

令和元年5月15日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11177

研究課題名(和文)先天性難聴を誘発する新規分子の特定と予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of congenital deafness caused by a novel molecule to develop prevention and treatment

研究代表者

曽根 三千彦 (Sone, Michihiko)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30273238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性難聴は1/1,000の割合で生まれる最も多い先天性障害である。人工内耳植込術は聴覚獲得の有効な手段であるが、その有効性を高めるにはラセン神経節細胞の保持が必要不可欠である。分子Gは神経成長・遊走因子として、近年、世界的に注目されている分子である。本研究では、先天性難聴の予知・予防・治療の開発に結びつける基礎データを得る目的で、分子Gが先天性難聴を誘発する機構を解析した所、分子Gはマウスの聴力の発達に重要な分子である事が判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在までに、動物でもヒトでも分子Gが難聴に関与することを示した論文はない。本研究により、世界で初めて本分子が聴力に関与していることを個体レベルで証明出来た。現時点では聴神経障害型の先天性難聴に対して人工内耳植込術の有効性を期待する事は難しいが、本研究により分子Gは聴覚系の神経の発達に関与している可能性が示された事から、今後、本分子の活性化により聴神経の障害を防ぐ事が出来れば、人工内耳植込術の有効性の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：Congenital deafness appears at a rate of 1/1000 at birth, which is the most frequent disease among congenital disorders. Cochlear implantation is an efficient therapy, however, the existence of the spiral ganglion cell is fundamentally necessary. Recently, the molecule G attracts the worldwide attention because of its neurotrophic and migration properties. In order to obtain basic data concerning the development of prevision, prevention and treatment for congenital deafness, we analyzed the mechanism in which the molecule G could induce the congenital deafness. The study has demonstrated that the molecule G is essential factor for the development of the auditory function in mice.

研究分野：Otorhinolaryngology

キーワード：ラセン神経節 内耳 難聴 有毛細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は 1/1,000 の割合で生まれる最も多い先天性障害である。先天性難聴の 50%以上は遺伝子異常が原因であると推測されているが、原因遺伝子を特定できない場合も多く、予知・予防・治療には限界がある。先天性難聴における治療法として、人工内耳がある。人工内耳の有効性を高めるには、ラセン神経節機能が残っていることが重要である。分子 G は神経成長・遊走因子として、近年、世界的に注目されているアクチン結合分子である。我々の予備検討において、分子 G 蛋白質が野生型マウスの内耳ラセン神経節細胞で発現している事が分かった。しかしながら、現在までに、現在までに、分子 G と聴覚の関係を示す報告はないばかりか、分子 G が内耳のどの部分に発現しているのかさえ不明である。

2. 研究の目的

本研究は、先天性難聴の予防・治療の開発に結びつける基礎データを得る事を目的に、ラセン神経節に発現する分子 G と聴覚系との関連について分子 G 欠損マウスを用いて解析した。

3. 研究の方法

生後 21 日前後の分子 G 欠損マウスと野生型マウスを対象に、主に聴性脳幹反応 (ABR) により聴覚を測定した。分子 G 抗体を用いた内耳コルチ器の免疫組織染色では、ブアン液で灌流固定した内耳パラフィン切片を用いた。野生型マウスと分子 G 欠損マウスの蝸牛頂・中・基底回転部での分子 G 蛋白質の発現分布を検討し、聴力低下の特徴と分子 G の発現分布の関連を調査した。コルチ器の有毛細胞の観察では、分子 G 欠損マウスと野生型マウスから得られた内耳を tetranitro blue tetrazolium (TNBT) を用いて染色し、内有毛細胞と外有毛細胞の染色像を比較した。

4. 研究成果

(1). 分子 G ホモ欠損マウスの聴覚解析

分子 G 欠損マウスはホモマウスの出生率は極めて低いが、出生すると数週間生存可能であり、生後 21 日前後の聴覚の推移について、同腹の野生型マウスと比較しながら追跡できた。生後 18 日齢と生後 21 日齢の分子 G ホモ欠損マウスと野生型マウスの聴性脳幹反応 (ABR) を測定した。生後 18 日では 4, 12, 20, 32 kHz の ABR 閾値が野生型と比較して 40-50 dB の差を示し、測定した全ての周波数域にわたって重度の先天性難聴の表現型を示した。

(2). 内耳コルチ器における分子 G の免疫組織染色

分子 G 抗体を用いた免疫組織染色を実施した。生後 3 日の野生型マウスのコルチ器の同じ部位では陽性像を示さなかった。生後 16 日の野生型マウスのコルチ器の頂・中・基底回転部のラセン神経節細胞の細胞質で分子 G 蛋白質の強い陽性像が観察されたが、分子 G 欠損マウスの内耳コルチ器の同じ部位では陽性像を示さず、ラセン神経節の細胞数自体も少ない事が分かった。また、内有毛細胞と外有毛細胞においても、染色強度は弱いものの、陽性細胞が観察された。今回の免疫組織染色では未だ例数が十分ではない為、細胞数の定量解析は実施できなかったが、少なくともマウスの聴力発達時期に重要な期間において分子 G の発現が増加する事が示唆された。また、ホモ欠損マウスの先天性難聴は、頂・中・基底回転部のラセン神経節で分子 G 蛋白質が存在しない事が原因の一つだと考えた。今後、分子 G 欠損マウスを用いた形態解析を実施し、ラセン神経節の維持に分子 G が関与しているのか詳細に解析する必要がある。

(3). 分子 G ホモ欠損マウスの有毛細胞の形態解析

生後 18 日齢の分子 G 欠損マウスと野生型マウスの内耳コルチ器の有毛細胞を tetranitro blue tetrazolium (TNBT) を用いて染色した。その結果、頂回転だけでなく中回転付近でも TNBT 陽性の内有毛細胞と外有毛細胞の部分的な欠落が観察された。今回の有毛細胞の TNBT 染色では、技術的な問題により基底回転部の有毛細胞は観察できなかったが、有毛細胞の欠落は分子 G ホモ欠損マウスの重度の先天性難聴の表現型の一因であると考えられる。内耳パラフィン切片を用いた分子 G の有毛細胞の免疫組織染色でも、染色強度は弱いものの野生型マウスの標本において陽性細胞が観察された事から、分子 G が有毛細胞の欠落に関与している可能性があると考えた。

(4). 分子 G ヘテロ欠損マウスの聴覚解析

10 週齢の分子 G ヘテロ欠損マウスの歪成分耳音響放射 (DPOAE) 測定を実施した。野生型マウスと比較して、ヘテロマウスの高音域 (22 kHz と 32 kHz) の DPOAE amplitude は有意に低下した。一方、生後 21 日齢の分子 G 欠損ヘテロマウスの ABR 測定も実施したが、野生型マウスと比較して有意な差は示さなかった。過去の報告でチロシンキナーゼ型の神経成長因子の受容体 c-Ret の重度の機能低下マウス (ホモノックインマウス) は先天性難聴を、軽度低下マウス (ヘテロノックインマウス) は加齢性難聴の表現型を呈する事が示されている。分子 G 欠損マウスもホモマウスとヘテロマウスで同様の表現型を呈する可能性がある。今後は、分子 G 欠損ヘテ

ロマウスの例数を増やし、ABR と DPOAE を経時的に測定すると共に、内耳のコルチ器の形態解析を実施し、本仮説の検証を進める予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

以下すべて査読あり

1. Xu H, Ohgami N, He T, Hashimoto K, Tazaki A, Ohgami K, Takeda K, Kato M. Improvement of balance in young adults by a sound component at 100 Hz in music. *Sci Rep*. 2018 Nov 15;8(1):16894. doi: 10.1038/s41598-018-35244-3.
2. Omata Y, Yoshinaga M, Yajima I, Ohgami N, Hashimoto K, Higashimura K, Tazaki A, Kato M. A disadvantageous effect of adsorption of barium by melanin on transforming activity. *Chemosphere*. 2018 Nov;210:384-391. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.022.
3. Ohgami N, Li X, Yajima I, Oshino R, Ohgami K, Kato Y, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Manganese in toenails is associated with hearing loss at high frequencies in humans. *Biomarkers*. 2018 Sep;23(6):533-539. doi: 10.1080/1354750X.2018.1458153. Epub 2018 Apr
4. Li X, Ohgami N, Yajima I, Xu H, Iida M, Oshino R, Ninomiya H, Shen D, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Arsenic level in toenails is associated with hearing loss in humans. *PLoS One*. 2018 Jul 5;13(7):e0198743. doi: 10.1371/journal.pone.0198743. eCollection 2018.
5. Ninomiya H, Ohgami N, Oshino R, Kato M, Ohgami K, Li X, Shen D, Iida M, Yajima I, Angelidis CE, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Kato M. Increased expression level of Hsp70 in the inner ears of mice by exposure to low frequency noise. *Hear Res*. 2018 Jun;363:49-54. doi: 10.1016/j.heares.2018.02.006. Epub 2018 Feb 24.
6. Yajima I, Ahsan N, Akhand AA, Al Hossain MA, Yoshinaga M, Ohgami N, Iida M, Oshino R, Naito M, Wakai K, Kato M. Arsenic levels in cutaneous appendicular organs are correlated with digitally evaluated hyperpigmented skin of the forehead but not the sole in Bangladesh residents. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2018 Jan;28(1):64-68. doi: 10.1038/jes.2016.70.
7. Kumasaka MY, Yajima I, Ohgami N, Ninomiya H, Iida M, Li X, Oshino R, Tanihata H, Yoshinaga M, Kato M. Manganese-Mediated Decrease in Levels of c-RET and Tyrosine Hydroxylase Expression In Vitro. *Neurotox Res*. 2017 Nov;32(4):661-670. doi: 10.1007/s12640-017-9783-0. Epub 2017 Jul 20.
8. Yajima I, Kumasaka MY, Iida M, Oshino R, Tanihata H, Al Hossain A, Ohgami N, Kato M. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model. *Arch Toxicol*. 2017 Nov;91(11):3507-3516. doi: 10.1007/s00204-017-1975-0. Epub 2017 May 3.
9. Li X, Ohgami N, Omata Y, Yajima I, Iida M, Oshino R, Ohnuma S, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Oral exposure to arsenic causes hearing loss in young people aged 12-29 years and in young mice. *Sci Rep*. 2017 Jul 28;7(1):6844. doi: 10.1038/s41598-017-06096-0.
10. Konishi H, Ohgami N, Matsushita A, Kondo Y, Aoyama Y, Kobayashi M, Nagai T, Ugawa S, Yamada K, Kato M, Kiyama H. Exposure to diphtheria toxin during the juvenile period impairs both inner and outer hair cells in C57BL/6 mice. *Neuroscience*. 2017 May 20;351:15-23. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.028. Epub 2017 Mar 24.
11. Ohgami N, Oshino R, Ninomiya H, Li X, Kato M, Yajima I, Kato M. Risk Assessment of Neonatal Exposure to Low Frequency Noise Based on Balance in Mice. *Front Behav Neurosci*. 2017 Feb 22;11:30. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00030. eCollection 2017.
12. Ohgami N, Yajima I, Iida M, Li X, Oshino R, Kumasaka MY, Kato M. Manganese-mediated acceleration of age-related hearing loss in mice. *Sci Rep*. 2016 Nov 8;6:36306. doi: 10.1038/srep36306.

〔学会発表〕(計 1 件)

大神信孝、He Tingchao、Xu Huadong、押野玲奈、李香、加藤昌志、可聴域の騒音ストレスによるラセン神経節への影響、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019 年 2 月、名古屋大学東山キャンパス（名古屋市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：音発生装置

発明者：加藤昌志、大神信孝、曽根三千彦、杉本賢文

権利者：名古屋大学

種類：

番号：2018-104637

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 昌志

ローマ字氏名：KATO, masashi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8 桁）：10281073

研究分担者氏名：大神 信孝

ローマ字氏名：OHGAMI, nobutaka

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：講師

研究者番号（8 桁）：80424919

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。