

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20240

研究課題名(和文) MYH9異常症モデルマウスを用いた難聴発症メカニズムの検討

研究課題名(英文) Examination of deafness onset mechanism using MYH9 abnormality model mouse

研究代表者

吉田 忠雄 (YOSHIDA, TADAO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90567017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：R702C-Atoth1マウスにおいてABRの結果からは難聴を生じる個体とそうでない個体が存在することが明らかになった。全ての周波数領域で70dB以上を示した難聴マウスは46頭中3頭であった。ネガティブコントロールを作成し、遺伝子の発現部位を野生型、R702C-Atoth1マウスで難聴を発現した個体3例について内耳でのNMMHC-IIAの発現部位を比較した。難聴を発現する個体が非常に少なかったことから生後すぐからの評価を行うことが困難であった。また、光顕上および免疫染色での形態的な変化は見られなかった。今後、さらに微細な構造である感覚毛の形態変化にも着目し検討を重ねる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

R702Cノックインマウスを用いて、非筋ミオシン重鎖IIAを介した難聴の発症機構を解明するという仮説のもと本研究を行った。実際には、ノックインマウスを用いて、致死率が低く、内耳特異的に遺伝子を発現するマウスの作成を試みて、内耳組織の検討を行った。結果として表現型としての難聴を示すマウスが少なかったため、遺伝子が内耳に導入されにくいのか、導入されても表現型としての難聴を示さないのかは鑑別が困難であった。これは内耳の組織が非常に小さく遺伝子が特異的に導入されているか検査を行うことが困難であったからである。今後、内耳への遺伝子導入を確認する手法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：The results of ABR in R702C-Atoth1 mice revealed that some mice caused hearing loss and others did not. Three out of 46 mice showed 70 dB or more in all frequency ranges. Immunostaining was performed using NMMHC-IIA (MYH9). A negative control was prepared. The expression site of the NMMHC-IIA in the inner ear was compared in three individuals in one wild-type gene expression and two expressing the deafness in the R702C-Atoth1 mice. As shown in FIGS. 2 and 3, the expression was almost the same as that of the wild type, and there was no difference between individuals. No morphological changes were observed on light microscopy and immunostaining. Since only a very small amount of the inner ear tissue sample can be obtained, the amount was insufficient to confirm that the MYH R702C gene was contained in the inner ear in a tissue-specific manner. In the future, we will focus on the morphological change of sensory hair, which is a finer structure, and study it repeatedly.

研究分野：耳科学

キーワード：MYH9異常症 R702C ノックインマウス 難聴

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メイ-ヘグリン異常に代表される MYH9 異常症は常染色体優性遺伝の疾患であり、巨大血小板、血小板減少、感音難聴、顆粒球封入体を臨床的特徴とする。Sebastian 症候群、Alport 様症状(腎症、難聴、白内障)を合併する Fechtner 症候群、Epstein 症候群である。しかし 2000 年にメイ-ヘグリン異常の原因遺伝子が Nonmuscle myosin heavy chain IIA (myosin IIA) をコードする MYH9 であることが報告され、その後、Sebastian 症候群、Fechtner 症候群、Epstein 症候群も MYH9 の異常が原因であることが明らかになったため、これらの疾患を包括して MYH9 異常症(MYH9 disorders)と呼ぶことが提唱されている。頭部の変異では Alport 様症状の合併頻度が高いことが知られており、特に R702C の変異症例ではほとんどで学童期より進行性の腎炎と難聴を発症することが特徴であり、臨床上の最大の問題となっている。

研究代表者らのグループは、この疾患の原因は非筋ミオシン重鎖 IIA をコードする MYH9 遺伝子異常であることを報告した(Kunishima et al. Blood 2001)。感音難聴のメカニズムについて現在までに報告はない。R702C 変異症例においては様々な程度の感音難聴が見られるが、画像所見等では異常がなく内耳有毛細胞やラセン神経節細胞、血管条等に原因が考えられる。

以前に作成された R702C 変異を持つノックインマウスは致死率が極めて高く、難聴を評価するのが困難であったため本研究では、新たに遺伝子改変マウスを作成し、難聴の評価、組織学的検討を行い難聴のメカニズムを明らかにする。

MYH9 異常症の病態解明のため、今まで複数グループによりモデルマウスの作製が試みられた。当初はノックアウトマウスによる検討が行われたが、ノックアウトマウスにおいてはヘテロマウスではヒトのような表現型を発現せず、ホモマウスは胎生初期(胎生 7.5 日目)に死亡することが確認された。その後、血小板特異的に MYH9 をノックアウトすることにより、ヒトと同じような巨大血小板減少を呈することが確認された。共同研究者らは R702C ノックインヘテロマウス(R702C+/-マウス)を作製したところ、より強い表現型を発現した。したがって、ヒト MYH9 異常症と同様にマウスにおいても R702C 変異は高度な巨大血小板減少症や腎機能障害を惹起することが確認された。さらに難聴を呈するマウスも確認された。以上の予備検討の結果より、「非筋ミオシン重鎖 IIA が MYH9 遺伝子異常マウスの難聴の発症に関与している」という仮説をたて、R702C ノックインマウスを用いて、非筋ミオシン重鎖 IIA を介した難聴の発症機構を解明し、難聴の予知・予防・治療に結びつけ、ヒトにおいても、非筋ミオシン重鎖 IIA 機能や発現の低下が、難聴の発症に関与しているかどうかを調べる本申請内容を着想した。

2. 研究の目的

マウスの内耳において MYH9 は胎生 10.5 日以降、耳胞上皮、蝸牛管上皮周辺、sensory cell に発現することが知られている。組織特異的に内耳組織に R702C を発現したノックインマウスを作製し、内耳組織における非筋 myosin 重鎖 IIA の分布、全身性に遺伝子発現させたマウスと同様に難聴が発現するかどうか、聴力検査、内耳機能検査、内耳組織検査および電顕標本の作製と評価を行い MYH9 異常症における難聴のメカニズムを解明する。

本研究は、以下の流れで MYH9 遺伝子異常と先天性難聴の関係を解明し、予知・予防・治療の開発に結びつける。

- 1) 野生型マウスを用い、生後 1-21 日の内耳において非筋 myosin 重鎖 IIA の発現部位と活性レベルを経時的に調べる。
- 2) R702C ノックインマウスの生後 20 日以降の聴力を調べる。
- 3) 内耳形態解析により、R702C ノックインマウスの内耳障害部位を特定し、非筋 myosin 重鎖 IIA の聴覚制御機構を調べる。

3. 研究の方法

1. ヒト MYH9 異常症にて最も多く見られる変異遺伝子である R702C を組み込んだ R702C ノックインマウス(MYH9 異常症モデルマウス)を作成する。

2. 聴覚に関する評価(ABR、内耳組織標本)を行い、難聴発症メカニズムの検討を行う。

の 2 段階に分け、研究を遂行していく。

我々が作製した MYH9 異常症モデルマウスを用いて、難聴発症の有無とその機序を明らかにするのが目的である。

MYH9 異常症モデルマウスは胎児死亡が多い上、精子の働きに異常を持つためか、妊娠成立率が非常に悪く、さらに平均寿命が 20-30 週齢と短命であることから、効率的に必要な個体を得るためには自然交配だけでなく、体外受精を併用する方が効率が良い。そのため、今回は Cre/loxP を中心としたコンディショナルノックインマウスの作製を行った。全身性に発現させた R702C ノックインマウスで用いたターゲティングベクターを作製。内耳組織に Cre-リコンビナーゼを発現するマウスと交配した。今回は Atoh1-Cre、transgenic マウス(Matei et al. 2005)を使用した。発現パターンとしては蝸牛および前庭の有毛細胞、支持細胞、ラセン神経節細胞、前庭神経節細胞である。この交配した R702C-Atoh1 マウスを用いて、タイピングを行い MYH9 R702C と Atoh1 Cre が導入されていることを確認したのちに ABR を測定した。表現型として難聴を発現している個体について内耳組織を採取し、組織評価を行った。

4. 研究成果

R702C-Atoth1 マウスにおいて ABR の結果からは難聴を生じる個体とそうでない個体が存在することが明らかになった。ABR は 8、12、16、20KHz の周波数で測定を行った。(図 1) 全ての周波数領域で 70dB 以上を示した難聴マウスは 46 頭中 3 頭であった。免疫染色は NMMHC-11A(MYH9) を用いて行った。ネガティブコントロール(図 2)を作成し、遺伝子の発現部位を野生型、R702C-Atoth1 マウスで難聴を発現した個体 3 例について内耳での NMMHC-11A の発現部位を比較した。図 3 および 4 で示すように発現は野生型とほぼ同様であり、個体間による差も認めなかった。難聴を発現する個体が非常に少なかったことから生後すぐからの評価を行うことが困難であった。また、光顕上および免疫染色での形態的な変化は見られなかった。内耳組織サンプルは極少量しか得ることができないため、内耳に組織特異的に MYH R702C 遺伝子が入っていることを確認するには量が不足していた。今後、さらに微細な構造である感覚毛の形態変化にも着目し検討を重ねる。

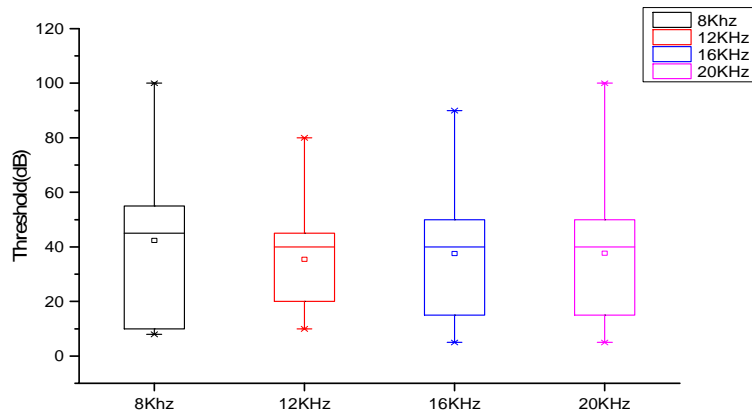


図 1 . R702C-Atoth1 マウスの聴性脳幹反応 (ABR)

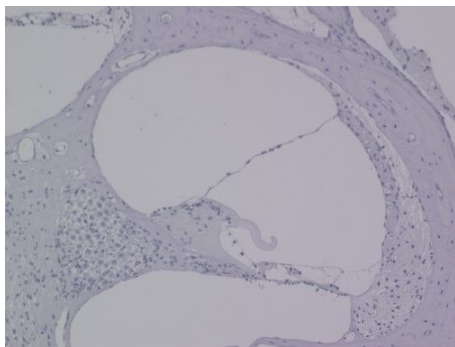


図 2. ネガティブコントロール

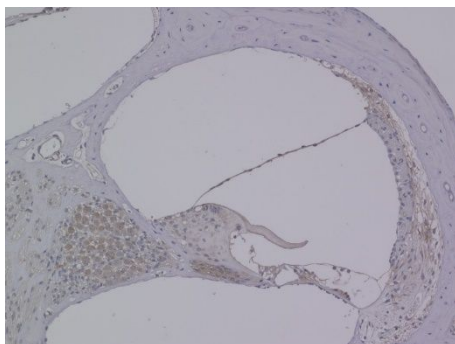


図 3. 野生型：蝸牛外側壁（血管条）、ライスネル膜、有毛細胞および支持細胞、ラセン神経節細胞、蓋膜に分布している。

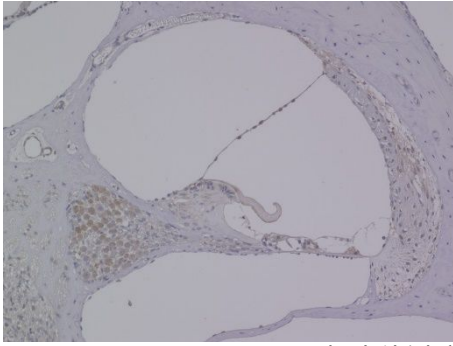


図 4.702C-Atoth1 マウス：蝸牛外側壁（血管条）、ライスネル膜、有毛細胞および支持細胞、ラセン神経節細胞、蓋膜に分布している。野生型と分布はほぼ同様である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兼松 毅, 鈴木 伸明, 鈴木 敦夫, 田村 彰吾, 岡本 修一, 石川 裕一, 勝見 章, 清井 仁, 齋藤 英彦, 國島 伸治, 小嶋 哲人, 松下 正
2. 発表標題 MYH9異常症が赤血球造血にもたらす影響の検討
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----