%)	33 (35%)	127 (30%)
Profound (> 95 dBHL)	100 (31%)	42 (44%)	142 (34%)
		$p < 0.01^c$	

^a Chi-square test for heterogeneity in distribution of hearing loss patterns between probands from hospitals and those from rehabilitation facilities, $df = 2$, $p < 0.01$.

^b Chi-square test for heterogeneity in distribution of audiogram configurations between probands from hospitals and those from rehabilitation facilities, $df = 3$, $p > 0.05$.

^c Chi-square test for heterogeneity in distribution of hearing levels between probands from hospitals and those from rehabilitation facilities, $df = 3$, $p < 0.01$.

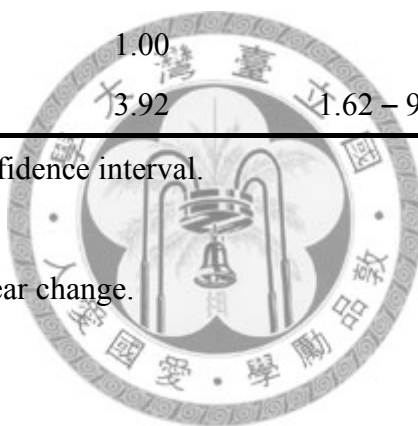
表六、以羅吉斯迴歸分析聽力學特徵與 *SLC26A4* 基因型之相關性

Variable	Adjusted OR	95% CI	p-value ^a
Age	1.01 ^b	0.97 – 1.05	0.580
Gender (male)	1.01	0.45 – 2.23	0.988
Hearing loss pattern			
Stationary	1.00		
Fluctuating	148.83	50.84 – 435.72	< 0.001
Progressive	4.51	1.31 – 15.55	0.017
Audiogram configuration			
Non-sloping	1.00		
Sloping	2.49	1.05 – 5.89	0.039
Hearing level			
Mild + Moderate	1.00		
Severe + Profound	3.92	1.62 – 9.49	0.003

OR = odds ratio; CI = confidence interval.

^a Wald test.

^b Odds ratio for per one-year change.



表七、於101個Pendred氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族之*SLC26A4*基因型分布

	No. (%) of families by No. of <i>SLC26A4</i> mutations		
	Zero	One	Two
Multiplex families (n=32)	3	4	25
Simplex families (n=69)	11	20	38
Total (n=101)	14	24	63

Multiplex families, more than one familial member affected ; simplex families, only one familial member affected.



表八、於 101 個 Pendred 氏症候群和非症候群型大前庭導水管家族之 *SLC26A4* 基因變異

Exon	Nucleotide change	Codon change	No. of variant alleles*
3	c.230A>T	p.K77I	1
3	c.235C>T	p.R79X	1
3	c.281C>T	p.T94I	2
7	c.916_917insG	p.V306GfsX24	1
3' Int 7	c.919-2A>G	splice acceptor	115
5' Int 8	c.1001+5G>C	splice donor	1
9	c.1115C>T	p.A372V	4
10	c.1160C>T	p.A387V	2
10	c.1174A>T	p.N392Y	1
10	c.1225C>T	p.R409C	1
10	c.1229C>T	p.T410M	4
12	c.1343C>T	p.S448L	3
13	c.1489G>C	p.G497R	1
5' Int 15	c.1705+5G>A	splice donor	1
16	c.1786C>T	p.Q596X	1
19	c.2162C>T	p.T721M	1
19	c.2168A>G	p.H723R	10
Total			150

* Among the 202 *SLC26A4* alleles of the 101 probands.

表九、於 c.919-2A>G 同型合子、異型合子及對照組所進行之 SNP 分析

JST160568

Subjects	CC	CT	TT	<i>P</i> -value
c.919-2A>G x2 (n=16)	0	0	16 ^a	<i>P</i> < .001 ^a
c.919-2A>G x1 (n=16)	0	3	13	
Controls (n=50)	3	19	28 ^a	

JST089508

Subjects	CC	CA	AA	<i>P</i> -value
c.919-2A>G x2 (n=16)	16 ^b	0	0	<i>P</i> < .0001 ^b
c.919-2A>G x1 (n=16)	8	8	0	
Controls (n=50)	8 ^b	22	20	

JST160566

Subjects	CC	CG	GG	<i>P</i> -value
c.919-2A>G x2 (n=16)	15 ^c	1	0	<i>P</i> < .0001 ^c
c.919-2A>G x1 (n=16)	7	9	0	
Controls (n=50)	4 ^c	20	26	

JST160565

Subjects	GG	GC	CC	<i>P</i> -value
c.919-2A>G x2 (n=16)	14 ^d	2	0	<i>P</i> < .0001 ^d
c.919-2A>G x1 (n=16)	5	7	4	
Controls (n=50)	6 ^d	23	21	

^a Rows combined for Fisher's exact test; ^b Rows combined for Fisher's exact test;

^c Rows combined for Fisher's exact test; ^d Rows combined for Fisher's exact test

表十、*SLC26A4* 基因型與表現型之關連性

	Probands with 2 alleles of truncating mutations (n=39)	Other probands with 2 mutated alleles (n=24)	Probands with 1 mutated allele (n=24)	Probands with 0 mutated allele (n=14)	p-value*
Types of IEMs, n (%)					
Isolated EVA	15 (38)	12 (50)	10 (42)	8 (57)	0.60
EVA + other IEMs	24 (62)	12 (50)	14 (58)	6 (43)	
Goiter, n (%)	3 (8)	2 (8)	2 (8)	0 (0)	0.86
Hearing levels, dBHL, mean (SD)	86.2 (17.7)	87.4 (17.1)	82.0 (19.0)	81.1 (23.9)	0.63
Fluctuating hearing loss, n (%)	33 (85)	19 (79)	16 (67)	7 (50)	0.06
Sloping audiogram, n (%)	29 (74)	17 (71)	18 (75)	7 (50)	0.36

IEM = inner ear malformation; EVA = enlarged vestibular aqueduct.

* p-value by χ^2 or Fisher's exact test for categorical variables and ANOVA for continuous variables.

表十一、*SLC26A4* 基因促進區(promoter)及 *FOXII* 基因之基因變異

Gene/Region	Nucleotide change	Codon change	No. (%) of alleles*
<i>SLC26A4 promoter</i>			
Region 1 (c.-2988 to c.-2258)	c.-2554G>A	-	1 (1)
Region 2 (c.-1063 to c.-325)	c.-964A>C	-	19 (25)
<i>FOXII</i>			
Exon 1	c.279G>A	p.R93R	35 (46)

* Among the 76 alleles of the 38 probands with 1 or 0 mutated *SLC26A4* allele detected.



表十二、21 名 c.919-2A>G 異型合子病人之未被偵測出突變 *SLC26A4* 對偶基因之單套型

Haplotype								No. (%) of alleles (n=21)
rs#2248464	rs#2248465	rs#2712212	rs#3839817	rs#2395911	rs#2072064	rs#2072065	rs#2301634	
A	C	T	TCTTT	A	T	T	T	4 (19)
A	C	T	TCTTT	C	A	C	T	4 (19)
T	C	C	TCTTT	C	A	C	T	1 (5)
T	C	T	TCTTT	A	T	T	T	3 (14)
T	C	T	TCTTT	C	A	C	T	1 (5)
T	T	C	TCTTT	C	A	C	T	1 (5)
T	T	C	-	A	T	T	T	1 (5)
T	T	T	TCTTT	A	T	T	T	3 (14)
T	T	T	TCTTT	C	A	C	T	3 (14)



表十三、不同組間基因變異對偶基因頻率之比較

Genes/Variant alleles	Allele no. (%)		
	Severe-to-profound SNHI ^a	Mild-to-moderate SNHI ^b	Control ^c
<i>GJB2</i>			
p.V37I	91 (12.8) ^d	228 (30.3) ^e	184 (9.2)
Other definite mutations	48 (6.7)	28 (3.7)	5 (0.2)
<i>SLC26A4</i>			
Definite mutations	144 (20.2)	48 (6.4)	NA
<i>Mito. 12S rRNA</i>			
m.1555A>G	16 (4.5)	15 (4.0)	NA

^a 712 *GJB2* and *SLC26A4* alleles, but 356 mitochondria 12S rRNA alleles.

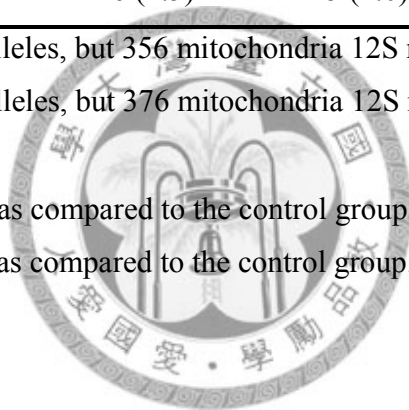
^b 752 *GJB2* and *SLC26A4* alleles, but 376 mitochondria 12S rRNA alleles.

^c 2010 *GJB2* alleles.

^d Chi-square test, $p = 0.007$ as compared to the control group.

^e Chi-square test, $p < 0.001$ as compared to the control group.

NA = not available

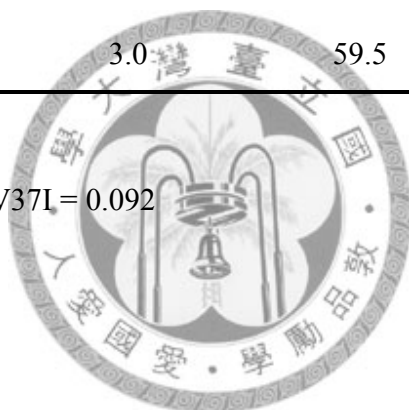


表十四、聽損程度不同組間 p.V37I 變異基因型分布之比較

	Genotype (n)			p-value
	p.V37I/p.V37I	p.V37I/others	others/others	
Mild-to-moderate SNHI (n=376)				
Observed no.	77	74	225	p < 0.001*
Expected no.**	3.2	62.8	310	
Severe-to-profound SNHI (n=356)				
Observed no.	9	73	274	p < 0.001*
Expected no.	3.0	59.5	293.5	

* Chi-square goodness-of-fit test.

** Assumed allele frequency of p.V37I = 0.092



表十五、不同 p.V37I 基因型病人基本資料與聽力表徵之比較

Variable	p.V37I/p.V37I (n=86)	p.V37I/MT* (n=12)	Others (n=634)	p-value
Male, n (%)	52 (60)	6 (50)	295 (47)	0.55**
Age, median [range], y	16 [1-54]	18 [2-42]	12.5 [1-75]	0.61***
Hearing levels, mean (SD), dBHL	48.5 (18.7)	58.5 (27.0)	73.2 (25.9)	< 0.001****
Hearing loss patterns, n (%)				
Fluctuating	4 (5)	0 (0)	113 (18)	0.11**
Progressive	49 (57)	6 (50)	218 (34)	
Stationary	33 (38)	6 (50)	303 (48)	
Audiogram configurations, n (%)				
Sloping	49 (57)	8 (67)	330 (52)	0.40**
Flat type	29 (34)	4 (33)	254 (40)	
High tone	7 (8)	0 (0)	18 (3)	
Others	1 (1)	0 (0)	32 (5)	

* MT indicates other *GJB2* mutations, including 9 c.235delC mutation and 3 c.299_300delAT mutation.

** P-value by χ^2 or Fisher's exact test.

*** Wilcoxon rank-sum test.

**** ANOVA, post hoc test for significance with the Tukey multiple comparison procedure: genotype p.V37I/p.V37I vs others, $p < 0.001$.

表十六、1005 名受試者基本資料 (mean (S.D.) or n (%))

Variables	Value
Age (years)	56.4 (9.0)
Male sex (%)	487 (48.5)
Smoking (%)	137 (13.6)
Alcohol consumption (%)	292 (29.1)
Coronary heart disease (%)	49 (4.9)
Cerebral vascular disease (%)	5 (0.5)
Hypertension (%)	188 (18.7)
Diabetes (%)	82 (8.2)
Hyperlipidemia (%)	84 (8.4)
Renal disease (%)	14 (1.4)



表十七、依 Z_{low} , Z_{4-tone} 與 Z_{high} scores 區分實驗組與對照組年齡、性別之比較

	Z_{low}			Z_{4-tone}			Z_{high}		
	Case (n=335)	Controls (n=335)	<i>P</i> -value	Case (n=335)	Controls (n=335)	<i>P</i> -value	Case (n=335)	Controls (n=335)	<i>P</i> -value
M : F	163 : 172	161 : 174	0.92	178 : 157	153 : 182	0.06	183 : 152	161 : 174	0.10
Age (mean \pm SD)	56.4 \pm 9.9	57.3 \pm 8.4	0.22	56.3 \pm 9.9	57.4 \pm 8.4	0.11	56.4 \pm 9.0	56.7 \pm 8.2	0.73



表十八、依 Z_{low} , Z_{4-tone} 與 Z_{high} scores 區分實驗組與對照組基因型之分布

Loci	Genotype	Z_{low}			Z_{4-tone}			Z_{high}		
		Case (n=335)	Controls (n=335)	Odds ratio (95% CI)	Case (n=335)	Controls (n=335)	Odds ratio (95% CI)	Case (n=335)	Controls (n=335)	Odds ratio (95% CI)
c.79G>A ^a	G/G	183	186	1.0	171	196	1.0	165	196	1.0
	G/A	123	128	1.0 (0.7-1.4)	137	123	1.3 (0.9-1.8)	142	121	1.4 (1.0-1.9)
	A/A	29	21	1.4 (0.8-2.8)	27	16	1.9 (1.0-3.7)	28	18	1.9 (1.0-3.5)
c.109G>A _b	G/G	281	281	1.0	273	282	1.0	275	283	1.0
	G/A	42	52	0.8 (0.5-1.3)	51	51	1.0 (0.7-1.6)	51	50	0.5 (0.3-3.8)
	A/A	12	2	6.0 (1.3-27.1)	11	2	5.7 (1.3-25.9)	9	2	2.2 (0.5-10.3)
c.235delC	1/1*	333	333	1.0	333	333	1.0	333	334	1.0
	1/2	2	2	1.0 (0.1-7.1)	2	2	1.0 (0.1-7.1)	2	1	0.5 (0.1-5.5)
	2/2	0	0	--	0	0	--	0	0	--
c.341A>G ^c	A/A	213	220	1.0	207	229	1.0	201	236	1.0
	A/G	103	106	1.0 (0.7-1.4)	111	98	1.3 (0.9-1.7)	120	91	1.6 (1.1-2.2)
	G/G	19	9	2.2 (1.0-4.9)	17	8	2.4 (1.0-5.6)	14	8	2.1 (0.9-5.0)
c.368C>A	C/C	330	325	1.0	329	326	1.0	327	324	1.0
	C/A	5	10	0.5 (0.2-1.5)	6	9	0.7 (0.2-1.9)	8	11	0.7 (0.3-1.8)
	A/A	0	0	--	0	0	--	0	0	--
c.607T>C	T/T	304	301	1.0	301	298	1.0	306	303	1.0
	T/C	27	32	0.8 (0.5-1.4)	30	35	0.9 (0.5-1.4)	28	32	0.9 (0.5-1.5)
	C/C	4	2	2.0 (0.4-10.9)	4	2	2.0 (0.4-10.9)	1	0	--

Abbreviation: CI, confidence interval

*The wild type allele is denoted by allele 1 and the mutant allele is denoted by allele 2

^a Genotype distribution: $p = 0.039$ for Z_{high} scores (Fisher's exact test).

^b Genotype distribution: $p = 0.014$ for Z_{low} and $p = 0.043$ for Z_{4-tone} scores (Fisher's exact test).

^c Genotype distribution: $p = 0.015$ for Z_{high} scores (Fisher's exact test).

表十九、GJB2 單套型與老年性聽損之相關性

Haplotype*	Frequencies		Nominal <i>P</i>	Permuted <i>P</i> **
	Case	Control		
<i>Z</i> _{low} study				
G-G-A-T	0.565	0.595	0.257	0.254
A-G-G-T	0.201	0.179	0.302	0.320
G-A-A-T	0.096	0.082	0.365	0.415
A-G-A-T	0.066	0.068	0.910	0.922
G-G-A-C	0.052	0.053	0.926	0.989
<i>Z</i> _{high} study				
G-G-A-T	0.537	0.622	0.002	0.002*
A-G-G-T	0.211	0.151	0.005	0.003*
G-A-A-T	0.101	0.079	0.157	0.185
A-G-A-T	0.082	0.075	0.651	0.681
G-G-A-C	0.045	0.047	0.831	0.877
<i>Z</i> _{4tone} study				
G-G-A-T	0.527	0.616	0.001	0.001*
A-G-G-T	0.203	0.163	0.058	0.060
G-A-A-T	0.107	0.081	0.106	0.137
A-G-A-T	0.080	0.060	0.146	0.174
G-G-A-C	0.057	0.056	0.871	0.862

*Haplotype composed of c.79G>A - c.109G>A - c.341A>G - c.607T>C

**Permutation 10,000 times.

表二十、不同 c.109G>A 基因型之平均 Z_{low} , Z_{4-tone} 與 Z_{high} scores

c.109G>A (n)	Z_{low}			Z_{4-tone}			Z_{high}		
	Mean	SD	SE	Mean	SD	SE	Mean	SD	SE
Total (n=1005)	1.37	1.08	0.03	0.91	0.95	0.03	0.46	0.89	0.03
<i>GG</i> (n=838)	1.36	1.06	0.04	0.90	0.93	0.03	0.43	0.86	0.03
<i>GA</i> (n=150)	1.29	1.04	0.08	0.88	0.91	0.07	0.51	0.90	0.07
<i>AA</i> (n=17)	2.67	1.48	0.36	2.06	1.53	0.37	1.48	1.53	0.37
<i>p</i> - value	<0.001*			<0.001*			<0.001*		

Abbreviations: SD, standard deviation; SE, standard error.

*Analysis of variance, post hoc test for significance with the Tukey multiple comparison procedure:
genotype *AA* vs genotype *GA*, $p < 0.001$; genotype *AA* vs genotype *GG*, $p < 0.001$

表二十一、羅吉斯回歸

a. 羅吉斯回歸校正其他干擾因子(Z_{low} scores)

Parameter	DF	Estimate	SE	Wald χ^2	<i>p</i> - value	Exp(β)	95% CI for	
							Lower	Upper
Intercept	1	- 0.38	0.37	1.05	0.31	0.7		
Genotype <i>AA</i> at c.109G>A	1	1.79	0.77	5.40	0.02*	6.0	1.3	27.3
Sex	1	0.10	0.18	0.34	0.56	1.1	0.8	1.6
Coronary heart disease	1	0.21	0.37	0.32	0.58	1.2	0.6	2.6
Hypertension	1	- 0.05	0.22	0.04	0.84	1.0	0.6	1.5
Diabetes	1	0.39	0.31	1.63	0.20	1.5	0.8	2.7
Hyperlipidemia	1	- 0.11	0.31	0.12	0.73	0.9	0.5	1.6
Renal disease	1	0.90	0.70	1.65	0.20	2.5	0.6	9.7
Cerebral vascular disease	1	0.79	1.19	0.44	0.51	2.2	0.2	22.7
Smoking	1	0.11	0.08	2.02	0.16	1.1	1.0	1.3
Alcohol consumption	1	- 0.01	0.09	0.01	0.91	1.0	0.8	1.2

b. 羅吉斯回歸校正其他干擾因子($Z_{4\text{-tone}}$ scores)

Parameter	DF	Estimate	SE	Wald χ^2	<i>p</i> - value	Exp(β)	95% CI for	
							Lower	Upper
Intercept	1	1.64	0.78	4.43	0.64	1.2		
Genotype <i>AA</i> at c.109G>A	1	- 0.23	0.18	1.75	0.03*	5.1	1.1	23.7
Sex	1	0.04	0.36	0.01	0.19	0.8	0.6	1.1
Coronary heart disease	1	- 0.22	0.21	1.10	0.92	1.0	0.5	2.1
Hypertension	1	0.28	0.29	0.92	0.30	0.8	0.5	1.2
Diabetes	1	- 0.17	0.30	0.32	0.34	1.3	0.7	2.4
Hyperlipidemia	1	0.73	0.72	1.04	0.57	0.8	0.5	1.5
Renal disease	1	- 0.16	1.04	0.02	0.31	2.0	0.5	8.5
Cerebral vascular disease	1	- 0.03	0.08	0.18	0.88	0.9	0.1	6.6
Smoking	1	0.10	0.09	1.26	0.67	1.0	0.8	1.1
Alcohol consumption	1	0.04	0.07	0.27	0.26	1.1	0.9	1.3

Abbreviations: CI, confidence interval; DF, degree of freedom; SE, standard error.

* $p < 0.05$

表二十二、10 個 m.1555A>G 突變家族初始受試者之臨床表現型

	Age/Sex	Aminoglycosid e exposure	PE & NE	Onset of HL (y)	Pattern of HL	Hearing levels	Audiogram Configuration	Temporal bone HRCT finding	Penetrance*
Proband 1	49/M	-	normal	10-20 y	progressive	moderate	down-sloping	NP	69%
Proband 2	43/F	-	normal	10-20 y	progressive	moderate	down-sloping	NP	78%
Proband 3	7/M	-	normal	< 10 y	progressive	moderate	down-sloping	normal	67%
Proband 4	31/M	-	normal	< 10 y	progressive	moderate	down-sloping	normal	21%
Proband 5	7/F	-	normal	< 10 y	stationary	moderate	down-sloping	normal	13%
Proband 6	37/M	-	normal	< 10 y	progressive	severe	down-sloping	normal	31%
Proband 7	38/M	-	normal	10-20 y	progressive	moderate	down-sloping	normal	30%
Proband 8	45/F	+	normal	> 40 y	progressive	severe	down-sloping	normal	33%
Proband 9	38/F	-	normal	10-20 y	progressive	severe	down-sloping	normal	15%
Proband 10	36/M	-	normal	10-20 y	progressive	severe	down-sloping	normal	50%

PE, physical examination; NE, neurological examination; HL, hearing loss; HRCT, high resolution computed tomography; NP, not performed.

*Penetrance = affected matrilineal relatives / total matrilineal relatives

表二十三、粒線體 DNA 單套群與 m.1555A>G 突變外顯率之比較

	No. of subjects	No. of hearing impaired subjects (%)
Haplogroup A	24	14 (58%) [#]
Haplogroup B	9	7 (78%) [#]
Haplogroup D	20	6 (30%)
Haplogroup F	33	5 (15%) [#]
Haplogroup M7	30	8 (27%)
Haplogroup N*	3	2 (67%)
Total	119	42 (37.5%)
Chi-square test for heterogeneity		p = 0.018

[#] p < 0.05, post hoc chi-square test for difference between one haplogroup and the combination of the other haplogroups



表二十四、比較不同基因檢測結果之語音聽知覺表現

Variable	<i>SLC26A4</i>	<i>GJB2</i>	Mutation (-) (n=45)	P Value
	Mutation (+) (n=18)	Mutation (+) (n=4)		
Male, n (%)	7 (39)	3 (75)	21 (47)	.42*
Age, mean (SD), y	9.7 (3.6)	8.3 (2.3)	9.5 (3.0)	.74**
Age at implantation, mean (SD), y	5.7 (3.2)	3.2 (1.0)	4.4 (2.8)	.18**
Duration of implant use, mean (SD), y	3.7 (1.4)	4.7 (2.0)	4.6 (1.7)	.12**
Pure-tone average before implantation, mean (SD), dBHL	98.7 (10.6)	103.5 (4.4)	103.0 (9.5)	.27**
Achievement of open-set speech recognition, n (%)	18 (100)	4 (100)	34 (76)	.040*
Speech recognition scores, mean (SD), %				
Consonant	88.0 (7.2)	90.5 (1.9)	66.2 (38.6)	.035 [#]
Vowel	86.2 (6.1)	81.5 (8.4)	64.6 (38.0)	.047 [#]
Tone	91.7 (6.3)	95.5 (1.9)	71.0 (41.3)	.064 [#]
Phonetically-balanced word	79.2 (10.5)	73.5 (6.8)	56.3 (34.4)	.018 [#]
Sentence	89.9 (10.8)	93.3 (5.4)	58.3 (37.7)	.001 [#]

* Chi-square test for heterogeneity, df=2.

** ANOVA.

[#] ANOVA, Post hoc test significance (Tukey): consonant: *SLC26A4* mutation (+) versus mutation (-) ($P=.047$); vowel: *SLC26A4* mutation (+) versus mutation (-) ($P=.044$); phonetically-balanced word: *SLC26A4* mutation (+) versus mutation (-) ($P=.017$); sentence: *SLC26A4* mutation (+) versus mutation (-) ($P=.002$).

表二十五、比較不同影像學結果之語音聽知覺表現

Variable	Narrow	Other		P Value
	IAC (+) (n=9)	IEMs (+) (n=24)	IEMs (-) (n=34)	
Male, n (%)	3 (33)	10 (42)	18 (53)	.49*
Age, mean (SD), y	7.3 (2.0)	9.0 (3.3)	9.9 (3.4)	.34**
Age at implantation, mean (SD), y	3.4 (1.3)	4.9 (3.1)	4.9 (3.1)	.40**
Duration of implant use, mean (SD), y	4.6 (1.6)	3.8 (1.4)	4.8 (1.8)	.08**
Pure-tone average before implantation, mean (SD), dBHL	106.3 (9.7)	98.4 (11.5)	103.1 (7.5)	.06**
Achievement of open-set speech recognition, n (%)	2 (22)	23 (96)	31 (91)	<.001*
Speech recognition scores, mean (SD), %				
Consonant	17.8 (35.3)	82.4 (19.1)	81.1 (26.4)	<.001 [#]
Vowel	18.0 (35.7)	81.7 (18.3)	78.0 (26.3)	<.001 [#]
Tone	21.3 (42.3)	88.2 (19.8)	85.7 (27.9)	<.001 [#]
Phonetically-balanced word	14.7 (29.1)	73.2 (19.0)	68.8 (25.2)	<.001 [#]
Sentence	15.7 (31.1)	80.3 (23.8)	73.4 (29.4)	<.001 [#]

Abbreviations: IAC, internal auditory canal; IEM, inner ear malformation.

* Chi-square test for heterogeneity, df=2.

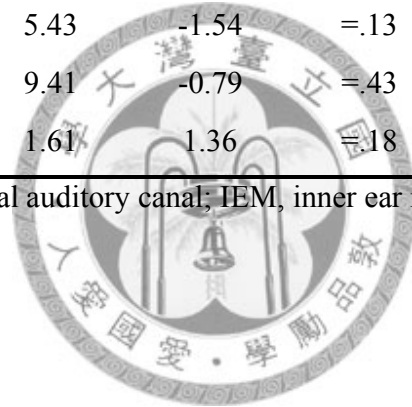
** ANOVA.

[#] ANOVA, Post hoc test significance (Tukey): consonant, vowel, tone, phonetically-balanced word and sentence: Narrow IAC (+) versus other IEMs (+) (all $P<.001$), Narrow IAC (+) versus IEMs (-) (all $P<.001$).

表二十六、以廣義線性模式分析各預後因子與語音辨識率總和之相關性

Variable	β	SE	t-value	P Value
Interception	231.82	168.84	1.37	=.17
Narrow IAC	-315.01	46.57	-6.76	<.001
Other IEMs	-62.91	55.60	-1.13	=.26
<i>SLC26A4</i> mutation	124.40	59.98	2.07	=.04
<i>GJB2</i> mutation	52.50	64.17	0.82	=.42
Age at implantation, y	-8.37	5.43	-1.54	=.13
Duration of implant use, y	-7.40	9.41	-0.79	=.43
Residual hearing, dBHL	2.20	1.61	1.36	=.18

Abbreviations: SE, standard error; IAC, internal auditory canal; IEM, inner ear malformation.



表二十七、24 名內耳畸形病童之植入人工耳蝸後之語音聽知覺表現

Patient No.	<i>SLC26A4</i> genotype	Inner ear malformation	Recognition score (%)				
			Consonant	Vowel	Tone	PB word	Sentence
Patients with <i>SLC26A4</i> mutations							
1	IVS7-2A>G/2168A>G	E	90	90	94	82	99
2	IVS7-2A>G/IVS7-2A>G	E	98	90	98	96	98
3	1229C>T/2162C>T	E, M, V, S	92	74	84	58	84
4	IVS7-2A>G/1343C>T	E, M, V, S	94	88	92	86	96
5	IVS7-2A>G/IVS7-2A>G	E	94	96	100	92	100
6	IVS7-2A>G/1160C>T	E	80	80	98	66	88
7	IVS7-2A>G/IVS7-2A>G	E	90	86	88	82	99
8	IVS7-2A>G/wt	E	90	88	94	82	84
9	IVS7-2A>G/wt	E	78	84	94	70	59
10	IVS7-2A>G/IVS7-2A>G	E	98	98	100	96	72
11	2168A>G/2168A>G	E	76	82	80	72	80
12	IVS7-2A>G/IVS8+5G>C	EM	82	86	96	68	94
		(average)	88.5	86.8	93.2	79.2	87.8
Patients without <i>SLC26A4</i> mutations							
13	wt/wt	CC, S, NI	CNT	CNT	CNT	CNT	CNT
14	wt/wt	CC, S, NI	CNT	CNT	CNT	CNT	CNT
15	wt/wt	CH, VH, S, NI	84	78	98	64	71
16	wt/wt	NI	CNT	CNT	CNT	CNT	CNT
17	wt/wt	CC, S, NI	CNT	CNT	CNT	CNT	CNT
18	wt/wt	CH, VH, S, NI	CNT	CNT	CNT	CNT	CNT
19	wt/wt	CH, VH, S, NI	CNT	CNT	CNT	CNT	CNT
20	wt/wt	CC, VH, S, WI	76	84	94	68	CNT
21	wt/wt	CH, WI	84	78	90	74	28
22	wt/wt	E	88	80	92	66	CNT
23	wt/wt	M	88	86	100	84	83
24	wt/wt	CH, V, S	CNT	CNT	CNT	CNT	CNT

PB word, phonetically balanced word; *E*, enlarged vestibular aqueduct; *V*, vestibular enlargement; *S*, semicircular canal dysplasia; *M*, incomplete partition of cochlea (Mondini's dysplasia); *wt*, wild type; *CC*, common cavity; *NI*, narrow internal auditory canal; *CNT*, can not test; *CH*, cochlear hypoplasia; *VH*, vestibular hypoplasia; *WI*, wide internal auditory canal.

表二十八、本研究所選取 SNaPshot multiplex assays 之點位

Panel	Genes / Exons	Nucleotide Change	Codon Change		
1	<i>GJB2</i>	2	c.109G>A*	p.V37I	
		2	c.235delC	frameshift	
		2	c.299_300delAT	frameshift	
	<i>SLC26A4</i>	3' Int 7	c.919-2A>G	splice acceptor	
		5' Int 8	c.1001+5G>C	splice donor	
		10	c.1160C>T	p.A387V	
		10	c.1229C>T	p.T410M	
		13	c.1489G>C	p.G497R	
		<i>Mito. 12S rRNA</i>	-	m.1555A>G	-
	-		m.961delT+C(n)*	-	
	2	<i>GJB2</i>	2	c.124G>A	p.E42K
			2	c.187G>T	p.V63L
			2	c.230G>A	p.W77X
			2	c.427C>T	p.R143W
2			c.508_509insAACG		
2			c.571T>C	p.F191L	
<i>SLC26A4</i>		3	c.230A>T	p.K77I	
		9	c.1115C>T	p.A372V	
		19	c.2162C>T	p.T721M	
		19	c.2168A>G	p.H723R	

* Sequence variants with controversial pathogenicity.

表二十九、SNaPshot 反應與突變檢測之引子(primers)

Panel	Genes	Nucleotide Change	Primer sequence	Strand	Primer extension		Concentration (μ M)
					wt	mut	
1	<i>GJB2</i>	c.109G>A	TTTTTCGCATTATGATCCTC	sense	G	A	0.03
	<i>GJB2</i>	c.235delC	T(6)CCCACATCCGGCTATGGGCC	sense	C	T	0.06
	<i>GJB2</i>	c.299_300delAT	T(9)GCACGTGGCCTACCGGAGAC	sense	A	G	0.03
	<i>SLC26A4</i>	c.919-2A>G	T(13)AATATGTTTTGTTTTATTTC	sense	A	G	0.048
	<i>SLC26A4</i>	c.1001+5G>C	T(37)AATCCATCCCAAGGGGGTGA	sense	G	C	0.012
	<i>SLC26A4</i>	c.1160C>T	T(41)TCTTCCTTAGGAATTCATTG	sense	C	T	0.36
	<i>SLC26A4</i>	c.1229C>T	T(29)CACCCTGCTCTTTCCCGCA	sense	C	T	0.06
	<i>SLC26A4</i>	c.1489G>C	T(25)TCATTCTGGGGCTGGATCTC	sense	G	C	0.048
	<i>Mito. 12S rRNA</i>	m.1555A>G	T(21)TACGCATTTATATAGAGGAG	sense	A	G	0.024
	<i>Mito. 12S rRNA</i>	m.961delT+C(n)	T(33)GAGTGTTTTAGATCACCCCC	sense	T	C	0.012
2	<i>GJB2</i>	c.124G>A	T(6)TCCTCGTTGTGGCTGCAAAG	sense	G	A	0.02
	<i>GJB2</i>	c.187G>T	T(21)TGCAGCCAGGCTGCAAGAAC	sense	G	T	0.12
	<i>GJB2</i>	c.230G>A	T(29)CATCTCCCACATCCGGCTAT	sense	G	A	0.02
	<i>GJB2</i>	c.427C>T	T(37)ACACAAGCAGCATCTTCTTC	sense	C	T	0.02
	<i>GJB2</i>	c.508_509insAACG	T(40)ATGCAGCGGCTGGTGAAGTGC	sense	A	C	0.02
	<i>GJB2</i>	c.571T>C	T(13)GCCCACGGAGAAGACTGTCT	sense	T	C	0.02
	<i>SLC26A4</i>	c.230A>T	CATCTTGGAGTGGCTCCCCA	sense	A	T	0.02
	<i>SLC26A4</i>	c.1115C>T	T(17)ATTTCCATCGCTGTGGTGG	sense	C	T	0.12
	<i>SLC26A4</i>	c.2162C>T	T(9)AAAGGACACATTCTTTTTGA	sense	C	T	0.02
	<i>SLC26A4</i>	c.2168A>G	T(25)CACATTCTTTTTGACGGTCC	sense	A	G	0.02

wt, wild type; mut, mutant.

表三十、經 SNaPshot assay 檢測出基因變異病人之基因型

Genotypes	No. of patients
<i>GJB2</i>	
c.109G>A / c.109G>A	29
c.109G>A / c.235delC	8
c.235delC / c.235delC	4
c.109G>A / wt	47*
c.235delC / wt	2
<i>SLC26A4</i>	
c.919-2A>G / c.919-2A>G	7
c.919-2A>G / c.1115C>T	1
c.919-2A>G / c.2168A>G	5
c.919-2A>G / c.235C>T	1**
c.919-2A>G / wt	14
c.2168A>G / wt	1
<i>Mito. 12S rRNA</i>	
m.1555A>G	14
Total	126

wt, wild type

* Probably not associated with deafness given the high frequency of the *GJB2* c.109G>A allele in Taiwanese.

** c.235C>T (p.R79X) was detected by direct sequencing, not by the SNaPshot assays.

表三十一、案例家族兩次 PGD 療程之結果

	Cycle 1	Cycle 2
Fertilized eggs	19	27
Embryos biopsied	12	12
Amplification failures	4	0
Homozygous normal	1	4
Carrier	6	3
Affected	1	5
Embryos transferred	3	3
Ongoing pregnancy	0	1



表三十二、於體染色體隱性遺傳模式下，*SLC26A4* 基因變異與大前庭導水管之關連性

Class	Number observed
M2: 2 mutated alleles detected	63
M1: 1 mutated allele detected	24
M0: no mutation detected	14
Total	101
Assumption	
W	0.0002
Results	
α_m	0.88
β	0.84
P_{tot}	0.013
Error estimation	
False positive for M1=DFNB4/Pendred syndrome	1.1%
False negative for M0=non-DFNB4/Pendred syndrome	16.6%

W, total prevalence of DFNB4 and Pendred syndrome;
 α_m , proportion of recessive cases due to *SLC26A4* mutations;
 β , proportion of detected mutated alleles among all mutated alleles in *SLC26A4* gene;
 P_{tot} , frequency of the set of all the mutated *SLC26A4* alleles.

表三十三、文獻比較：SLC26A4 基因型與表現型之關連性

Reference	Subjects enrolled	No. (%) of families by No. of <i>SLC26A4</i> mutations			Method of correlation	Main results
		Two	One	Zero		
Pryor et al.	31 families (39 patients) with EVA [ethnicity: mainly Caucasians]	11 (35%)	10 (32%)	10 (32%)	Comparing <i>SLC26A4</i> genotypes across phenotypes	All 11 PS subjects had 2 mutant <i>SLC26A4</i> alleles, whereas all 18 non-syndromic EVA subjects had either 1 or 0 mutant alleles.
Azaiez et al.	458 families (474 patients) with non-syndromic EVA or PS [ethnicity: mainly Caucasians]	66 (14%)	89 (19%)	303 (66%)	Comparing <i>SLC26A4</i> genotypes across phenotypes	The distributions of <i>SLC26A4</i> genotypes were different between PS patients, non-syndromic Mondini patients and non-syndromic EVA patients, with PS patients most likely to have 2 mutations.
Suzuki et al.	39 patients with non-syndromic EVA or PS confirmed as having biallelic <i>SLC26A4</i> mutations [ethnicity: Japanese]	39 (100%)	-	-	Comparing phenotypes across <i>SLC26A4</i> genotypes	No correlation between <i>SLC26A4</i> genotypes and goiter or hearing severity.
This study	101 families with non-syndromic EVA or PS [ethnicity: Han Chinese]	63 (62%)	24 (24%)	14 (14%)	Comparing phenotypes across <i>SLC26A4</i> genotypes	No correlation between <i>SLC26A4</i> genotypes and goiter, inner ear malformation or hearing severity.

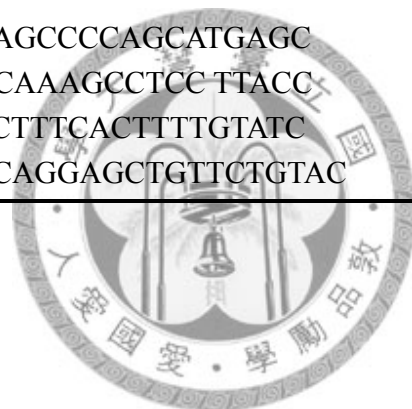
EVA = enlarged vestibular aqueduct; PS = Pendred syndrome.

研究方法附表一、Sequences of the primers for quantitative PCR of the 21 *SLC26A4* exons

Exons	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
Exon1	F-CCCTTCGACCAAGGTGTCTGT R-ACCCTTCCGCTGCCTTTATAG	80
Exon2	F-TCTTCCCCTCCGATCGTCCT R-CCTCCCCAAGGCGTGGAC	292
Exon3	F-AAGAGAGCCTTTGGTGTGCTAAA R-TACTAAGCAGCCATTCCTTGA	85
Exon4	F-CATATGCCCTACTAGCTGCAGTTC R-GATGTTCCAAAGATAAAGTATGTCAGGAT	87
Exon5	F-GGTGAGTTTAATGGTGGGATCTG R-GCTGCTGGATACGAGAAAGTGTT	69
Exon6	F-GTGGCTTGCAGATTGGATTCAT R-TGGAAGGCAGCAGCTGTTG	78
Exon7	F-GCGTGTAGCAGCAGGAAGTA R-CCTTGTTTGTCAACCAAATAATG	250
Exon8	F-GAAAGTTCAGCATTATTTGGTTG R-GGAGTATCAGTGAAATGAAGCTTG	257
Exon9	F-TCACTAGGTTTTTGCCTCCTGAA R-CAGCGATGGAAAATGATGCA	77
Exon10	F-CAGTCTCTTCCTTAGGAATTCATTGC R-GGCCGTGCGGGAAAG	98
Exon11	F-GACACAAGGGAGAAGGACGA R-AGGGAATGGTTTTCCATGTG	236
Exon12	F-AACAATCATCACATGGAAAACC R-TTATTTAGATAAATATAGGC	193
Exon13	F-TTTTCCCTAGGTTATCTGGGTGTTT R-AACTCTCAGGACCACAGTCAACAG	111
Exon14	F-TCCAAAATACGGCTGTTCC R-ATGGAGCTGCTGAAACTTCAGG	187
Exon15	F-CCTTGCTAAGTAGCCAGAAATG R-TTGGACCCAGTAAATACTTGT	254
Exon16	F-CCTTTGAGAAATAGCCTTTCCAG R-GCTCTCATCAGGGAAAGGAA	241
Exon17	F-AAATAATGCTTTTGTGAGCCTGATGA R-CCAATCCACTTGAATCTCTATTTCCCT	87
Exon18	F-TCCTGAGCAAGTAACTGAATGC R-GAAAGGGCTTACGGGAAAGT	190
Exon19	F-ACGACAACATTAGAAAGGACACATTC R-ACCTTGACCCTCTTGAGATTTCCAC	91
Exon20	F-CAGTGGAGCATCAGGTGGG R-GTTCCCTGACAGTTCTTAATCAG	246
Exon21	F-ACAGGCTATGCGTACACTTGCA R-CATTGAGGAAGTTTTGTCTTGATTCC	83

研究方法附表二、 Sequences of the primers and conditions used for amplification of the *SLC26A4* promoter and *FOXII*

Gene/Region	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>SLC26A4</i> promoter			
Region 1 (c.-2988 to c.-2258)	F-AAGATACACATTTTGTGACC R-AAGAGTAACTTAGCTTGG	731	56
Region 2 (c.-1063 to c.-325)	F-TTGAAGATCTGTTGAAAGC R-TTCTATATTAATAAGTCC	739	53
<i>FOXII</i>			
Exon 1	F-AGCCCAGCCCCAGCATGAGC R-ACACTCAAAGCCTCC TTACC	607	64.5
Exon 2	F-ACCCCCTTTCACTTTTGTATC R-TGGCTCAGGAGCTGTTCTGTAC	608	55



研究方法附表三、Sequences of the primers for PCR of the 11 *TRMU* exons

Exons	Sequence (5'-3')	Annealing Temperature (°C)	Product size (bp)
Exon1	F- ACAGCGCAGAAGAAGAGCAGT R- ACTACACAGGTGGAGGGCGA	58	572
Exon2	F- CTCAGGCACCAAGATGGAAAC R- GAGGCCTCTTGCACTCTTCAG	56	492
Exon3	F- AACAAATGTTTCGATGACTGACG R-TACAGTTGTGACACCATCTCC	53	480
Exon4	F- ATCTCTATGTTTGGGTGC R- ATGTGAATCCCATAACAAGC	50	420
Exon5	F- GAGTGTTGATGTCTGCCTCTGA R- CCTCAGCAAACCTCCTCCATCT	53	453
Exon6,7	F- TCTAAGGCTCTGGCATECGTGT R-GGACGACAGGAACTCTGGTCTAG	56	491
Exon8	F-GATGTGCTCAGGTGCTTGGT R-GACCAGCATACAACCTCAGCCTA	54	495
Exon9,10	F-TTCACATTCCATTCTGC R-ATCCTCTCACAGTTGTCAC	52	840
Exon11	F-TAGTGAAGCCACTGG R-ATCCGACTATGTGTCC	56	750

十、附錄

博士班修業期間所發表之相關論文：

1. Wu CC, Chen YS, Chen PJ, Hsu CJ. Common clinical features of children with enlarged vestibular aqueduct and Mondini dysplasia. *Laryngoscope*. 2005;115:132-7.
2. Wu CC, Chen PJ, Hsu CJ. Specificity of *SLC26A4* gene mutations in the pathogenesis of inner ear malformations. *Audiol Neurotol*. 2005;10:234-42.
3. Wu CC, Yeh TH, Chen PJ, Hsu CJ. Prevalent *SLC26A4* mutations in patients with enlarged vestibular aqueduct and/or Mondini's dysplasia: a unique spectrum of mutations in Taiwan, including a frequent founder mutation. *Laryngoscope*. 2005;115:1060-4.
4. Wu CC, Chiu YH, Chen PJ, Hsu CJ. Prevalence and clinical features of the mitochondrial m.1555A>G mutation in Taiwanese patients with idiopathic sensorineural hearing loss and association of haplogroup F with low penetrance in three families. *Ear Hear*. 2007;28:332-42.
5. Wu CC, Chen PJ, Chiu YH, Lu YC, Wu MC, Hsu CJ. Prospective mutation screening of three common deafness genes in a large Taiwanese cohort with idiopathic bilateral sensorineural hearing impairment reveals a difference in the results between families from hospitals and those from rehabilitation facilities. *Audiol Neurotol*. 2008;13:172-81.
6. Wu CC, Lee YC, Chen PJ, Hsu CJ. Predominance of genetic diagnosis and imaging results as predictors in determining the speech perception performance outcome after cochlear implantation in children. *Arch Ped Ado Med*. 2008; 162:269-76.
7. Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Yeh PL, Su YN, Hwu WL, Hsu CJ. Phenotypic analyses and mutation screening of the *SLC26A4* and *FOXI1* genes in 101 Taiwanese families with bilateral nonsyndromic enlarged vestibular aqueduct (DFNB4) or Pendred syndrome. *Audiol Neurotol*. 2009;15:57-66.
8. Wu CC, Lu YC, Chen PJ, Liu AYZ, Hwu WL, Hsu CJ. Application of SNaPshot[®] multiplex assays for simultaneous multigene mutation screening in patients with idiopathic sensorineural hearing impairment. *Laryngoscope*. 2009; 119:2411-6.
9. Wu CC, Lin SY, Su YN, Fang MY, Chen SU*, Hsu CJ*. Pre-implantation genetic diagnosis (embryo screening) for enlarged vestibular aqueduct due to *SLC26A4* mutation. *Audiol Neurotol*. 2010; in press. (* Dual correspondence)

10. Chiu YS, Wu CC*, Lu YC, Chen PJ, Lee WY, Liu AYZ, Hsu CJ. Mutations of the *OTOF* gene in Taiwanese patients with auditory neuropathy. *Audiol Neurotol.* 2010; in press. (* Equal contribution as first author)

