



Association Study of CACNA1E Gene Polymorphisms and Sudden Sensorineural Hearing Loss

Jun Wan Park^{ID}, Jae Seok Park^{ID}, and Sung Il Nam^{ID}

Department of Otorhinolaryngology, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

돌발성 난청과 CACNA1E 유전자 단일염기다형성의 연관성 연구

박준완 · 박재석 · 남성일

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실

Received May 31, 2023

Revised July 7, 2023

Accepted July 17, 2023

Address for correspondence

Sung Il Nam, MD, PhD
Department of Otorhinolaryngology,
Keimyung University
School of Medicine,
1035 Dalgubeol-daero, Dalseo-gu,
Daegu 42601, Korea
Tel +82-53-258-7905
Fax +82-53-258-4540
E-mail entnamsi@dsmc.or.kr

Background and Objectives The present study aimed to investigate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in calcium voltage-gated channel subunit alpha1E (CACNA1E) are associated with sudden sensorineural hearing loss (SSNHL).

Subjects and Method Eighty-one Korean SSNHL patients and 455 healthy subjects were selected from a single tertiary hospital. Human genomic DNA extracted from the peripheral blood samples and five exon regions of SNPs in CACNA1E were genotyped by direct sequencing.

Results In rs357737760, the A/T genotype was present with significantly higher frequency among the SSNHL patients than the T/T ($p=0.0003$) genotype. In rs34488539, the C/T genotype was present with significantly higher frequency among SSNHL patients than the C/C genotype ($p=0.0003$). In rs4652678, the C/T genotype was present with significantly higher frequency among the SSNHL patients than the T/T genotype (codominant model, $p=0.0079$) (dominant model, $p=0.0027$) (overdominant model, $p=0.0021$). In rs199930, the C/T genotype was present with significantly higher frequency among the SSNHL patients than the C/C genotype (codominant model, $p=0.0081$) (dominant model, $p=0.0028$) (overdominant model, $p=0.0022$). In rs704326, the A/A genotype was present with significantly lower frequency among the SSNHL patients than the G/G genotype (codominant model, $p=0.0003$) (recessive model, $p=0.0001$).

Conclusion We found rs357737760, rs34488539, rs4652678 and rs199930 SNPs of CACNA1E to be highly associated with SSNHL. Only rs704326 SNP of CACNA1E is found with low association with SSNHL. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2024;67(4):206-13

Keywords Genetic disease; Hearing loss, sudden; Polymorphism, genetic; R-type calcium channels.

서론

돌발성 난청은 순음청력검사상 적어도 3개 이상의 연속된 주파수에서 30 dB 이상의 감각신경성 청력손실이 3일 이내에 발생하는 경우를 말한다.¹⁾ 연간 유병률은 10만 명당 5-20명

정도이고 전 연령대에서 발병 가능하나, 50-60대가 가장 많고 성별과 좌우의 빈도 차이는 없다. 대부분의 경우에 청력 손상은 일부 또는 완전하게 회복이 되지만 그렇지 않고 난청이 지속되는 경우도 있다.²⁾ 현재까지 치료로는 경구 스테로이드 요법이 가장 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 그 외에 고실 내 스테로이드 주입술, 혈관확장제, 항응고제 및 성상신경 차단술 등의 여러 가지 치료를 추가적으로 이용할 수 있다.³⁾ 돌발성 난청의 대표적 원인으로 바이러스 감염, 혈관 폐

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

색, 와우막 파열 및 자가 면역 등이 가설로 제시되고 있으나 정확한 원인은 밝혀지지 않았다.

최근 이러한 돌발성 난청의 병인과 발생기전을 알아보기 위해 다양한 방법으로 연구가 보고되고 있으며, 그중 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이 돌발성 난청의 발생 및 임상적 증상과 연관이 있다는 것이 보고되고 있다.⁴⁻¹⁰⁾ 와우의 전기생리학적 기전은 일차적으로 유모세포 다발이 기울어짐에 따라 mechano-transduction channel이 개방되고 이를 통해 potassium ion이 유모세포에 유입되면서 세포의 탈분극이 일어난다. 이어서 유모세포 내 전압이 올라감에 따라 전압의존성 칼슘채널 voltage-gated calcium channel (VGCC)이 활성화되어 세포 내 칼슘 농도가 증가되고, 증가된 칼슘이온이 신경전달 물질의 분비를 유발하여 구심성 신경의 활성화가 일어난다. VGCC는 쥐의 내이 및 뇌간 내에서 청각인식 및 정보처리에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 전기 생리학적 및 약리학적 특성을 기반으로 VGCC 복합체의 $Ca_v\text{-}\alpha 1$ 아형은 Ca_v 1.1-1.4 L형과 Ca_v 2.1 P형, Ca_v 2.2 N형, Ca_v 2.3 R형 그리고, Ca_v 3.1-3.3 T형으로 분류된다. Platzer 등¹²⁾은 Ca_v 1.3 L형 VGCC를 제거한 마우스 실험에서 난청을 일으키며, 외유모세포 및 내유모세포의 변성을 유발한다고 보고하였다.

이와 같이 청력과 VGCC와의 연관성을 알아보기 위해 많은 연구들이 진행되었다.¹³⁻²¹⁾ 나이와 청각 경로 발현에 관여하는 VGCC 복합체는 주로 Ca_v 1.3 L-형과 Ca_v 2.3 R-형이 관여한다.^{14,15)} 그중 Ca_v 1.3 L-형을 encoding하는 CACNA1D 유전자의 돌연변이에서 전주파수에 걸친 중등도의 난청은 보고되었다. 하지만 Ca_v 2.3 R-형을 encoding하는 CACNA1E 유전자에 관한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 돌발성 난청 환자에서 CACNA1E 유전자의 단일염기 다형성을 조사하여 정상인과의 차이를 비교하고, 유전자형에 따른 청력 소실 정도의 차이가 있는지 조사해 봄으로써, 돌발성 난청과 CACNA1E 유전자의 단일염기 다형성과의 연관성을 알아보고자 한다.

대상 및 방법

연구 대상

2004년 2월부터 2004년 12월까지 본원(3차 의료기관)에 내원한 사람 중에서 돌발성 난청으로 진단받은 환자 81명과 건강검진을 위해 본원(3차 의료기관)을 방문한 정상청력을 가진 정상대조군 455명을 대상으로 연구를 진행하였다. 정상 청력은 1964 International Standards Organization 기준으로 청력역치 25 dB HL 이하로 정의하였다. 연구에 참여한

모든 돌발성 난청 환자를 대상으로 동반 증상과 발생 연령, 회복 유무, 돌발성 난청의 청력 소실 정도, 치료시작시점(time of onset) 등을 조사하였다. 치료시작시점은 본원에 내원한 날로부터 7일을 기준으로 하였으며, 치료를 늦게 시작했거나 오래된 돌발성 난청은 회복률이 낮으므로 치료 시작 시기에 따른 회복률의 차이를 분석하고자 하였다. 500, 1000, 2000과 3000 Hz의 순음청력역치를 4분법으로 계산하였다. 또한 치료 효과를 알아보기 위해 치료를 시작한 후 3개월 뒤에 순음청력검사를 시행하였다.

본원에서는 prednisolone을 하루 40-80 mg (1 mg/kg/day)로 시작하여 1-2주에 걸쳐 감량하였다.

치료효과는 Siegel's criteria에서 no improvement는 poor recovery로 분류하였고, 그 이외는 good recovery로 분류하였다.

본 연구는 생명윤리 및 안전에 관한 법률 시행 전에 수집된 유전정보로서 동의서가 IRB에서 면제받았다.

전혈에서의 deoxyribo nucleic acid (DNA) 추출

대상자의 혈액을 ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) 시험관에 채혈을 하였다. Human genomic DNA 추출은 전혈 1 mL를 NucleoSpin 96 Blood (Macherey-Nagel, Düren, Germany)를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 정량한 후 -20°C에 보관하였다.

중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 및 염기서열분석

추출된 DNA를 이용하여 CACNA1E 유전자의 SNP를 분석하였다. SNP 자료의 정도관리 측면에서는 SNP 회수율(SNP call rate)이 95%를 넘고, 대립유전자의 빈도 분포가 Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) 검증(p -value>0.0001)을 통과하며, 소수 대립유전자의 빈도(minor allele frequency)가 1%를 넘는 5개의 SNP를 선별하여 본 연구의 분석에서 사용되었다. SNP의 종류와 각각의 primer는 Table 1에 정리하였다.

PCR은 DNA 25 ng, 10X buffer, dNPT (2.5 mM), primer (10 pmole), taq polymerase (5 U/ μ L)를 넣어 총 반응용액을 25 μ L으로 PCR 자동화기계 Gene-AmpPCR system 9600 (PerkinElmer, Foster City, CA, USA)을 이용하여 denaturation 95°C 5분, 95°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초에 35 cycle의 조건으로 CACNA1E의 단편을 증폭하였다. PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전기영동을 하여 band를 확인하였다. 증폭된 단편의 염기서열을 MacroGen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 직접염기서열분석 통해 단일염기의 다형성을 조사하였다.

Table 1. Each primers of the single nucleotide polymorphisms (SNPs)

SNP	Primer	Sequence
rs35737760	Sense	GCCGTGGGGGGTCCCTCAAGGGGGA
	Antisense	GGAGGGGACCGATCCAGTGCCCTGG
rs34488539	Sense	GGATCCGGAGGGCCTGCCACTACAT
	Antisense	GTGAACCTGCGCTACTTTGAGATGT
rs4652678	Sense	GTTTTAGAGGCAACTATGTAGATCA
	Antisense	GAGAAAAACAAGATGGAGGTGAAGG
rs199930	Sense	CCGCACCATCAGGGCAGAACGAGAA
	Antisense	GAACGCTGCGGCACCGATCTGGCCT
rs704326	Sense	CGTTCITGGAAGTGTCCGTCATCGG
	Antisense	GGGGTCCATACAAGCCAAGTGAAT

위 과정으로부터 CACNA1E 유전자의 rs35737760 위치의 T/A 다형성, rs34488539 위치의 C/T 다형성, rs4652678 위치의 T/C 다형성, rs199930 위치의 C/T 다형성, 그리고 rs704326 위치의 G/A 다형성을 조사하였다.

유전자 분석에서 각 유전자 다형에 해당하는 평균(μ)은 μ (AA), μ (GA), μ (GG)로 가정하는데, μ (AA)와 μ (GA)로 동일하게 가정하는 경우 dominant model, μ (AG)와 μ (GG)를 동일하게 하면 recessive model이며 세가지 평균이 모두 다를 경우 codominant model (혼합형유전모형)이 된다. 본 연구에서도 이와 같은 기준을 적용하였다.

통계 분석

SPSS 20.0과 Snpstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/index.php>)을 이용하였다. 결과는 *p*-value가 0.05 이하를 통계적으로 유의한 차이로 하였다. 유전자형 분포에 따른 임상 결과는 카이 제곱 검정으로 분석하였으며, 유전자형 분포와 대립유전자의 빈도도 카이 제곱 검정과 independent t-test로 분석하였다. 로지스틱 회귀분석은 나이와 성별을 통제 변수로 두고 실행하였다.

대조군의 rs35737760, rs344488539, rs4652678, rs199930, rs704326의 유전자형이 HWE에 있는지 여부를 결정하기 위해 적합도를 테스트하기 위한 카이제곱을 계산하였다. 카이 제곱 값은 HWE에서 편차를 보여주지 않았다.

결 과

임상적 특징

돌발성 난청 환자군과 정상대조군의 남녀의 비율은 돌발성 난청에서 남자가 45.6%, 정상대조군에서 46.1%였으며, 평균연령은 돌발성 난청 환자군이 50.02±4.02세로, 정상대조군 54.9±4.98세로 성별과 연령은 통계적으로 차이가 없었다 (Table 2).

Table 2. Characteristics of subjects (sex and age)

Variables	Control (n=455)	Case (n=81)
Sex		
Male	210 (46.1)	37 (45.6)
Female	245 (53.9)	44 (54.4)
Age (years)	54.9±4.98	50.02±4.02
Time of onset for sudden hearing loss		
Before 7 days		57 (70.3)
After 7 days		24 (29.7)
Tinnitus		
Positive		57 (70.3)
Negative		24 (29.7)
Vertigo		
Positive		6 (7.4)
Negative		75 (92.6)
Recover		
Good recovery		42 (51.9)
Poor recovery		39 (48.1)

Data are presented as n (%) or mean ± standard deviation

CACNA1E 유전자 rs35737760 SNP의 유전자형과 돌발성 난청

CACNA1E 유전자 rs35737760 SNP에서 돌발성 난청 환자군과 정상대조군 간의 유전자형 및 대립유전자의 빈도 분포는 통계적으로 유의한 차이를 보였다(*p*<0.05) (Table 3). CACNA1E 유전자 rs35737760 위치의 유전자형에 따른 교차비(odds ratio)는 4.7 (95% confidence interval [CI]: 2.13-10.38)으로 나타났다(Table 4).

CACNA1E 유전자 rs35737760 SNP의 유전자형에 따른 돌발성 난청 환자군의 청력 소실 정도와는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(*p*>0.05) (Table 5).

CACNA1E 유전자 rs34488539 SNP의 유전자형과 돌발성 난청

CACNA1E 유전자 rs34488539 SNP에서 돌발성 난청 환

Table 3. Genotype frequencies of sudden sensorineural hearing loss (SSNHL) and controls analyzed

	SSNHL group (n=81)	Control group (n=455)	p value*
rs35737760			0.0003
TT	69 (85.2)	438 (96.3)	
TA	12 (14.8)	17 (3.7)	
rs34488539			0.0003
CC	69 (85.2)	438 (96.3)	
CT	12 (14.8)	17 (3.7)	
rs4652678			0.0079
TT	68 (84.0)	430 (94.5)	
CT	13 (16.1)	25 (5.5)	
rs199930		n=453	0.0079
CC	68 (84.0)	427 (94.3)	
CT	13 (16.1)	26 (5.7)	
rs704326		n=454	0.0003
GG	30 (37.0)	127 (28.0)	
GA	46 (56.8)	216 (47.6)	
AA	5 (6.2)	111 (24.4)	

Data are presented as n (%). *logistic regression analyses

Table 4. Odds ratios for sudden sensorineural hearing loss risk by CACNA1E (rs35737760, rs34488539, rs4652678, rs199930)

Model of inheritance	Codominant genetic model		
	T/T	A/T	p value
rs35737760	1	4.70 (2.13–10.38)	0.0003
	C/C	C/T	
rs34488539	1	4.70 (2.13–10.38)	0.0003
	T/T	C/T	
rs4652678	1	3.34 (1.62–6.89)	0.0079
	C/C	C/T	
rs199930	1	3.33 (1.61–6.87)	0.0081

자군과 정상대조군 간의 유전자형 및 대립유전자의 빈도 분포는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$) (Table 3). CACNA1E 유전자 rs34488539 위치의 유전자형에 따른 교차비는 4.7 (95% CI: 2.13–10.38)로 나타났다(Table 4).

CACNA1E 유전자 rs34488539 SNP의 유전자형에 따른 돌발성 난청 환자군의 청력 소실 정도와는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다($p > 0.05$) (Table 6).

CACNA1E 유전자 rs4652678 SNP의 유전자형과 돌발성 난청

CACNA1E 유전자 rs4652678 SNP에서 돌발성 난청 환자군과 정상대조군 간의 유전자형 및 대립유전자의 빈도 분포는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$) (Table 3). CACNA1E 유전자 rs4652678 위치의 유전자형에 따른 교차

Table 5. Related information, distribution of severity classification, and recovery outcome by groups of rs35737760 genotype (sub-group patients, n=81)

rs35737760	Genotype		p value
	Related information	TT (n=69)	
Age of onset, yr			0.569
1–15		6 (8.6)	0 (0.0)
16–59		37 (53.6)	7 (58.3)
≥ 60		26 (37.6)	5 (41.6)
Time of onset			0.3225
Before 7 days		50 (72.4)	7 (58.3)
After 7 days		19 (27.5)	5 (41.6)
Patients with vertigo		6 (8.6)	0 (0.0)
Patients with tinnitus		48 (69.5)	9 (75.0)
Initial measurement			
Severity grade of hearing loss			0.3225
Grade 1: < 40 dB		15 (21.7)	2 (16.6)
Grade 2: 40–59 dB		20 (28.9)	5 (41.6)
Grade 3: 60–89 dB		19 (27.5)	3 (25.0)
Grade 4: ≥ 90 dB		15 (21.7)	2 (16.6)
Good recovery		36 (52.1)	6 (50.0)
Poor recovery		33 (47.8)	6 (50.0)

Data are presented as n (%)

Table 6. Related information, distribution of severity classification, and recovery outcome by groups of rs34488539 genotype (sub-group patients, n=81)

rs34488539	Genotype		p value
	Related information	CC (n=69)	
Age of onset, yr			0.569
1–15		6 (8.7)	0 (0.0)
16–59		37 (53.6)	7 (58.3)
≥ 60		26 (37.7)	5 (41.6)
Time of onset			0.3225
Before 7 days		50 (72.4)	7 (58.3)
After 7 days		19 (27.5)	5 (41.6)
Patients with vertigo		6 (8.6)	0 (0.0)
Patients with tinnitus		48 (69.5)	9 (75.0)
Initial measurement			
Severity grade of hearing loss			0.3225
Grade 1: < 40 dB		15 (21.7)	2 (16.7)
Grade 2: 40–59 dB		20 (29.0)	5 (41.6)
Grade 3: 60–89 dB		19 (27.6)	3 (25.0)
Grade 4: ≥ 90 dB		15 (21.7)	2 (16.7)
Good recovery		36 (52.1)	6 (50.0)
Poor recovery		33 (47.8)	6 (50.0)

Data are presented as n (%)

비는 codominant genetic model에서 T-allele을 기준으로 3.34 (95% CI: 1.62–6.89)로 나타났다(Table 4).

CACNA1E 유전자 rs4652678 SNP의 유전자형에 따른 돌발성 난청 환자군의 청력 소실 정도와는 통계적으로 유의한

차이는 보이지 않았다($p>0.05$) (Table 7).

CACNA1E 유전자 rs199930 SNP의 유전자형과 돌발성 난청

CACNA1E 유전자 rs199930 SNP에서 돌발성 난청 환자군과 정상대조군 간의 유전자형 및 대립유전자의 빈도 분포는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$) (Table 3). CACNA1E 유전자 rs199930 위치의 유전자형에 따른 교차비는 codominant genetic model에서 T-allele을 기준으로 3.33 (95% CI: 1.61-6.87)으로 나타났다(Table 4).

CACNA1E 유전자 rs199930 SNP의 유전자형에 따른 돌발성 난청 환자군의 청력 소실 정도와는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다($p>0.05$) (Table 8).

CACNA1E 유전자 rs704326 SNP의 유전자형과 돌발성 난청

CACNA1E 유전자 rs704326 SNP에서 돌발성 난청 환자군과 정상대조군 간의 유전자형 및 대립유전자의 빈도 분포는 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$) (Table 3). CACNA1E 유전자 rs704326 위치의 유전자형에 따른 교차비는 codominant genetic model에서 T-allele을 기준으로 AG 유전자형은 0.89 (95% CI: 0.53-1.49)로, AA 유전자형은 0.19 (95% CI: 0.07-0.52)로 나타났으며, recessive genetic

model에서는 GG/GA 유전자형에 비해 AA 유전자형의 경우에 교차비는 0.21 (95% CI: 0.08-0.53)로 나타났다. Dominant, overdominant genetic model에서는 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다(Table 9).

CACNA1E 유전자 rs704326 SNP의 유전자형에 따른 돌발성 난청 환자군의 청력 소실 정도와는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다(Table 10).

고찰

인간의 유전체는 약 1000개의 염기서열 당 1개꼴로 단일염기 다형성이 일어나는 것으로 알려져 있으며, 약 300만 개의 단일염기 다형성이 존재하고 있는 것으로 밝혀져 있다. 이로 인해 인간 종 내에서도 다양한 표현형이 나타나게 되며, 많은 질환들의 병인 역시 이것과 무관하지 않은 것으로 알려져 질병의 진단과 치료를 위해 활발한 연구가 진행 중에 있다. 그 가운데 돌발성 난청 또한 그 원인을 찾기 위해 분자생물학적인 접근을 통해 여러 유전자의 단일염기 다형성이 연구되고 있다. Nam 등^{4,5)}은 인체 염증반응과 밀접한 연관을 가진 interleukin (IL)-4 수용체 유전자의 단일염기 다형성과 matrix metalloproteinase-1 유전자의 단일염기 다형성 또한 돌발성 난청의 위험인자로 가능성이 있는 것으로 보고하였다. 이 외에도 methylenetetrahydrofolate reductase,⁶⁾ IL-1 β ,⁷⁾

Table 7. Related information, distribution of severity classification, and recovery outcome by groups of rs4652678 genotype (subgroup patients, n=81)

rs4652678	Genotype		p value
	CC (n=68)	CT (n=13)	
Related information			
Age of onset, yr			0.5232
1-15	6 (8.8)	0 (0.0)	
16-59	36 (52.9)	8 (61.5)	
≥ 60	26 (38.2)	5 (38.4)	
Time of onset			0.101
Before 7 days	50 (73.5)	7 (53.8)	
After 7 days	18 (26.4)	6 (46.1)	
Patients with vertigo	6 (8.8)	0 (0.0)	
Patients with tinnitus	47 (69.1)	10 (76.9)	
Initial measurement			
Severity grade of hearing loss			0.8852
Grade 1: < 40 dB	14 (20.6)	3 (23.1)	
Grade 2: 40-59 dB	20 (29.4)	5 (38.4)	
Grade 3: 60-89 dB	19 (27.9)	3 (23.1)	
Grade 4: ≥ 90 dB	15 (22.1)	2 (15.4)	
Good recovery	35 (51.4)	7 (53.8)	0.8752
Poor recovery	33 (48.5)	6 (46.1)	

Data are presented as n (%)

Table 8. Related information, distribution of severity classification, and recovery outcome by groups of rs199930 genotype (subgroup patients, n=81)

rs199930	Genotype		p value
	CC (n=68)	CT (n=13)	
Related information			
Age of onset, yr			0.5232
1-15	6 (8.8)	0 (0.0)	
16-59	36 (52.9)	8 (61.5)	
≥ 60	26 (38.2)	5 (38.4)	
Time of onset			0.101
Before 7 days	50 (73.5)	7 (53.8)	
After 7 days	18 (26.4)	6 (46.1)	
Patients with vertigo	6 (8.8)	0 (0.0)	
Patients with tinnitus	47 (69.1)	10 (76.9)	
Initial measurement			
Severity grade of hearing loss			0.8852
Grade 1: < 40 dB	14 (20.6)	3 (23.1)	
Grade 2: 40-59 dB	20 (29.4)	5 (38.4)	
Grade 3: 60-89 dB	19 (27.9)	3 (23.1)	
Grade 4: ≥ 90 dB	15 (22.1)	2 (15.4)	
Good recovery	35 (51.4)	7 (53.8)	0.8752
Poor recovery	33 (48.5)	6 (46.1)	

Data are presented as n (%)

Table 9. Odds ratios for sudden sensorineural hearing loss risk by CACNA1E (rs704326)

Model of inheritance	rs704326			p value
	G/G	A/G	A/A	
Codominant genetic model	1	0.89 (0.53–1.49)	0.19 (0.07–0.52)	0.0003
Dominant genetic model	G/G	A/G–A/A		0.11
	1	0.66 (0.04–1.09)		
Recessive genetic model	G/G–A/G	A/A		0.0001
	1	0.21 (0.08–0.53)		
Overdominant genetic model	G/G–A/A	A/G		0.15
	1	1.42 (0.88–2.29)		

Table 10. Related information, distribution of severity classification, and recovery outcome by groups of rs704326 genotype (subgroup patients, n=81)

Related information	rs704326 Genotype		
	GG (n=30)	GA (n=46)	AA (n=5)
Age of onset, yr			
1–15	1 (3.3)	4 (8.7)	1 (20.0)
16–59	19 (63.3)	24 (52.2)	1 (20.0)
≥60	10 (33.3)	18 (39.1)	3 (60.0)
Time of onset			
Before 7 days	19 (63.3)	36 (78.2)	2 (40.0)
After 7 days	11 (36.6)	10 (21.7)	3 (60.0)
Patients with vertigo	3 (10.0)	3 (6.5)	0 (0.0)
Patients with tinnitus	23 (76.6)	30 (65.2)	4 (80.0)
Initial measurement			
Severity grade of hearing loss			
Grade 1: <40 dB	5 (16.6)	10 (21.7)	2 (40.0)
Grade 2: 40–59 dB	12 (40.0)	13 (28.3)	0 (0.0)
Grade 3: 60–89 dB	10 (33.3)	11 (23.9)	1 (20.0)
Grade 4: ≥90 dB	3 (10.0)	12 (26.1)	2 (40.0)
Good recovery	19 (63.3)	22 (47.8)	1 (20.0)
Poor recovery	11 (36.6)	24 (52.1)	4 (80.0)

Data are presented as n (%)

prothrombin G20210A,⁸⁾ aquaporins 4,5 수용체와 estrogen 수용체⁹⁾ 및 endothelin-1¹⁰⁾의 단일염기 다형성도 돌발성 난청과 관련성이 있는 것으로 발표되었다.

칼슘채널과 청력과의 연관성은 여러 연구를 통해 보고된 바 있다. Sin 등¹³⁾은 nimodipine (calcium channel blocker)이 청신경초종수술시 와우신경과 안면신경 보존에 이점이 있었고, 메니에르씨병과 말초성 어지럼증에서 증상의 조절에 이점이 있음을 보고하였다.

내이와 청각 경로 발현에 관여하는 VGCC 복합체는 주로 Ca_v1.3 L-형과 Ca_v2.3 R-형이 관여한다.^{14,15)} Garza-Lopez 등¹⁶⁾은 voltage gated calcium channel의 또다른 subunit을 coding하는 CACNA1D의 돌연변이에 대한 연구에서, 전주

파수에 걸친 moderate hearing loss (40–50 dB SPL) 뿐만 아니라 지적 장애, 발달 지연 등이 발생하였음을 보고하였다. Huang과 Moser¹⁷⁾는 rat을 대상으로 irasidipine (CCB), BayK (CCA) 두 가지를 통해 내유모세포 시냅스전 칼슘이온 유입을 조절하였고, 칼슘이온의 유입이 감소하였을 때 spontaneous excitatory postsynaptic currents가 감소하는 것을 확인하였다. Coate 등¹⁸⁾은 adult mouse를 대상으로 한 연구에서, proteoglycan Brevian이라는 물질이 presynaptic voltage gated calcium channel을 통해 음파를 전기적 신호로 변경하는 glutamate 방출을 조절하는 것을 밝혔다. Zamponi 등¹⁹⁾에 따르면 Ca_v1.3이 없는 사람에서는 bradycardia나 부정맥, 난청 등이 보고되었다. Uemaetomari 등²⁰⁾은 동물 실험에서 L-type VGCC blocker (diltiazem, verapamil, nicardipine, nimodipine)를 사용한 군이 음향손상을 덜 받았음을 보고하였다. Lundt 등²¹⁾은 패치-클램프(isolated patch clamp) 연구에서 Ca_v2.3 R-형 VGCC이 달팽이관과 상행 청각경로에 발현되어서 청력생리학적으로 Ca_v2.3 R-형의 잠재적인 기능적 역할이 있다고 제시하였다. 그리고, Ca_v2.3+/+ 대조군, Ca_v2.3+/- 이형접합과 Ca_v2.3 null 돌연변이(Ca_v2.3-/-)를 대상으로 청성뇌간유발반응을 측정하였는데, Ca_v2.3+/- 마우스에서 청력 역치가 증가한 반면 Ca_v2.3-/- 마우스에서는 변화가 관찰되지 않았다.

이와 같이 여러 논문들을 볼 때 칼슘이온과 칼슘채널이 청력에 있어서 중요한 영향력을 가지고 있으며, 내유모세포의 세포내 칼슘이온 농도를 조절하는 VGCC는 청력손실과 관련성이 높을 것으로 여겨진다. 그중 R-type calcium channel 혹은 Ca_v2.3은 VGCC alpha-1 subunit의 pore을 형성하여 칼슘 이온이 세포 내로 들어올 수 있는 구조를 형성하고, 이를 암호화하는 CACNA1E 유전자도 청력과 관련성이 높을 것임을 시사한다.

CACNA1E gene과 관련되어 현재까지 다음과 같은 연구들이 보고되었다. McNaughton 등²²⁾은 chlorpromazine 약물이 voltage dependent calcium channel, human alpha-1e

subunit을 억제하는 바를 확인하였다. Holmquist 등²³⁾은 CACNA1E의 rs679931 TT type mutation이 인슐린 분비를 줄여 type 2 당뇨병의 위험성을 높인다고 보고하였다. Suzuki 등²⁴⁾은 Juvenile myoclonic epilepsy과 관련된 EFHC1의 연구에서, Ca_v2.3의 길항제인 SNX-482를 통해 세포괴사가 억제되는 것을 확인하였고, Nyholt 등²⁵⁾은 CACNA1E와 mi-graine이 통계적으로 유의한 결과가 있음을 밝혔다.

현재까지 제시된 돌발성 난청의 많은 원인들 중, 유모세포와 관련된 기전으로 바이러스 감염으로 인한 유모세포의 손상,^{26,27)} 와우막파열로 인해 발생한 와우내 전위의 변화로 인한 유모세포의 손상²⁸⁾ 등이 있다. Ca_v2.3의 변이 또한 유모세포 자체의 손상, 혹은 칼슘채널의 기능장애로 인한 와우내 전위의 변화로 발생한 유모세포의 손상으로 인한 돌발성 난청의 가능성이 있을 것으로 생각된다. 현재까지 동일 channel에 대한 다른 질환연구에서 candidate protective variant는 아직 확인되지는 않았다.²⁹⁾

본 연구는 CACNA1E와 특정질환과의 연관성을 비교한 앞선 연구들과 비교하여, 처음으로 돌발성 난청의 연관성을 연구한 논문으로서 의미가 있다. CACNA1E에는 본 연구에서 진행한 다섯가지의 단일염기 다형성 외에도 많은 SNPs가 남아 있으므로 추가적인 연구들이 진행되어야 할 것으로 생각되며, 향후 이런 SNPs 연구들이 환자 맞춤형 약품개발 및 질병예방으로 이어질 것으로 여겨진다. 그리고 정확한 기전을 확인하기 위하여 형태학적인 접근과 같은 연구도 추가적으로 필요하겠다.

결론적으로, 각각 rs35737760에서 AT 유전자형이, rs34488539에서는 CT 유전자형이, rs4652678에서는 CT 유전자형이, rs199930에서는 CT 유전자형이 돌발성 난청 환자와 높은 연관성을 가지는 것을 확인하였다($p < 0.05$). rs704326에서는 AA 유전자형이 돌발성 난청 환자와 낮은 연관성을 가지는 것을 확인하였다($p < 0.05$).

이를 통하여 CACNA1E의 다섯 개의 엑손 구역의 단일염기 다형성이 돌발성 난청과 관련이 있는 것으로 생각된다.

Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Dong Hoon Shin for his help with this research.

Author Contribution

Conceptualization: Jun Wan Park, Sung Il Nam. Data curation: Jun Wan Park, Jae Seok Park. Formal analysis: Jun Wan Park, Sung Il Nam. Methodology: Sung Il Nam. Project administration: Sung Il Nam. Resources: Jun Wan Park, Sung Il Nam. Supervision: Sung Il Nam. Validation: Sung Il Nam. Visualization: Jun Wan Park, Jae Seok Park. Writing—original draft: Jun Wan Park, Jae Seok Park. Writing—review & editing: Sung Il Nam.

ORCIDiS

Jun Wan Park <https://orcid.org/0009-0004-5413-4335>
 Jae Seok Park <https://orcid.org/0000-0001-8687-1744>
 Sung Il Nam <https://orcid.org/0000-0002-4871-1755>

REFERENCES

- Haberkamp TJ, Tanyeri HM. Management of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Am J Otol* 1999;20(5):587-92; discussion 593-5.
- Schreiber BE, Agrup C, Haskard DO, Luxon LM. Sudden sensorineural hearing loss. *Lancet* 2010;375(9721):1203-11.
- Kang WS, Kim YH, Park KH, Seo MW, Son EJ, Yoo SY, et al. Treatment strategy for sudden sensorineural hearing loss. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2011;54(10):675-82.
- Nam SI, Ha E, Jung KH, Baik HH, Yoon SH, Park HJ, et al. IL4 receptor polymorphism is associated with increased risk of sudden deafness in Korean population. *Life Sci* 2006;78(6):664-7.
- Nam SI, Yu GI, Kim HJ, Park KO, Chung JH, Ha E, et al. A polymorphism at -1607 2G in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased risk of sudden deafness in Korean population but not at -519A/G in MMP-1. *Laryngoscope* 2011;121(1):171-5.
- Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, Nakashima T. Association of the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 2010;120(4):791-5.
- Um JY, Jang CH, Kim HL, Cho YB, Park J, Lee SJ, et al. Proinflammatory cytokine IL-1 β polymorphisms in sudden sensorineural hearing loss. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013;35(1):52-6.
- Liu B, Feng WJ, Peng XX, Yang J. [A meta-analysis of prothrombin G20210A polymorphism and its risk for sudden sensorineural hearing loss]. *Chinese J Otorhinolaryngol Head Neck Surg* 2013; 48(5):417-21. Chinese
- Nishio N, Teranishi M, Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Shimokata H, et al. Polymorphisms in genes encoding aquaporins 4 and 5 and estrogen receptor α in patients with Ménière's disease and sudden sensorineural hearing loss. *Life Sci* 2013;92(10):541-6.
- Uchida Y, Teranishi M, Nishio N, Sugiura S, Hiramatsu M, Suzuki H, et al. Endothelin-1 gene polymorphism in sudden sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 2013;123(11):E59-65.
- Joiner ML, Lee A. Voltage-gated Ca_v1 channels in disorders of vision and hearing. *Curr Mol Pharmacol* 2015;8(2):143-8.
- Platzter J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, et al. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 2000;102(1):89-97.
- Sin JH, Shafeeq H, Levy ZD. Nimodipine for the treatment of otolaryngic indications. *Am J Health Syst Pharm* 2018;75(18):1369-77.
- Fell B, Eckrich S, Blum K, Eckrich T, Hecker D, Obermair GJ, et al. $\alpha 2\delta 2$ controls the function and trans-synaptic coupling of Ca_v1.3 channels in mouse inner hair cells and is essential for normal hearing. *J Neurosci* 2016;36(43):11024-36.
- Waka N, Knipper M, Engel J. Localization of the calcium channel subunits Cav1.2 (a1C) and Cav2.3 (a1E) in the mouse organ of Corti. *Histol Histopathol* 2003;18(4):1115-23.
- Garza-Lopez E, Lopez JA, Hagen J, Sheffer R, Meiner V, Lee A. Role of a conserved glutamine in the function of voltage-gated Ca²⁺ channels revealed by a mutation in human CACNA1D. *J Biol Chem* 2018;293(37):14444-54.
- Huang CH, Moser T. Ca²⁺ regulates the kinetics of synaptic vesicle fusion at the afferent inner hair cell synapse. *Front Cell Neurosci* 2018;12:364.
- Coate TM, Conant K. Brevican "nets" voltage-gated calcium

- channels at the hair cell ribbon synapse. *BMC Biol* 2018;16(1):105.
- 19) Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 2015;67(4):821-70.
 - 20) Uemaetomari I, Tabuchi K, Nakamagoe M, Tanaka S, Murashita H, Hara A. L-type voltage-gated calcium channel is involved in the pathogenesis of acoustic injury in the cochlea. *Tohoku J Exp Med* 2009;218(1):41-7.
 - 21) Lundt A, Soós J, Seidel R, Henseler C, Müller R, Raj Ginde V, et al. Functional implications of Cav2.3 R-type voltage-gated calcium channels in the murine auditory system - novel vistas from brainstem-evoked response audiometry. *Eur J Neurosci* 2020;51(7):1583-604.
 - 22) McNaughton NC, Green PJ, Randall AD. Inhibition of human α 1E subunit-mediated Ca^{2+} channels by the antipsychotic agent chlorpromazine. *Acta Physiol Scand* 2001;173(4):401-8.
 - 23) Holmkvist J, Tojjar D, Almgren P, Lyssenko V, Lindgren CM, Isomaa B, et al. Polymorphisms in the gene encoding the voltage-dependent Ca^{2+} channel Cav2.3 (CACNA1E) are associated with type 2 diabetes and impaired insulin secretion. *Diabetologia* 2007;50(12):2467-75.
 - 24) Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, et al. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2004;36(8):842-9.
 - 25) Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, Alakurtti K, Anttila V, Färkkilä M, et al. A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet* 2008;17(21):3318-31.
 - 26) Khetarpal U, Nadol JB Jr, Glynn RJ. Idiopathic sudden sensorineural hearing loss and postnatal viral labyrinthitis: A statistical comparison of temporal bone findings. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99(12):969-76.
 - 27) Zadeh MH, Storper IS, Spitzer JB. Diagnosis and treatment of sudden-onset sensorineural hearing loss: A study of 51 patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;128(1):92-8.
 - 28) Schuknecht HF. Pathology of the ear. 2nd ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger;1993. p.181-2.
 - 29) Butler JM, Hall N, Narendran N, Yang YC, Paraoan L. Identification of candidate protective variants for common diseases and evaluation of their protective potential. *BMC Genomics* 2017;18(1):575.