

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：33910
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790160
研究課題名(和文) 新規難聴モデルマウスを用いた、環境ストレスに対する内耳の防御機構の解析
研究課題名(英文) Analysis of environmental stress induced deafness
研究代表者 大神 信孝(OHGAMI NOBUTAKA) 中部大学・生命健康科学部・講師 研究者番号：80424919

研究成果の概要(和文)：

加齢性難聴の患者数は2015年には世界中でおおよそ7億人と推計されているが、聴力などを司る神経生理機能の低下に対する抜本的な予防・治療法は、人工内耳等を埋め込む外科的手術以外には、まだ確立されていない。一方、神経成長因子の受容体である c-Ret チロシンキナーゼの重度の活性低下は先天性難聴を発症するが、加齢性難聴との関連は未だ検討されていない。そこで本研究は、c-Ret のリン酸化部位に点変異を導入したヘテロノックインマウス(c-Ret-KI^{Y1062F/+})マウスを用いて、加齢に伴う聴力レベルの推移と内耳の形態変化を解析した。c-Ret-KI^{Y1062F/+}マウスは内耳のラセン神経節が変性し加齢性難聴を発症する事、逆にその機能を増強すると難聴を軽減できる事が分かった。今後はc-RET等の分子を標的とした加齢性難聴の予知・予防法の開発を進めたい。

研究成果の概要(英文)：

About 30% of the 120 million people who suffer from congenital (early-onset) hearing loss are syndromic, and the remaining 70% are non-syndromic worldwide. At present, however, no effective therapies for deafness have been established except for cochlear implantation. We have recently shown that complete impairment of Y1062-phosphorylation in c-Ret causes congenital deafness in homozygous *c-Ret* Y1062F knock-in mice (*c-Ret-KI^{Y1062F/Y1062F}*-mice). On the other hand, there is no information about the relevance between c-Ret and age-related hearing loss. In this study, we used heterozygous *c-Ret* Y1062F knock-in mice (*c-Ret-KI^{Y1062F/+}*-mice) in order to analyze whether partial impairment of Y1062-phosphorylation in c-Ret causes age-related hearing loss. This study suggests that partial impairment of *c-Ret* causes age-related hearing loss involving neurodegeneration of spiral ganglion neurons in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：薬学・環境系薬学

キーワード：環境ストレス、加齢性難聴、内耳、ラセン神経節

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴の患者数は、最近人気を博しているポータブルミュージックプレイヤー等の騒音ストレスにより、今後、以前に増して爆発的に増加する事が予想されており、2015年には世界で7億人に達すると推計されている。

(Editorial, Lancet 2007)。しかしながら、加齢性難聴の抜本的な予防・治療方法は未だ確立されていない。これまで研究代表者は、喫煙・騒音等の環境ストレスが若者の聴力レベルに深刻な影響を与える疫学研究の成果 (Ohgami et al., Toxicol Ind Health 2010)、及びヒト・マウスレベルで神経成長因子の受容体である Ret キナーゼが新規の先天性難聴遺伝子である事、さらに Ret の活性レベルが聴力レベルを制御する事を示してきた (Ohgami et al., PNAS 2010)。一方、先天性難聴と加齢性難聴は異なる病態を示す事が知られているが、一つの難聴遺伝子が先天性と加齢性の両方の難聴を引き起こす例は極めて限られており、Ret 遺伝子と加齢性難聴の関連は全く報告されていない。

2. 研究の目的

新規の聴力制御分子である Ret の分子機能が軽度に低下した (ヘテロ型ノックイン) マウスの加齢性難聴の発症機序について解析する。

3. 研究の方法

c-Ret 分子機能が軽度に低下した遺伝子改変マウスとして、c-Ret のリン酸化部位に点変異を導入したヘテロノックインマウス (c-Ret-KI^{Y1062F/+}) を用いた。聴力レベルは聴性脳幹反応 (ABR) により測定した (Ohgami et al., PNAS 2010)。免疫組織染色、透過電子顕微鏡により内耳の病理解析を行った (Ohgami et al., PNAS 2010)。

4. 研究成果

c-Ret-KI^{Y1062F/+} マウスの聴力レベルの推移を解析した所、生後 1 ヶ月齢時には 4-40 kHz の音域にわたって野生型マウスと同程度のレベルを示したが、その後 4 ヶ月齢、10 ヶ月齢になると、野生型マウスの聴力低下よりも症状の重い、加齢性難聴の表現型を示すことがわかった (Ohgami et al., Neurobiol Aging 2012)。次に、内耳の形態解析を行った結果、野生型マウスと比較して、c-Ret-KI^{Y1062F/+} マウスのラセン神経節の細胞数は生後 1 ヶ月齢では有意差がなかったが、生後 10 ヶ月齢で 6 割程度の減少を示す事が分かった。さらに透

過電子顕微鏡を用いて詳細に解析した所、5 ヶ月齢の c-Ret-KI^{Y1062F/+} マウスのラセン神経節では、野生型のラセン神経節と比較して、核の形態異常、細胞質の縮小、シュワン細胞との隙間の拡大等が観察され、神経変性を伴うことが分かった (Ohgami et al., Neurobiol Aging 2012)。最後に、c-Ret-KI^{Y1062F/+} マウスの加齢性難聴をレスキューする目的で、c-Ret-KI^{Y1062F/+} マウスと RET トランスジェニックマウス (Kato et al., Oncogene 1999) を交配し、c-Ret-KI^{Y1062F/+};RET-Tg マウスを樹立した。その結果、c-Ret-KI^{Y1062F/+};RET-Tg マウスは、c-Ret-KI^{Y1062F/+} の聴力レベルと比較して、有意な回復を示し、ラセン神経節の c-Ret リン酸化レベル、及び、細胞数もレスキューされる事が分かった (Ohgami et al., Neurobiol Aging 2012)。

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 10 件)

以下の雑誌論文は全て査読有り。

- (1) Yajima, I., Kumasaka, M.Y., Thang, N.D., Goto, Y., Takeda, K., Yamanoshita, O., Iida, M., Ohgami, N., Tamura, H., Kawamoto, Y., Kato, M.: RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol. Res. Pract.*, 2012, 354191 (2012)
- (2) Thang, N.D., Yajima, I., Nakagawa, K., Tsuzuki, T., Kumasaka, M.Y., Ohgami, N., Ly, T.B., Iwamoto, T., Watanabe, D., Kato, M.: (2012) A novel hairless mouse model for malignant melanoma. *J. Dermatol. Sci.*, 65, 207-212 (2012)
- (3) Ohgami, N., Tamura, H., Ohgami, K., Iida, M., Yajima, I., Kumasaka, Y.M., Goto, Y., Sone, M., Nakashima, T., Kato, M.: c-Ret-mediated hearing losses. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 5, 23-28 (2012)
- (4) Ohgami, N., Ida-Eto, M., Sakashita, N., Sone, M., Nakashima, T., Tabuchi, K., Hoshino, T., Shimada, A., Tsuzuki, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Jijiwa, M., Asai, N., Hara, A., Takahashi, M., Kato, M.: Partial impairment of c-Ret at tyrosine

- 1062 accelerates age-related hearing loss in mice. *Neurobiol. Aging*, 33, 626.e25-e34 (2012)
- (5) Tamura, H., **Ohgami, N.**, Yajima, I., Iida, M., Ohgami, K., Fujii, N., Itabe, H., Kusudo, T., Yamashita, H., Kato, M.: Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. *PLoS ONE*. 7, e39807 (2012)
- (6) **Ohgami, N.**, Iida, M., Yajima, I., Tamura, H., Ohgami, K., Kato, M.: Hearing impairments caused by genetic and environmental factors. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 18, 10-15 (2012)
- (7) **Ohgami, N.**, Hori, S., Ohgami, K., Tamura, H., Tsuzuki, T., Ohnuma, S., Kato, M.: Exposure to low-dose barium by drinking water causes hearing loss in mice. *NeuroToxicology*, 33, 1276-1283 (2012)
- (8) Kato, M., Kumasaka, M.Y., Takeda, K., Hossain, K., Iida, M., Goto, Y., **Ohgami, N.**: L-cysteine as a regulator for arsenic-mediated cancer-promoting and anti-cancer effects. *Toxicol. In Vitro*, 25, 623-629 (2011)
- (9) Ida-Eto, M.*, **Ohgami, N.***, Iida, M., Yajima, I., Kumasaka, M.Y., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Sone, M., Nakashima, T., Tsuzuki, T., Komune, S., Yanagisawa, M., Kato, M.: Partial requirement of endothelin receptor B in spiral ganglion neurons for postnatal development of hearing. *J. Biol. Chem.*, 286, 29621-29626. (2011) *These authors equally contributed to this work.
- (10) Yajima, I., Kumasaka, M.Y., Thang, N.D., Goto, Y., Takeda, K., Iida, M., **Ohgami, N.**, Tamura, H., Yamanoshita, O., Kawamoto, Y., Furukawa, K., Kato, M.: Molecular Network Associated with MITF in Skin Melanoma Development and Progression. *J. Skin Cancer*, 2011, 730170 (2011)
- [学会発表] (計 18 件)
- (1) **大神信孝**、飯田真智子、**加藤昌志**：飲水投与した低用量バリウムの聴覚系への影響、日本薬学会第 133 年会 (横浜) (2013 年 3 月 27-30 日)
- (2) 飯田真智子、矢嶋伊知朗、中川薫、**大神信孝**、近藤 博基、竹田圭吾、堀勝、加納 浩之、**加藤昌志**：動物モデルを用いた非熱的大気圧プラズマによる抗腫瘍効果の検討、第 83 回日本衛生学会総会 (金沢) (2013 年 3 月 24-26 日)
- (3) **大神信孝**、飯田真智子、**加藤昌志**：飲水投与した低用量バリウムの聴覚系疾患への影響、第 83 回日本衛生学会総会 (金沢) (2013 年 3 月 24-26 日)
- (4) **大神信孝**、田村青鳥、飯田真智子、矢嶋伊知朗、**加藤昌志**：低周波騒音曝露による平衡感覚異常の解析、第 12 回分子予防環境医学研究会 (筑波) (2013 年 2 月 1-2 日)
- (5) 飯田真智子、矢嶋伊知朗、**大神信孝**、田巻満里絵、**加藤昌志**：皮膚メラニンと日光曝露による酸化ストレスとの関連、第 24 回日本色素細胞学会学術大会 (長浜) (2012 年 11 月 24-25 日)
- (6) **大神信孝**、飯田真智子、矢嶋伊知朗、**加藤昌志**：Analysis of endothelin receptor B expressed in spiral ganglion neurons、第 24 回日本色素細胞学会学術大会 (長浜) (2012 年 11 月 24-25 日)
- (7) **大神信孝**、田村青鳥、飯田真智子、矢嶋伊知朗、**加藤昌志**：低周波騒音が平衡感覚に与える影響、フォーラム 2012：衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋) (2012 年 10 月 25-26 日)
- (8) **Ohgami, N.**: Analysis of molecular targets expressed in spiral ganglion neurons to prevent hearing losses. Department seminar at Dept. of Biochemistry, Dartmouth Medical School (NH, USA) (August 24 2012).
- (9) **Ohgami, N.**: Environmental stress-related diseases-Noise-induced physiological impairments-The 3rd International Symposium of Environmental Health Sciences in Hanoi, Vietnam, Hanoi University of Technology (Hanoi, Vietnam) (April 25-26 2012).
- (10) **大神信孝**、田村青鳥、飯田真智子、**加藤昌志**：環境ストレスと関連する聴覚系疾患の解析、第 132 回日本薬学会年会 (札幌) (2012 年 3 月 28-31 日)
- (11) **大神信孝**：環境ストレスと関連する聴覚系疾患の解析、第 82 回日本衛生学会総会 (京都) (2012 年 3 月 24-26 日)
- (12) 田村青鳥、**大神信孝**、**加藤昌志**：低周波騒音が平衡感覚に与える影響の解析、

第 82 回日本衛生学会総会（京都）（2012 年 3 月 24-26 日）

- (13) **大神信孝**：環境ストレスと関連する聴覚系疾患の解析、第 4 回「タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会」（大阪）（2011 年 11 月 10-10 日）
- (14) **大神信孝**、田村青鳥、**加藤昌志**：騒音ストレスと関連する新規聴力制御遺伝子の解析、フォーラム 2011：衛生薬学・環境トキシコロジー（金沢）（2011 年 10 月 27-28 日）
- (15) **大神信孝**：環境ストレスと関連する聴覚系疾患の解析、第 84 回日本生化学会大会・シンポジウム「D-アミノ酸の生化学：飛躍する新領域」（京都）（2011 年 9 月 24 日）
- (16) **大神信孝**、飯田真智子、田村青鳥、**加藤昌志**：Endothelin receptor B in spiral ganglion neurons partially contributes to postnatal development of hearing.、第 35 回日本神経科学大会 / Neuroscience2012（名古屋）（2011 年 9 月 18-21 日）
- (17) **大神信孝**、田村青鳥、**加藤昌志**：新規難聴遺伝子 c-Ret の解析、第 34 回日本神経科学大会 / Neuroscience2011（横浜）（2011 年 9 月 17 日）
- (18) **Ohgami, N.**: Environmental stress-related diseases-Noise-induced physiological impairments-.The 2nd International Symposium of Environmental Health Sciences in Malaysia, University Malaysia Sabah (Malaysia) (April 27-28 2011)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：聴覚障害又は小脳性運動失調症の予防・治療剤

発明者：**大神信孝**、**加藤昌志**

権利者：中部大学

種類：特許

番号：特願 2012-259456

出願年月日：2012 年 11 月 28 日

国内外の別：国内

○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

http://www.chubuehs.sakura.ne.jp/Chubu_University_Environmental_Health_Sciences/homepage.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大神 信孝 (OHGAMI NOBUTAKA)

中部大学・生命健康科学部・講師

研究者番号：80424919

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し