

平成 22 年 9 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591960

研究課題名（和文） 耳石欠損マウスを用いた *Atp2b2* 遺伝子と加齢性平衡障害の解明研究課題名（英文） Age-related balance disorders in *Atp2b2* mutant mouse with no otoconia

研究代表者

野口 佳裕（NOGUCHI YOSHIHIRO）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50282752

研究成果の概要（和文）：*Atp2b2* 遺伝子は、加齢性難聴に関連すると考えられている。同様なメカニズムは、加齢性平衡障害にも生じる可能性がある。*Atp2b2* 遺伝子変異を有する *Wriggle Mouse Sagami* (*Wri*) の聴覚機能を聴性脳幹反応（ABR）と歪成分耳音響放射（DPOAE）により評価した。*Wri* ホモ接合体は生後 21 日、42 日の各時点において ABR 無反応であった。生後 21 日 *Wri* ヘテロ接合体の 8, 16, and 32 kHz における ABR 検出閾値は、各々  $92 \pm 6.7$ ,  $70 \pm 6.1$ ,  $76 \pm 6.5$  dB であった。ABR 検出閾値は徐々に増加し、生後 49 日までに無反応となった。DP レベルはホモ接合体、ヘテロ接合体ともにノイズレベルまで低下していた。ABR の結果は、*Wri* ヘテロ接合体が加齢性難聴のマウスモデルとなりうる可能性を示唆していた。一方、*Wri* ホモ接合体では、前庭球形嚢の耳石欠損と変性した有毛細胞が認められた。ヘテロ接合体では前庭有毛細胞に進行性変性が認められることを予想したが、生後 2 ヶ月まで形態学的に正常な前庭を有していた。

研究成果の概要（英文）：*Atp2b2* is thought to relate with age-related hearing loss. The same mechanism may occur in age-related balance disorder. Auditory function of *Wriggle Mouse Sagami* (*Wri*) with *Atp2b2* mutation was evaluated by auditory brainstem responses (ABR) and distortion-product otoacoustic emissions (DPOAE). Homozygous *Wri* had no detectable ABR at the age of 21 and 42 days. Mean ABR thresholds at 8, 16, and 32 kHz in P21 Heterozygous *Wri* showed  $92 \pm 6.7$ ,  $70 \pm 6.1$ , and  $76 \pm 6.5$  dB, respectively. ABR thresholds steadily increased to reach undetectable levels by the age of 49 days. Distortion-product levels decreased to the noise levels in both homozygous and heterozygous *Wri*. The results of ABR suggested that heterozygous *Wri* was a mouse model of age-related hearing loss. Meanwhile, homozygous *Wri* had no otoconia and degenerated hair cells in saccule. Although heterozygous *Wri* was predicted to have progressive degeneration in vestibular hair cells, it had morphologically normal vestibule by the age of 2 months.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：Atp2b2、PMCA2、聴覚障害、平衡障害、マウスモデル

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の分子遺伝学の進歩により、40 以上の非症候群性難聴の原因遺伝子が同定され、分子レベルでの聴覚機能の解明に飛躍的な進歩をもたらしている。一方、末梢性平衡障害のみを引き起こすような“めまい”遺伝子はヒトでは同定されていない。

(2) *Atp2b2* は、形質膜カルシウムポンプの1つである PMCA2 をコードしている。PMCA2 は感覚毛に同在し、カルシウムを細胞外もしくは内リンパ腔へ流出させる重要な働きを担うと考えられている。本研究では、*Atp2b2* 変異マウスである *Wriggle Mouse Sagami* (*Wri*) を実験動物として用いる。*Wri* の聴覚機能については、ホモ接合体とヘテロ接合体が難聴を示すことがわかっている。

(3) 別の *Atp2b2* 欠失マウスにおいて卵形囊と球形囊の耳石欠損が報告されているが、*Atp2b2* の末梢平衡機能における役割は不明のままである。耳石は前庭の暗細胞から産生される otoconin 90 がタンパク質の核となり、周囲に炭酸カルシウムが集積して生成されることが考えられている。PMCA2 が細胞内のカルシウム流出ポンプであることから、*Atp2b2* と耳石生成の関連が想定される。

(4) ヒトでは *ATP2B2* 遺伝子内の多型が *CDH23* 変異による非症候群性難聴 (DFNB12) の程度を修飾することが報告され、*ATP2B2* 自体も加齢性難聴に関与することが示唆されている。本研究により *Atp2b2* の加齢性平衡障害との関与が判明する可能性がある。

### 2. 研究の目的

めまい遺伝子はヒトでは同定されていないため、難聴遺伝子 *Atp2b2* に異常を認め、平衡障害が合併する *Wri* を実験動物として用いる。同様に、遺伝性難聴における平衡機能障害を検討する。本研究の目的は、末梢平衡機能の分子レベルでの解明である。

### 3. 研究の方法

(1) ヘテロ接合体の *Wri* を交雑により交配し、ホモ接合体、ヘテロ接合体、野生型マウスを作成した。聴覚機能は、聴性脳幹反応と歪成分耳音響放射により、生後 21 日以降経時的に評価した。聴性脳幹反応の刺激音は周波数 8、16、32kHz 短音とし、歪成分耳音響放射は  $L1=65\text{dB}$ 、 $L2=55\text{dB}$ 、 $F2/F1=1.2$  とし、 $F2=4\sim 20\text{kHz}$  における DP グラムを作成した。

(2) 末梢平衡器官の形態学的観察は、光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡にて行った。光学顕微鏡での観察では、マウスを深麻酔し、開

胸の後、左心室より 4%パラフォルムアルデヒドを還流し、両側頭骨を摘出した。EDTA による脱灰処理の後、脱水処理、パラフィン包埋し、厚さ  $10\mu\text{m}$  の内耳切片を作成後、前庭、三半規管の形態を観察した。一方、走査型電子顕微鏡での観察では、マウスを深麻酔し、断頭にて安楽死させた。即座に両側頭骨を摘出し、1xPBS 内で側頭骨を解剖し、迷路骨胞のみを採取した。2.5%グルタルアルデヒドで固定後、球形囊、卵形囊を摘出した。摘出器官を臨界点乾燥機で処理し、白金コーティングの後、走査型電子顕微鏡にて各平衡器官の表面構造を観察した。

(3) *ATP2b2* と *Vlgr1* の相互作用の検討  
*ATP2b2* と症候群性遺伝性難聴アッシャー症候群の原因遺伝子である *Vlgr1* との相互作用を検討した。*Wri* ヘテロ接合体と *Vlgr1* ヘテロ接合体を交配し、それぞれの遺伝子変異をヘテロ接合に有するマウスを作成した。*Wri* ヘテロ接合体との ABR 検出閾値を比較した。

(4) ミトコンドリア DNA1555 点変異例を対象とし、ENG、VEMP により平衡機能の評価を行った。また、遠位尿管細管性アシドーシス、変動性難聴、反復性めまい、前庭水管拡大症を示す例の遺伝学的検査を行い、ENG、VEMP による平衡機能の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *Wri* の聴覚機能

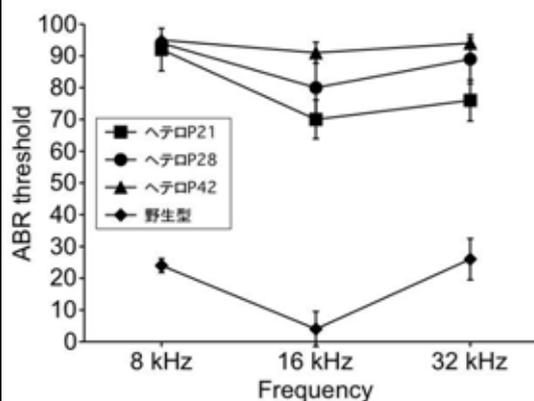


図 ABR検出閾値

ホモ接合体は生後 21 日、42 日の各時点で ABR 無反応であった。一方、野生型は生後 42 日の時点で、8kHz、16kHz、32kHz の平均 ABR 検出閾値は  $24 \pm 2.2\text{dB}$ 、 $4 \pm 5.5\text{dB}$ 、 $26 \pm 6.5\text{dB}$  と正常であった。ヘテロ接合体は、生後 21 日の時点で平均 ABR 検出閾値は 8kHz 短音刺激時に  $92 \pm 6.7\text{dB}$  であったが、16kHz、32kHz 短音刺激時は各々  $70 \pm 6.1\text{dB}$ 、 $76 \pm 6.5\text{dB}$  であ

った。生後 28 日には、16kHz、32kHz 短音刺激時の ABR 検出閾値は各々  $80 \pm 10$  dB、 $89 \pm 7.7$  dB まで上昇した。その後、7 日ごとに経時的変化を測定したが、ABR 検出閾値は徐々に上昇し、生後 49 日の段階で無反応となった。歪成分耳音響放射は、野生型は正常の DP グラムを示した。しかし、ホモ接合体、ヘテロ接合体は、生後 21 日以降すべて DP レベルはノイズレベルまで低下していた。ABR の結果から、*Wri* ヘテロ接合体は進行性難聴を示すことが確認された(図)。

#### (2) *Wri* の平衡器官

ホモ接合体では、球形囊の耳石は欠損し、有毛細胞は高度に変性もしくは脱落していた。一方、ヘテロ接合体では聴覚機能と同様の進行性平衡機能障害を予想したが、生後 2 ヶ月の時点でも前庭に明らかな形態学的異常は認められなかった。

#### (3) *ATP2b2* と *Vlgr1* の相互作用

*Wri* と *Vlgr1* をそれぞれヘテロに有するマウスの ABR 検出閾値は、*Wri* ヘテロ接合体と比較し有意に悪化することはなかった。従って、*ATP2b2* と *Vlgr1* の相互作用は本研究では明らかにできなかった。

#### (4) ミトコンドリア DNA1555 点変異と平衡障害

ミトコンドリア DNA1555 点変異例はめまいを認めないことが特徴とされてきた。しかし、詳細に病歴を聴取すると 5 例中 4 例が反復性めまいを自覚していた。5 例中 3 例が正常の温度眼振反応を示したが、VEMP は全例で異常を示した。このことから、1555 点変異では球形囊系の異常により前庭機能障害をきたすことが考えられた。

#### (5) 遠位尿細管性アシドーシス例における平衡障害

遺伝学的検査により、*ATP6V1B1* に複合ヘテロ変異を認めた。聴力低下とともに反復性回転性めまい発作を繰り返したが、温度眼振検査、VEMP では高度の平衡機能低下は認められなかった。*ATP6V1B1* の分子機能を考えると、難聴の悪化やめまい発作は内耳内の pH ホメオスタシスの破綻が原因と推測した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 4 件)

(1) Yashima T, Noguchi Y, Kawashima Y, Rai T, Ito T, Kitamura K: Novel ATP6V1B1 mutations in distal renal tubular acidosis and hearing loss. Acta Otolaryngol, 査読有、in press.

(2) Ito T, Noguchi Y, Yashima T, Ohno K, Kitamura K: Hereditary Hearing Loss and Deafness Genes in Japan. J Med Dent Sci,

57, 査読有、1-10, 2010.

(3) Kawashima Y, Noguchi Y, Ito T, Kitamura K: Vestibular evoked myogenic potentials in patients with the mitochondrial A1555G Mutation. Laryngoscope 119, 1874-1879, 査読有、2009.

(4) Yagi H, Noguchi Y, Kitamura K, Sato M: Deficiency of *Vlgr1* resulted in deafness and susceptibility to audiogenic seizures while the degree of hearing impairment was not correlated with seizure severity in C57BL/6- and 129-backcrossed lines of *Vlgr1* knockout mice, Neurosci Lett 461, 査読有、190-195, 2009.

#### [学会発表](計 3 件)

(1) 野口佳裕、伊藤 卓、喜多村 健: 前庭水管拡大症を伴う SIX1 変異による Branchio-oto 症候群の聴平衡覚検査所見. 第 68 回めまい平衡医学会総会、2009 年 11 月 26 日、徳島

(2) 野口佳裕、大野十央、高橋正時、Andrew J. Griffith、喜多村 健: 進行性難聴モデルマウスにおける経時的歪成分耳音響放射. 第 4 回 ERA・OAE 研究会、2009 年 7 月 5 日、東京

(3) 野口佳裕、川島慶之、伊藤 卓、喜多村 健: 平衡障害を示したミトコンドリア DNA1555 点変異の 1 例. 第 67 回めまい平衡医学会総会、2008 年 10 月 30 日、秋田

#### [図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野口 佳裕 (NOGUCHI YOSHIHIRO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50282752

(2)研究分担者

伊藤 卓 (ITO TAKU)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40401400

(3)連携研究者

( )

研究者番号：