

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22500397  
 研究課題名（和文） 加齢進行性内耳障害を誘起する新規遺伝性難聴モデルマウスの開発  
 研究課題名（英文） Development of novel hereditary deafness model mouse showing age-related progressive inner ear defect  
 研究代表者  
 美野輪 治 (MINOWA OSAMU)  
 独立行政法人理化学研究所・疾患モデル評価研究開発チーム・開発研究員  
 研究者番号：00181967

### 研究成果の概要（和文）：

加齢性難聴は老化に伴う感音難聴であり、その機序解明のためには、良い動物モデルが不可欠である。ヒト遺伝性非症候群性難聴(HDFN)と、ヒト加齢性難聴の2つの病態の中には共通の発症機構が存在する可能性があり、HDFNのよいモデルであるENU誘発遺伝性難聴マウスの発症機構を解析する事が、加齢性難聴解明のための重要な知見をもたらす可能性がある。本研究において、ENU誘発マウス系統から、新規の難聴遺伝子を同定し、多面的な解析を実施中である。

### 研究成果の概要（英文）：

Presbycusis is a sensorineural hearing loss associated with age and appropriate mouse model for this disorder is required to clarify the mechanisms. Human nonsyndromic hereditary deafness (HDFN) and presbycusis possibly share the mechanism, which suggests that ENU-induced mouse mutants of deafness that are thought to be good models of HDFN may provide a cue to solve the mechanism. In this study, we have identified novel deafness genes for that we multilaterally approach to investigate its functions.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：老人性難聴、加齢性難聴、非症候群性難聴、ENU、難聴遺伝子、マウス変異体、マウスモデル、聴覚機能

#### 1. 研究開始当初の背景

加齢性・老人性難聴は老化に伴う進行的な感音難聴であり、65歳以上の約10人に一人が補聴器を必要とする中等度以上の難聴を持つと推定されている。我が国では、高齢者人口は著しい増加傾向に有り、医療面のみならず、

経済面からも加齢性・老人性難聴に対する対策が求められている。加齢性・老人性難聴の発症には、遺伝的背景、性差、騒音暴露の既往、高血圧、糖尿病、動脈硬化、食生活等が関与するとされ、その発症機序として、酸化ストレス、DNA損傷の蓄積、ミトコンドリア機

能の低下等、複雑な分子生物学的、生化学的、生理学的変化が考えられている。しかしながらその発症機序には未だ不明な点が多く、多角的な解析が求められている。その全容解明のためには、加齢性・老人性難聴の良い動物モデルが不可欠である。

ENUによるミュータジェネシスは、1) 方法が簡便であること、2) 変異率が高いこと、3) 点突然変異誘発により様々な変異アリルを得ることが可能であること等、他の変異体作製法にはない利点を有する。実験動物であるマウスには、ヒト難聴モデルを含めて多数の突然変異体が知られており、さらには遺伝子ターゲティング(遺伝子 KO)等の、いわゆる「逆遺伝学的手法」が可能なることから、これまでも疾患原因の究明や診断・治療法の開発に利用されてきた。ヒトおよびマウスでのゲノム DNA 配列の完全配列、 transcriptome, proteome の database を駆使できる現在、その有効性は非常に高い。一方、突然変異リソースの遺伝子ターゲティングへの偏りは聴覚遺伝子機能の解明においてもそれを不十分にしてしまう恐れがある。ヒトおよびマウスの遺伝子数は約 3 万だが、多くの遺伝子は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、実に多様な役割を果たしている。したがって、聴覚関連遺伝子機能の全貌の解明にも、1つの遺伝子上の異なった部位に生じた複数の突然変異、しかも点突然変異が必要不可欠であると考えられる。この様に、ENU-mutagenesis は、マウス聴覚関連遺伝子に生じ得る可能な限り多種類突然変異体を作製することが可能な方法であり、これによって、遺伝子ターゲティング法よりも更に優れた難聴モデルマウスを樹立する事が期待できる。

応募者は理研において、ヒト難聴モデルや聴覚関連遺伝子機能解析のモデルとなる突然変異体マウスの検索を大規模に実施し、20 系統以上の難聴マウス変異体を単離した。何れもヒト非症候群性難聴モデルの候補である。ヒト非症候群性難聴(HDFN)を、ヒト加齢性・老人性難聴と比較して同様の病態の存在を示すのは厳密には困難である。HDFN には多数の進行性難聴が含まれるものの、その加齢変化、進行性内耳障害に関する詳細な解析は乏しく、逆に、ヒト加齢性・老人性難聴に関し遺伝的要因がどの程度関わるかについては殆ど解明されていない。しか

しながら、HDFN の既知の原因遺伝子の種類が極めて多様性に富み、かつ未だ多数の原因遺伝子未知家系が存在する事を考慮すると、これら 2つの病態の中に、共通の発症機構が存在する可能性が低くはないのではないかと考えられる。実際、HDFN の加齢変化が報告されている多くの例で、その原因遺伝子の老人性難聴への関与が示唆されている。ヒトでの実験的な解析には限界があるため、HDFN のよいモデルである ENU-mutagenesis による遺伝性難聴マウスの表現型・発症機構を解析する事は、加齢性難聴を理解するための貴重な知見をもたらす可能性があると思われ期待されるのである。

## 2. 研究の目的

ENU-mutagenesis において、応募者は聴覚関連遺伝子機能解析のモデルとなる突然変異体マウスの検索を大規模に実施し、20 系統以上の難聴マウス変異体を単離した。点突然変異による遺伝性難聴マウスは、ヒト非症候群性難聴(HDFN)のよいモデルとなり得るが、この中に聴覚表現型から見て顕著な加齢性聴力低下を示す系統が見いだされた。これら新規難聴系統における加齢性障害の記述と機構解明のため、未知の新規遺伝子変異同定を遂行し、更に組織学的解析等を行い、それにより、加齢性・老人性難聴モデルとしての意義を検討するための基礎的知見を得る事が本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

新規難聴遺伝子を単離し、それによるマウス変異体の加齢性・老人性難聴モデルとしての意義を確立するため、理研マウス ENU-mutagenesis により単離された難聴系統の内の 4 系統に対象を絞り、物理地図作製、表現型連鎖解析によるファインマッピングを行い、原因遺伝子変異の同定を遂行する。これら 4 系統は、未知難聴遺伝子に点突然変異を持つと考えられ、新しい難聴遺伝子の発見に繋がる可能性が高い。更に、同定された新規難聴系統の内耳における基礎的な組織形態学的、生理学的解析を、加齢性内耳障害に相当する変化の有無を重点に実施し、継時的な内耳障害の記述、機構推定を行う事により、加齢性・老人性難聴モデルとしての意義を検討する。

## 4. 研究成果

本研究において、新規の ENU 誘発マウス難

聴系統の遺伝的連鎖解析、配列決定による原因遺伝子の同定を進め、2 系統において、新規の難聴遺伝子を同定した。これらは、マウスでもヒトでも聴覚における機能が知られていない転写因子を code する遺伝子であった。この変異体の加齢性難聴モデルとしての意義を検討するために、聴覚生理学的機能変化、形態学的異常の解析を推進するとともに、変異遺伝子産物の in silico での3次元構造予測法の適用により、その機能変化予測を実施中である。

#### 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 2 件)

1. Hideaki Toki, Maki Inoue, Hiromi Motegi, Osamu Minowa, Ami Ikeda, Yuko Karashima, Hiroaki Kanda, Noriko Yamamoto, Hideki Kaneda, Ikuo Miura, Tomohiro Suzuki, Shigeharu Wakana, Hiroshi Masuya, Yoichi Gondo, Toshihiko Shiroishi, Tetsu Akiyama, Ryoji Yao, and Tetsuo Noda. "Novel Mouse Model for Gardner Syndrome Generated by a Large-Scale ENU Mutagenesis Program" *Cancer Science* 18 MAY 2013  
DOI:10.1111/cas.12161 (査読有)

2. Nobuhiko Tanaka, Kazunori Waki, Hideki Kaneda, Tomohiro Suzuki, Ikuko Yamada, Tamio Furuse, Kimio Kobayashi, Hiromi Motegi, Hideaki Toki, Maki Inoue, Osamu Minowa, Tetsuo Noda, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Aki Takahashi, Tsuyoshi Koide, Shigeharu Wakana, Hiroshi Masuya  
"SDOP-DB: A comparative standardized-protocol database for mouse phenotypic analyses" *Bioinformatics* Vol. 26 No. 8 1133-1134 2010 (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

1. 杉谷善信、吉田玲子、中井茂康、小川正晴、美野輪治、野田哲生「Brn 因子は異なる機能様式を介して大脳新皮質投射ニューロンの多様性形成の機能する」第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 13 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

2. 田中信彦、茂木浩未、鈴木智広、金田秀貴、三浦郁生、山田郁子、古瀬民生、小林喜美男、土岐 秀明、井上麻紀、美野輪治、

野田哲生、若菜茂晴、榎屋啓志「網羅的マウス表現型解析データを用いたデータマイニング：ワークフローの検討」第 35 回日本分子生物学会年会 2012. 12. 14 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

3. 神谷和作、美野輪治、池田勝久「遺伝子改変難聴モデル動物による内耳細胞治療法の開発」第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会 2012. 10. 5 名古屋国際会議場

4. 飯塚崇、神谷和作、城所淑信、岡田弘子、美野輪治、池田勝久「遺伝性難聴モデルマウスへの遺伝子導入による聴力獲得」第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会 2012. 10. 4 名古屋国際会議場

5. 田中信彦、茂木浩未、鈴木智広、金田秀貴、三浦郁生、山田郁子、古瀬民生、小林喜美男、土岐秀明、井上麻紀、美野輪治、野田哲生、若菜茂晴、榎屋啓志「大規模マウス表現型データの統合的解析手法の開発」第 26 回モロシヌス研究会 2012. 6. 15 東京大学

6. 田中信彦、茂木浩未、鈴木智広、金田秀貴、三浦郁生、山田郁子、古瀬民生、小林喜美男、土岐秀明、井上麻紀、美野輪治、野田哲生、若菜茂晴、榎屋啓志「マウス表現型の類似度解析ツールの開発：ワークフローの検討」日本実験動物科学・技術 九州 2012. 5. 26 別府国際コンベンションセンター

7. 若菜茂晴、鈴木智広、小林喜美男、金田秀貴、三浦郁生、古瀬民生、山田郁子、井上麻紀、茂木浩未、土岐秀明、美野輪治、野田哲生、榎屋啓志、小幡裕一「理研 BRC IMPC (国際マウス表現型解析コンソーシアム) 参画計画 2 -IMPC 標準表現型解析プラットフォーム-」日本実験動物科学・技術 九州 2012. 5. 26 別府国際コンベンションセンター

8. 田中信彦、茂木浩未、鈴木智広、山田郁子、古瀬民生、井上麻紀、美野輪治、野田哲生、若菜茂晴、榎屋啓志「国際的なマウス表現型解析プロジェクトのデータの利用価値を高めるための情報システム開発へ向けて」日本分子生物学会第 34 回年会 2011. 12. 14 パンフィコ横浜

9. Shigeharu Wakana, Tomohiro Suzuki, Tamio Furuse, Hideki Kaneda, Kimio Kobayashi, Ikuo Miura, Hiromi Motegi, Hideaki Toki, Maki Inoue, Osamu Minowa,

Tetsuo Noda, Kazunori Waki, Nobuhiko Tanaka, Hiroshi Masuya “The current progress and future plan of JAPAN MOUSE CLINIC in RIKEN BRC” Mouse Genetics 2011. 6. 24 Omni Shoreham Hotel, Washington D. C. USA

10. 金田秀貴、鈴木智広、古瀬民生、山田郁子、小林喜美男、三浦郁生、美野輪治、井上麻紀、茂木浩未、土岐秀明、野田哲生、若菜茂晴 「個体発生期の環境要因の差異による網羅的マウス表現型解析その1 - 出産方法および里親による検討 -」第 58 回日本実験動物学会総会 2011. 5. 25 タワーホール船堀

11. 小林喜美男、鈴木智広、金田秀貴、三浦郁生、古瀬民生、山田郁子、美野輪治、土岐秀明、茂木浩未、井上麻紀、田中信彦、野田哲生、榎屋啓志、若菜茂晴 「理研 BRC 日本マウスクリニックの進捗状況と展開」第 58 回日本実験動物学会総会 2011. 5. 25 タワーホール船堀

12. 鈴木沙理、大芝泰弘、和田健太、美野輪治、若菜茂晴、米川博通、吉川欣亮「遺伝的背景の差異によるマウス近交系の聴力特性の差異」第 58 回日本実験動物学会総会 2011. 5. 25 タワーホール船堀

13. 田中信彦、脇和規、金田秀貴、鈴木智広、山田郁子、古瀬民生、小林喜美男、茂木浩未、土岐秀明、美野輪治、野田哲生、若菜茂晴、榎屋 啓志「SDOP-DB: マウス表現型解析プロトコルの国際的共有及び標準化へ向けたデータベース」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)2010. 12. 10 神戸ポートアイランド

14. 美野輪治、井上麻紀、茂木浩未、土岐秀明、榎屋 啓志、金田秀貴、櫻庭喜行、若菜茂晴、権藤洋一、城石俊彦、野田哲生「カルシウム調節因子に allelic な点突然変異を持つ一連のマウス難聴変異体の解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)2010. 12. 7 神戸ポートアイランド

15. Tomohiro Suzuki, Shizuka Nishimura, Tamio Furuse, Hideki Kaneda, Kimio Kobayashi, Ikuo Miura, Ikuko Yamada, Osamu Minowa, Hideaki Toki, Hiromi Motegi, Maki Inoue, Tetsuo Noda, Hiroshi Masuya,

Shigeharu Wakana “Development of web-based database “Pheno-Pub” for comprehensive phenotyping data in Japan Mouse Clinic” The 4th AFLAS Congress Meeting 2010. 11. 9 Taipei, Taiwan

16. Tomohiro Suzuki, Yasuyo Kozawa, Kimio Kobayashi, Hideki Kaneda, Ikuo Miura, Tamio Furuse, Ikuko Yamada, Osamu Minowa, Hideaki Toki, Hiromi Motegi, Maki Inoue, Tetsuo Noda, Hiroshi Masuya, Shigeharu Wakana “Current progress of comprehensive mouse phenotype in Japan Mouse Clinic” The 4th AFLAS Congress Meeting 2010. 11. 9 Taipei, Taiwan

17. Tomohiro Suzuki, Hideki Kaneda, Kimio Kobayashi, Ikuo Miura, Tamio Furuse, Ikuko Yamada, Osamu Minowa, Hideaki Toki, Hiromi Motegi, Maki Inoue, Tetsuo Noda, Hiroshi Masuya, Shigeharu Wakana ” Current progress of phenotypic analyses in Japan Mouse Clinic” 24th International Mammalian Genome Conference 2010. 10. 20 Crete, Greece

18. Nobuhiko Tanaka, Kazunori Waki, Hideki Kaneda, Tomohiro Suzuki, Ikuko Yamada, Tamio Furuse, Kimio Kobayashi, Hiromi Motegi, Hideaki Toki, Maki Inoue, Osamu Minowa, Tetsuo Noda, Shigeharu Wakana, Hiroshi Masuya “SDOP-DB: A database for international sharing and standardization of mouse phenotyping protocols” 24th International Mammalian Genome Conference 2010. 10. 18 Crete, Greece

19. 鈴木沙理、寒澤英理香、美野輪治、若菜茂晴、米川博通、吉川欣亮「DBA/2J マウスの早発性難聴発症に関与する第 5 番染色体上の複数の感受性遺伝子」日本遺伝学会第 82 回大会 2010. 9. 20 札幌、北海道大学

20. 鈴木沙里、植田卓也、奥村和弘、石川昌志、寒澤英理香、美野輪治、若菜茂晴、米川博通、吉川欣亮「近交系マウス DBA/2J の発生性難聴に関与する Cdh23 と相互作用する修飾遺伝子の固定」第 57 回日本実験動物学会総会 2010. 5. 13 京都テルサ

21. 鈴木智広、小林喜美男、金田秀貴、三浦郁生、古瀬民生、山田郁子、美野輪治、土岐秀明、茂木浩未、井上麻紀、野田哲生、榎

屋啓志、若菜茂晴「理研 BRC 日本マウスクリニク I: 進捗状況と今後の計画について」第 57 回日本実験動物学会総会 2010. 5. 12 京都テルサ

22. 鈴木智広、古瀬民生、西村静佳、金田秀貴、小林喜美男、三浦郁生、山田郁子、美野輪治、土岐秀明、茂木浩未、井上麻紀、野田哲生、榎屋啓志、若菜茂晴「理研 BRC 日本マウスクリニク III: 表現型情報公開 web サイト「Pheno-Pub」の開発」第 57 回日本実験動物学会総会 2010. 5. 12 京都テルサ

23. 田中信彦、脇和規、金田秀貴、鈴木智広、山田郁子、古瀬民生、小林喜美男、茂木浩未、土岐秀明、井上麻紀、美野輪治、野田哲生、高雄啓三、高橋阿貴、宮川剛、小出剛、若菜茂晴、榎屋啓志「マウス表現型解析プロトコルの国際的標準化と共有に向けて」第 57 回日本実験動物学会総会 2010. 5. 12 京都テルサ

〔図書〕(計 1 件)

1. 美野輪治 「マイクロインジェクション法による変異マウスの作製」、新遺伝子工学ハンドブック改訂第 5 版 (実験医学別冊) 284-288. 2010

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美野輪 治 (MINOWA OSAMU)

独立行政法人理化学研究所・疾患モデル評価

研究開発チーム・開発研究員

研究者番号：00181967

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者