

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09643

研究課題名(和文) 日本産マウスMSM/Ms系統が保有する加齢性難聴発症抑制遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of genes suppressing the onset of age-related hearing loss in the Japanese wild-derived inbred MSM/Ms mice

研究代表者

安田 俊平 (YASUDA, Shumpei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：50534012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々のこれまでの研究から、日本産野生マウスから樹立されたMSM/Msマウスの12番染色体には、セントロメア側約10 Mbに加齢性難聴の発症を抑制する遺伝子座が存在することが示された。本研究では、この領域に最低でも2つの発症抑制遺伝子が存在し、1つは前半の23遺伝子、もう1つは後半13遺伝子の中のどれかであることが明らかとなった。これらの遺伝子は、それぞれカドヘリン23遺伝子と相加的に作用し、発症を抑制していることが示された。Tgマウスの解析から、抑制遺伝子の候補を5遺伝子にまで絞ることができたが、残念ながら遺伝子の同定までには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、MSM/Msマウスが保有する加齢性難聴発症抑制遺伝子を同定し、加齢性難聴の発症抑制メカニズムを解明することを目的とした。これまでの聴覚研究は、疾患の発症責任遺伝子の探索に主眼が置かれており、発症抑制を目的とした研究は報告されていない。しかしながら、未知の発症抑制遺伝子を同定し、加齢性難聴の発症抑制メカニズムを解明することで、効果的な予防薬の探索および開発など発症予防の研究をさらに発展させることができると考えており、今回の研究成果はその足がかりとなるものである。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have shown that a gene locus that suppresses the onset of age-related hearing loss (ARHL) is located on approximately 10 Mb of centromeric region of the chromosome 12 of Japanese wild derived MSM/Ms mice. This study showed that there are at least two genes, suppressing the onset of ARHL, in this region. One of gene is within 23 genes in the first half and the other gene is within 13 genes in the second half. Each of these genes was shown to work additively with the cadherin 23 gene to suppress onset of ARHL. Analysis of the Tg mice narrowed the candidate suppressor genes down to five genes, but unfortunately did not lead to the identification of the genes.

研究分野：遺伝学

キーワード：マウス遺伝学 加齢性難聴

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴は、加齢に伴って発症する聴覚疾患である。研究代表者は、実験用マウスを用いた研究から、日本産野生ハツカネズミから樹立された MSM/Ms (MSM) マウスが非常に強い加齢性難聴発症抵抗性を持つことを示した (Yasuda et al., 2020 Hear Res)。一方、汎用近交系である C57BL/6J (B6) マウスは、加齢性難聴発症責任アレルであるカドヘリン 23 (*Cdh23*) の *ahl* アレル (*Cdh23^{ahl}*) を保有しており、早期に加齢性難聴を発症することが報告されている (Noben-Trauth et al., 2003 Nat Genet)。研究代表者は、B6 マウスおよび MSM マウスのゲノムリソースを用いたフォワードジェネティクスにより、発症抑制遺伝子が MSM マウスの 12 番染色体セントロメア側約 10 Mb の領域に位置することを明らかにし、*ahl10* 遺伝子座と命名した。さらに研究代表者は、B6 マウスの 12 番染色体セントロメア側約 10 Mb を MSM マウス由来の相同染色体に置換したコンジェニックマウス (B6.MSM-*ahl10*) を新規に樹立し、その聴力を評価した結果、コンジェニックマウスの高音域 (32 kHz) での加齢性難聴発症が遅延することを明らかにした。この結果から、MSM マウスが保有する加齢性難聴発症抑制遺伝子のうちの 1 つ以上が 12 番染色体のセントロメア側約 10 Mb に位置することが示された。

2. 研究の目的

本研究は、MSM マウスが保有する加齢性難聴発症抑制遺伝子座をより詳細に同定し、その効果を検証することを目的とした。また、樹立したコンジェニックマウスは、*Cdh23^{ahl}* を保有しているため、*ahl10* の加齢性難聴発症抑制効果がゲノム編集により野生型に修正した *Cdh23⁺* アレルと相互作用するかどうかについても検証した。

3. 研究の方法

(1) *ahl10* 領域の詳細マッピング

ahl10 遺伝子座の詳細なマッピングは、B6-MSM 間の SNP を利用して High Resolution Melting 法により実施した。

(2) *ahl10* 遺伝子座に位置する遺伝子の特性

B6、MSM マウス間で認められるアミノ酸置換の有害性は、SIFT (Kumar et al., 2009 Nat Protoc) PROVEAN (Choi et al., 2012 PLoS ONE) および PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010 Nat Methods) により検証した。また、B6、MSM、およびコンジェニックマウスの各遺伝子の相対発現量は、qRT-PCR により *Hprt* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) または *Actb* (actin, beta) 遺伝子の発現量をコントロールとして測定した。

(3) 聴力測定

マウスの聴力評価は、左耳について ABR (聴性脳幹反応) 閾値および DPOAE (歪成分耳音響放射) レベルの測定により実施した。

(4) コンジェニックマウスの樹立

これまでに樹立したコンジェニックマウス (B6.MSM-*ahl10*) は、B6 マウスの 12 番染色体のセントロメア側約 10 Mb が MSM マウス由来に置換されている。本研究は、発症抑制効果のある遺伝子座をさらに詳細にマッピングするため、コンジェニックマウスと B6 マウスを交配させ、10 Mb 領域をさらに分割されたコンジェニックマウスを樹立した。また、樹立したコンジェニックマウスは、B6-*Cdh23⁺* マウスと交配させ、*Cdh23^{ahl}* を *Cdh23⁺* に置換したコンジェニックマウスも樹立した。

(5) Tg マウスの樹立

使用する MSM マウスの BAC クローンは、*ahl10* 領域に位置する遺伝子の中から、発現量、アミノ酸置換、および遺伝子ファミリーの聴覚への関与を基に、発症抑制効果があると期待される遺伝子を選抜し、その遺伝子をコードするものを購入した。トランスジェニック (Tg) マウスは、購入した BAC クローンを B6 マウスに導入することにより樹立した。

(6) KO マウスの樹立

Tg マウスの調査により発症抑制効果があると期待された遺伝子を、ゲノム編集によりコンジェニックマウスからノックアウト (KO) した。

4. 研究成果

(1) *ahl10* 遺伝子座の遺伝子発現と変異

B6.MSM-*ahl10* コンジェニックマウスの染色体組換ポイントは、12 番染色体の 10,049,821 ~ 10,132,533 bp (GRCm39) 間に位置することが示され、*ahl10* 遺伝子座には 36 の既知遺伝子が

位置していた。そのうち、21 のタンパク質に B6 マウスと MSM マウスの間でアミノ酸置換が認められ、8 遺伝子でアミノ酸変異が有害であると推定された(Yasuda et al., 2022 Biomedicines)。また、内耳で発現が認められない遺伝子を除いた 30 遺伝子について B6 と MSM マウス各 3 個体について相対発現量を調査したところ、MSM マウスで 9 遺伝子が有意に高発現していた。有意差が認められない遺伝子においても、MSM マウスで発現量が多い傾向を示す遺伝子が多数認められた。さらに、発現差が認められる 17 遺伝子については、B6、MSM、および B6.MSM-*ahl10* コンジェニックマウス各 7 個体を用いて相対発現量を調査したところ、MSM および B6.MSM-*ahl10* コンジェニックマウスで高発現している 4 遺伝子が認められた。

(2) コンジェニックマウスの樹立および聴力

B6.MSM-*ahl10* コンジェニックマウスを基に、新規のコンジェニックマウスの樹立を試みた結果、B6 マウスの *ahl10* 領域の前半部分が MSM マウス由来に置換した B6-MB14 コンジェニックマウスおよび *ahl10* の後半部分が置換した B6-BMB13 コンジェニックマウスを樹立することができた。それぞれコンジェニック領域に 23 遺伝子および 13 遺伝子が含まれており、置換された領域は重複せず、どちらも染色体組換えポイントが 7,812,907~7,813,620 bp (GRCm39) 間に位置することが示された。両コンジェニックマウスは、4 ヶ月齢のオスメス共に 32 kHz 音に対する ABR 閾値が B6 マウスより有意に低く高音域特異的加齢性難聴発症抵抗性を示した。DPOAE レベルはオスではどちらのコンジェニックマウスも B6.MSM-*ahl10* コンジェニックマウスと B6 マウスの中間値を示したが、有意差は認められなかった。一方、メスの DPOAE レベルは、ABR 閾値と同様に B6 と比較して有意に高かった。以上のことから、*ahl10* 遺伝子座には複数の加齢性難聴発症抵抗性遺伝子が存在する可能性が示唆された。両コンジェニックマウスの *Cdh23*⁺マウスは、特に高音域において 24 ヶ月齢まで B6-*Cdh23*⁺マウスより低い ABR 閾値および高い DPOAE レベルを示しており、これらの遺伝子座が *Cdh23* 遺伝子と相加的にかつ長期的に加齢性難聴の発症を抑制していることが示唆された。

(3) Tg マウスの樹立および聴力

MSM マウス由来の BAC クローンは、MSM および B6.MSM-*ahl10* コンジェニックマウスで有意に遺伝子が高発現している遺伝子を含む BAC クローン”A”、ファミリー遺伝子が聴覚に関わっており、アミノ酸置換で有害性が認められる遺伝子を含む BAC クローン”B”、および KO ヘテロマウスが聴覚に異常を示すと報告されている遺伝子を含む BAC クローン”C”をそれぞれ B6 マウスへ導入し、Tg マウスを樹立した。BAC クローン”A”をヘミで持つ個体を交配させ作製した F₂ 個体のオスの聴力を 16 ヶ月齢まで経時的に測定した結果、Tg ヘミマウスは non-Tg マウスよりも 4 ヶ月齢で 32 kHz、8 および 12 ヶ月齢で 16 kHz 音に対する ABR 閾値が有意に低く、また、DPOAE レベルは 4 ヶ月齢の 32 kHz および 12 ヶ月齢の 11.3 kHz で有意に高かった(図 1)。ここから、BAC クローン”A” Tg マウスは加齢性難聴の発症が抑制されており、BAC クローン”A”に

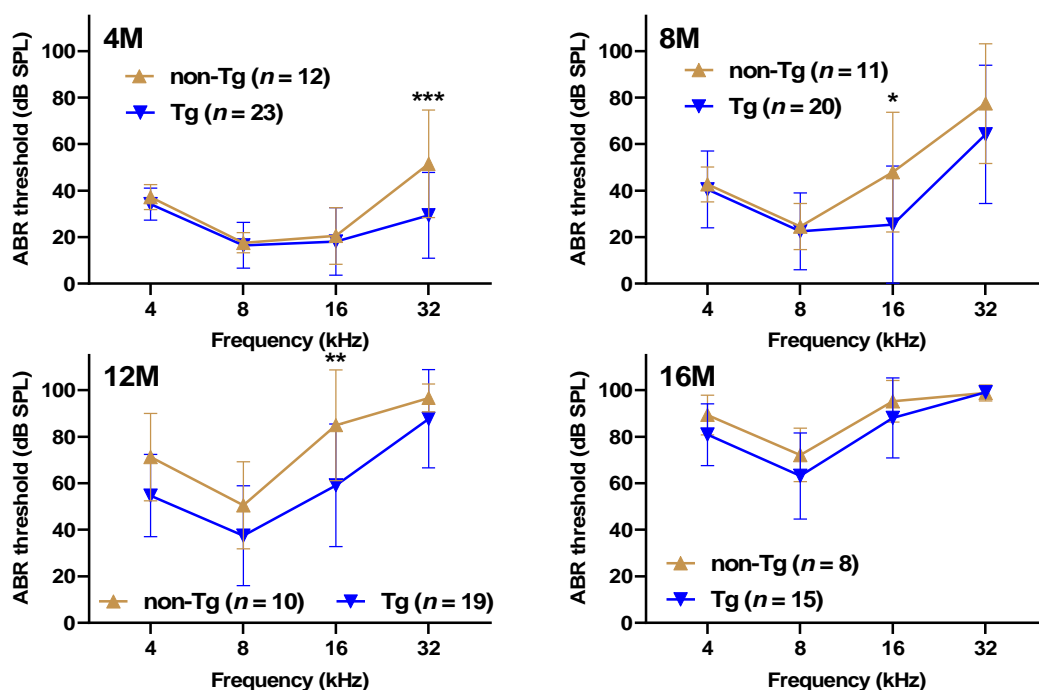


図 1 : BAC クローン”A” Tg マウスの聴力の 4、8、12、および 16 ヶ月齢での ABR 閾値。F₂ 個体のうち、Tg ヘミ個体を”Tg”と表記している。アスタリスクはそれぞれ *: P < 0.05、 **: P < 0.01、 ***: P < 0.001 を、エラーバーは SD を示す。

含まれている5つの遺伝子のいずれかが加齢性難聴発症抑制効果を持つことが示唆された。BAC クローン”B”のF₂個体は、4ヶ月齢で聴力を測定したが、Tgヘミマウスとnon-Tgマウスで有意な差は認められなかった。BAC クローン”C”については、Tgマウスの樹立まで進めることができた。

(4) KOマウスの樹立および聴力

BAC クローン”A”に含まれる5つの遺伝子のうち、3つの遺伝子はMSMおよびB6.MSM-*ahl10*コンジェニックマウスの内耳でB6マウスより有意に高発現している。これらの遺伝子のうち、最もMSMおよびB6.MSM-*ahl10*コンジェニックマウスで高発現している遺伝子をターゲットに、B6-MB14コンジェニックマウスをゲノム編集した。その結果、多数の変異マウスを得ることができ、そこから50番目の塩基にGがインサートされたH17Rfs*23変異をもつKOマウス系統を樹立した。しかしながら、これまでのところKOマウスとB6-MB14コンジェニックマウスの間に聴力の差は認められていない(図2)。

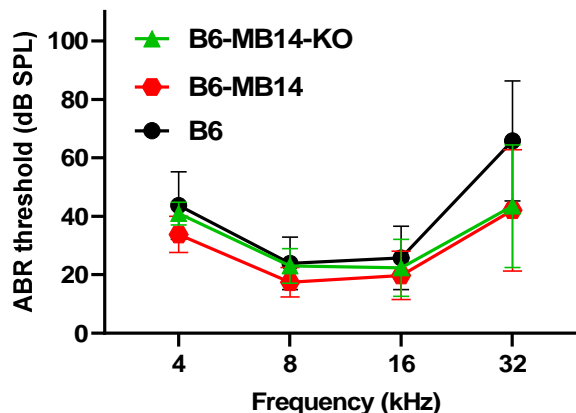


図2 : B6, B6-MB14 コンジェニックおよび B6-MB14-KO マウスの4ヶ月齢でのABR閾値。エラーバーはSDを示す。

引用文献

- Adzhubei et al. (2010) A Method and Server for Predicting Damaging Missense Mutations. *Nat. Methods*, 7, 248–249.
- Choi et al. (2012) Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE*, 7, e46688.
- Kumar et al. (2009) Predicting the Effects of Coding Non-Synonymous Variants on Protein Function Using the SIFT Algorithm. *Nat. Protoc.*, 4, 1073–1081.
- Noben-Trauth et al. (2003) Association of Cadherin 23 with Polygenic Inheritance and Genetic Modification of Sensorineural Hearing Loss. *Nat. Genet.*, 35, 21–23.
- Yasuda et al. (2020) c.753A>G genome editing of a *Cdh23^{ahl}* allele delays age-related hearing loss and degeneration of cochlear hair cells in C57BL/6J mice. *Hear. Res.*, 389, 107926.
- Yasuda et al. (2022) Two Loci Contribute to Age-Related Hearing Loss Resistance in the Japanese Wild-Derived Inbred MSM/Ms Mice. *Biomedicine*, 10, 2221.

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 Shumpei P. Yasuda, Yuki Miyasaka, Xuehan Hou, Yo Obara, Hiroshi Shitara, Yuta Seki, Kunie Matsuoka, Ai Takahashi, Eri Wakai, Hiroshi Hibino, Toyoyuki Takada, Toshihiko Shiroishi, Ryo Kominami and Yoshiaki Kikkawa	4. 巻 10
2. 論文標題 Two Loci Contribute to Age-Related Hearing Loss Resistance in the Japanese Wild-Derived Inbred MSMMs Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10092221	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安田俊平, 関 優太, 侯 雪含, 吉川欣亮
2. 発表標題 MSM/Msマウス由来ah110ゲノム領域の置換はC57BL/6Jマウスの加齢性難聴の発症を長期的に抑制する
3. 学会等名 第33回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田俊平
2. 発表標題 MSM マウスの加齢性難聴抵抗性の遺伝学的解明
3. 学会等名 第33回モロシヌス研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田俊平, 関 優太, 侯 雪含, 高田豊行, 城石俊彦, 吉川欣亮
2. 発表標題 MSM/Msマウスのah110遺伝子座の加齢性難聴発症抑制効果の検証
3. 学会等名 第69回 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田俊平, 宮坂勇輝, 侯 雪含, 小原 央, 設楽浩志, 関 優太, 松岡邦枝, 高橋あい, 若井恵里, 日比野浩, 高田豊行, 城石俊彦, 木南凌, 吉川欣亮
2. 発表標題 ah13およびah110遺伝子座は日本産野生マウス由来MSM系統の加齢性難聴抵抗性に関する
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shumpei P. Yasuda, Yuki Miyasaka, Xuehan Hou, Yo Obara, Hiroshi Shitara, Yuta Seki, Kunie Matsuoka, Ai Takahashi, Eri Wakai, Hiroshi Hibino, Toyoyuki Takada, Toshihiko Shiroishi, Ryo Kominami, and Yoshiaki Kikkawa
2. 発表標題 Two loci, ah13 and ah110, contribute to age-related hearing loss resistance in the Japanese wild-derived inbred MSM/Ms mice
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (IMGC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田俊平, 関 優太, 松岡邦枝, 侯 雪含, 吉川欣亮
2. 発表標題 C57BL/6マウスの高周波音域の加齢性難聴発症を抑制する新規遺伝子座の同定
3. 学会等名 第31回日本耳科学会・学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

難聴プロジェクトホームページ
<https://www.igakuken.or.jp/mammal/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------