様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６２０
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2024
課題番号：２１Ｋ０９６１８

研究課題名（和文）調節性T細胞因子Heliosの変異による自己免疫性難聴の発症機構解明

研究課題名（英文）Pathogenesis of hearing impairment through autoimmune reaction by Treg regulatory factor Helios mutations

研究代表者

田中　久美子（Tanaka, Kuiko）

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：４０８３６２４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の結果は当該主仮説であった「Helios変異に起因するTreg機能障害が内耳自己免疫反応を引き起こし、難聴を発症させる」という因果関係を、現時点において支持しない。しかしながら、Helios変異体の難聴は自己免疫機序に基づくものでは全くないと結論づけられる程証拠が得られているとも言えない。そのためには、血清学的実験による自己抗体の検出やCyclosporin以外の免疫抑制剤の効果、等の解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、「Helios変異に起因するTreg機能障害が内耳自己免疫反応を引き起こし、難聴を発症させる」という仮説を現時点では支持しない結果を示したが、Helios変異による難聴が自己免疫機序と全く無関係であるとは断定できず、今後は自己抗体の検出や他の免疫抑制剤の効果検証などが必要である。近年のヒトに関する報告では、(Mohajeri A et.al. J Med Genet 2023)、Helios変異による自己免疫性疾患と難聴の両方の病態を示す例が記録されており、本研究における残された課題を解明することは、Helios変異による難聴機構を再定義する上で重要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：The results of this study do not support the main hypothesis that Treg dysfunction caused by the Helios mutation causes an autoimmune response in the inner ear, resulting in the development of hearing loss. However, the evidence is not strong enough to conclude that the hearing loss in Helios mutants is not based on an autoimmune mechanism at all. For this reason, analyses of the detection of autoantibodies by serological experiments and the effects of immunosuppressive agents other than cyclosporin are needed.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：調節性T細胞　自己免疫疾患　遺伝性難聴　Helios　Ikzf2　ENU-mutagenesis

※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、研究者個人に帰属します。

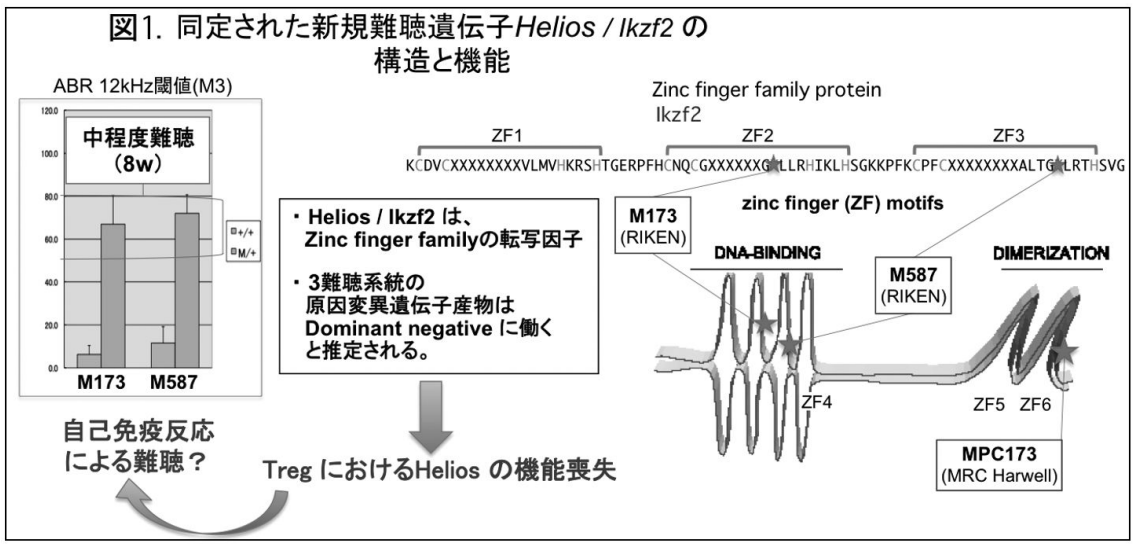
様　式　C－１９、F－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

ヒトおよびマウスの遺伝子は多くの場合複数の機能ドメインを持ち、様々な遺伝子発現調節領域を使い分けることにより、多様な役割を果たす。順遺伝学的手法によるマウス ENU 変異体は、導入される変異の大部分が点突然変異である事、ヒト遺伝病の原因には点突然変異が多く見られること、多様な表現型を持つマウス変異体の１つの遺伝子内に様々な変異アリルを得ることが可能であること、等、疾患モデルとして他の変異体にはない利点を有する。

ヒト聴覚関連遺伝子機能の全貌の解明にも、マウス ENU 変異体は大きく貢献してきた。我々は、理研と順天堂大学との継続的な共同研究により、理研 BRC にリソースとしてストックされているマウス ENU 変異体系統の中に、複数の優性 Helios 変異体が存在することを既に明らかにした(未発表、図 1.)。これらは明瞭な早期発症性の中度難聴を示す点で、英 MRC より発表された Helios 変異体と類似した表現型を示している(PK. Potter et. al. Nat.commun. 2016)。

一方で、Helios の機能障害が、Treg に不完全な調節活性をもたらすことは多く指摘されており、Helios 変異体の難聴が、Tregs の障害による内耳の自己免疫疾患ではないのかという疑問が生じる。Helios は Treg 機能の安定性に重要であり、これら Helios 変異体の、それぞれ異なる missense 変異により、Helios に機能障害を生じ、Treg に不完全な調節活性をもたらす結果として、マウス内耳において自己免疫障害を引起こす可能性が考えられる(仮説１(図 2.)；Hye-Jung Kim et, al. Science,2015)。



２．研究の目的

Helios の機能障害が、Treg に不完全な調節活性をもたらす結果としてマウス内耳の自己免疫障害を引起こすこと(仮説 1) が難聴の原因なのか？という問いに答えるために、本変異体内耳における自己免疫反応の存在を証明することが本研究の目的である。内耳における自己免疫反応による難聴は僅かしか知られていない上、証明は極めて限局された部位の解析を要するため容易とは言えないが、Helios 変異体内耳における自己免疫反応の存在を証明できれば、潜在的ヒト遺伝性難聴の解明のために、重要な可能性を示すことになると考える。

３．研究の方法

⑴ Helios の発現解析；Helios の発現部位は、免疫系(T 細胞系列)、一部の CNS (olfactorybulb, 線条体)、および内耳である。しかしながら Helios の内耳における発現は顕著とは言えず、時間的空間的に限られている可能性がある(Chessum L et, al. Nature,2018)。発現の詳細を確認し機能解析との相関性を調べることにより、難聴の原因である内耳障害が免疫系の作用による可能性があるか否かを検討した。即ちこの聴覚障害の原因は、cell autonomous ではなく non-cell autonomous であるか、言い換えると、内耳内在性過程ではなく、器官外部要因であり、更に、Helios gene の障害は、直接内耳(機能)障害をもたらすのではなく、自己免疫反応による細胞組織障害をきたすことによる可能性があるのか、を調べるために、早期(1 日齢)と成体(10 週齢)における Helios 野生型及び変異体内耳、脾臓と胸腺を採取し、組織免疫化学的方法により解析を行った。

⑵ 内耳の自己免疫反応；この難聴の原因が、自己免疫反応である可能性を示唆する形態的兆候を観察した。即ち、Helios 変異体内耳において、

① 少数のリンパ系細胞の螺旋神経節軸索部分への浸潤の有無
② 螺旋神経節から中枢への軸索部にカルシウム沈着の有無
③ 螺旋神経節周辺の浮腫の有無

である。

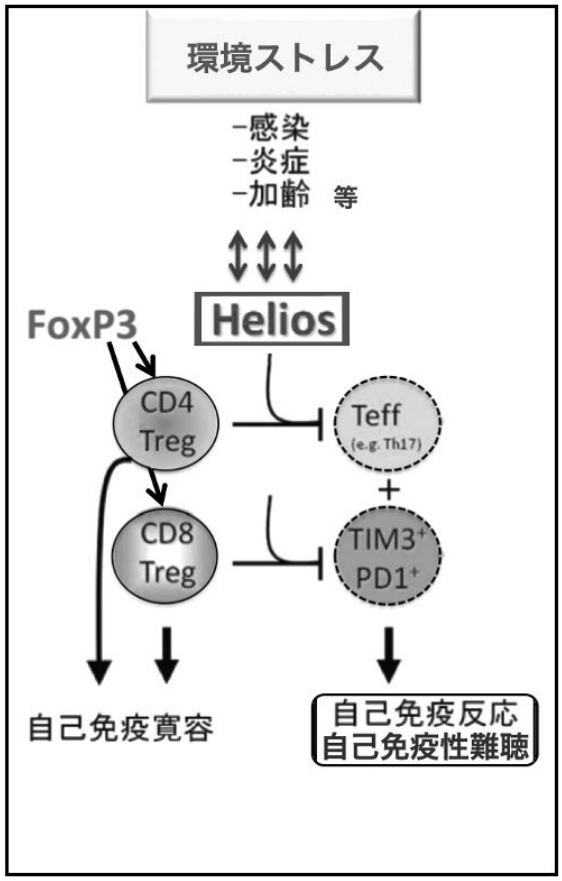


図2. Helios はTreg 細胞の抑制機能を制御する。

⑶ 免疫抑制剤の効果

代表的な免疫抑制剤である Cyclosporin を若齢(1 週齢)マウスに投与し、聴覚改善効果の有無を調べた。

４．研究成果

抗体染色および in situ hybridization の結果、1 日齢では Helios の内耳発現は確認されなかったが、成体(10 週齢)では、外有毛細胞に弱い発現が認められ、また、螺旋神経節にも発現細胞が観察された。一方、組織形態学的観察によるカルシウム沈着、浮腫に関しては Helios 変異体と野生型内耳に有意な差異を認めなかった。免疫抑制剤 Cyclosporin 投与による聴力の改善効果は観察されず、ABR 閾値への明確な影響を与えなかった。これらの結果は本研究の主仮説であった「Helios 変異に起因する Treg 機能障害が内耳自己免疫反応を引き起こし、難聴を発症させる」という因果関係を、現時点において支持しない。しかしながら、Helios 変異体の難聴は自己免疫機序に基づくものでは全くないと結論づけられる程証拠が得られているとも言えない。そのためには、以下の様な実験が更に必要である；自己免疫反応の全身性のマーカーとして、血清自己抗体 ; ANA(anti-nuclear Ab),SS/A(Sjögren's syndrome-related antigen/A), SS/B(Sjögren's syndrome-related antigen/B), anti-Thyrogloblin, anti-Insulin の定量、また、Corticosterone, Mycophenolic acid, Anakinra、等 Cyclosporin 以外の免疫抑制剤の効果、等である。

最近の Helios 変異によるヒト疾患の報告(Mohajeri A et.al. J Med Genet 2023: Velde HM et.al. Human Genetics 2024)によれば、自己免疫性疾患と難聴の両方の病態を示す例が記録されており、更に、多数の異なる変異部位によって、その遺伝性は顕性と潜性が存在し、また、発症機構として dominant negative か haploinsufficiency かで、議論が分かれている。本研究における残された課題を解明することは、こうした発症機構解明の努力とともに、Helios 変異による難聴機構を再定義する上で重要と考えられる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Kusunoki Takeshi、Homma Hirotomo、Kidokoro Yoshinobu、Yoshikawa Akihisa、Tanaka Kumiko、Kubo Satoko、Wada Ryo、Ikeda Katsuhisa	４．巻 11
２．論文標題 A Case of Nasopharyngeal Tuberculosis with Cervical Lymph Node Tuberculosis Suspected of Cervical Malignant Disease at the First Examination	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Clinics and Practice	６．最初と最後の頁 43～46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/clinpract11010008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 角田 篤信，芳川 瑛久，田中 久美子
２．発表標題 ミオクローヌスによる鼓膜披動により生じた他覚性耳鳴の1症例
３．学会等名 第84回耳鼻咽喉科臨床学会
４．発表年 2022年

１．発表者名 田中 久美子，角田 篤信
２．発表標題 外耳道腫瘍及び閉塞性角化症を呈した外耳道異物症例
３．学会等名 第31回日本耳科学会
４．発表年 2021年

１．発表者名 田中 久美子，高田 雄介，園田 健二，保科 卓成，松本 文彦
２．発表標題 当科の成人難聴外来での遺伝子検査の現状と遺伝性難聴の人工内耳手術症例
３．学会等名 第69回日本聴覚医学会総会・学術講演会
４．発表年 2024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
研究分担者	美野輪　治 (Minowa Osamu) (00181967)	順天堂大学・医学部・非常勤講師 (32620)	
研究分担者	松岡　周二 (Matsuoka Shuji) (20286743)	順天堂大学・医学部・特任准教授 (32620)	
研究分担者	池田　勝久 (Ikeda Katsuhisa) (70159614)	順天堂大学・医学部・特任教授 (32620)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関