

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500502

研究課題名(和文)聴覚機能解明および聴覚細胞再生モデルとしての新規誘導型障害マウスの開発

研究課題名(英文)A novel mouse model for hearing impairment by selective ablation of OHCs in the inner ear

研究代表者

松岡 邦枝 (MATSUOKA, Kunie)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：40291158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：「聞こえ」の調節に重要な内耳に存在する外有毛細胞(OHC)の機能を解明し、聴覚障害の治療や予防に役立てることを目的として、ジフテリア毒素を投与することでOHCのみを破壊することのできるマウスモデルを開発した。マウスはOHCを破壊すると高度の難聴となった。OHCの細胞機能に重要な遺伝子を同定するため、OHC破壊マウスと正常マウスの内耳蝸牛における遺伝子発現を網羅的に比較解析した結果、OHCに強く発現する特異遺伝子としてカルシウム結合タンパク質をコードするOncomodulin (Ocm)を同定した。

研究成果の概要(英文)：Outer hair cells (OHC) play an essential role in the amplification of sound-induced vibrations in the cochlea. To study the critical functions of OHC, we generated a novel mouse model, OHC-TRECK, for hearing impairment by introducing the human diphtheria toxin (DT) receptor gene under the control of the mouse prestin promoter. DT administration to OHC-TRECK mice were found to result in severe hearing impairment with the decrease in amplitude of distortion product otoacoustic emissions and the elevated auditory brainstem responses thresholds. Microarray and RNA-seq analysis using inner ear cochlear RNA revealed that the expression of Oncomodulin (Ocm) gene, coding EF-hand Ca²⁺ binding protein, was significantly decreased in DT-administered OHC-TRECK mice and OCM expression was specifically detected in OHC. These results suggest that OCM performs an important function with Ca²⁺ binding ability in mechanotransduction in OHC.

研究分野：実験動物学

キーワード：難聴 内耳外有毛細胞 疾患モデル トランスジェニックマウス ジフテリア毒素

1. 研究開始当初の背景

耳は空気の振動である音を電気刺激に変換して脳に伝えるための器官であり、内耳蝸牛内のコルチ器に存在する内有毛細胞 (inner hair cell; IHC) および外有毛細胞 (outer hair cell; OHC) が音刺激の変換・伝達に重要な役割を果たしている。空気の振動である音は、外耳道を通り鼓膜を振動させる。この振動はツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨による耳小骨連鎖を経て内耳蝸牛に伝えられる。蝸牛内はリンパ液で満たされており、その振動はリンパ液の圧力変動へと変換される。蝸牛内にはコルチ器という器官が存在し、リンパ液の圧力変動によりコルチ器が振動する。コルチ器には IHC と OHC が存在し、コルチ器の振動により有毛細胞の上端に存在する聴毛が屈曲する。IHC では、それによりイオンチャンネルが開いて陽イオンが流入し、細胞内電位が上昇して聴神経を刺激し、この信号が脳へ伝達されることで音を認識する。OHC ではコルチ器の振動により IHC と同様に細胞内電位が変化するが、この電位変化によって OHC はその細胞長を変化させて、コルチ器の振動を増幅する。

蝸牛における OHC の増幅機構は我々の聴覚において極めて重要な役割を果たしており、OHC の機能異常は難聴の発症に直結する。一般的に OHC の方が IHC よりも弱く、先に傷害を受けることが多い。細菌やウイルスの感染、騒音への曝露、ある種の抗生剤の投与によっても OHC は損傷される。OHC は一度失われると再生せず、加齢とともにその数は減少する。高齢者に難聴患者が多いのはそのためだが、加齢性難聴の根本的な治療はなく、補聴器の使用により聴力を補わざるを得ないのが現状である。加齢性難聴は人類に最も多い慢性疾患の一つであり、OHC の機能を明らかにすることは、難聴の予防や治療法の開発の基礎になると考えられる。

これまで、聴覚のメカニズムの解明のために、様々な難聴モデルマウスが用いられてきた。難聴を自然発症するマウス系統は多く知られている。NOD や DBA/2 は出生直後から高度難聴を示し、C57BL/6 や BALB/c は加齢に伴い聴力が低下する加齢性難聴を示す。これらのマウスの解析から、内耳蝸牛における精密な情報処理機構が解明されつつある。また、突然変異による先天性難聴マウスも多数知られており、これらの解析からミオシン 7A、カドヘリン 23、SANS など Usher 症候群に関連する原因遺伝子が明らかとなってきた。一方、ネオマイシンやゲンタマイシン等アミノグリコシド系抗生剤の投与により第 8 神経障害を誘導し、難聴を引き起こすことが可能であることが知られているが、同時に腎障害が引き起こされるという副作用があった。

2. 研究の目的

本研究では、標的細胞ノックアウト法 (TRECK 法) により OHC を誘導的に破壊

することのできるマウスを樹立し、OHC の機能および分化機構を解明し、聴覚障害の治療に役立てることを目的とした。本研究で樹立する難聴モデル OHC-TRECK マウスは、任意の時期にマウス個体の OHC のみを特異的に破壊することが可能なマウスモデルである。DT を投与することが引き金となるが、DTR を発現していない細胞には影響を与えないため、副作用の心配が不要である。TRECK-OHC マウスは OHC の機能を解明するために極めて有用なツールとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) OHC-TRECK マウスの作製

マウスがジフテリア毒素 (DT) に耐性であることを利用して、標的とする細胞特異的にヒトジフテリア毒素レセプター (DTR) を発現するマウスを作製し、DT を投与することで標的細胞を死に至らしめる TRECK 法 (図 1) により、OHC をマウス生体内から誘導的に除去できるマウスを作製した。すなわち、OHC 特異的に発現するモータータンパク質 Prestin をコードする *Pres* のプロモーターをクローニングし、DTR cDNA と連結して導入遺伝子を構築した。これを C57BL/6J マウスの受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、偽妊娠 ICR 雌マウスに移植してトランスジェニックマウス (OHC-TRECK マウス) を作出した。

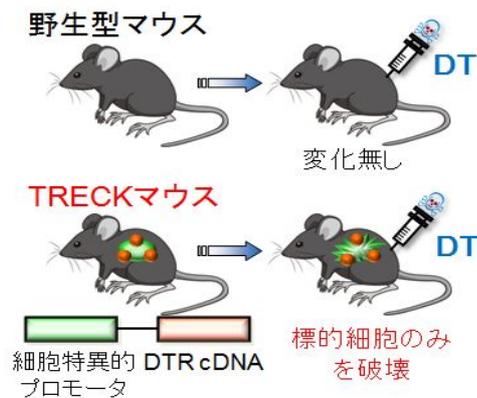


図 1 TRECK 法の原理

(2) マウスの聴力測定

DT 投与 / 非投与の野生型 (WT) マウスおよび OHC-TRECK マウスの聴力は 4、8、16、32 kHz のトーンピップ音に対する聴性脳幹反応 (ABR) の測定により聴力閾値を判定した。また、OHC の伸縮運動の指標となる歪成分耳音響放射 (DPOAE) を測定した。

(3) 内耳蝸牛の免疫組織化学解析

内耳蝸牛を 4% PFA 中で摘出、固定後、抗ミオシン VI 抗体、ファロイジン、DAPI を用いて whole mount 標本の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(4) マイクロアレイ解析

4 週齢の WT マウス・OHC-TRECK マウスに DT を投与して 7 日後の内耳および DT 非投与の 5 週齢の WT マウス・OHC-TRECK マウスの内耳より RNA を抽出し、Agilent Whole Mouse Genome Ver. 2.0 (4 x 44k type) を用いて、発現 RNA の比較を行った。

(5) RNA-seq 解析

4 週齢あるいは生後 1 日の WT マウス・OHC-TRECK マウスに DT を投与して 7 日後 (5 週齢あるいは生後 8 日) および DT 非投与の同週齢・日齢のマウスの内耳蝸牛より RNA を精製し、DNaseI 処理後、Illumina HiSeq2500 により発現遺伝子の網羅的解析を行った。

(6) CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトマウスの作製

OHC 特異的発現遺伝子として同定した *Ocm* のノックアウト (KO) マウスを CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を行って樹立した。翻訳開始点直後の 20 mer をターゲットとして sgRNA を作製し、Cas9 RNA と同時に C57BL/6J マウス受精卵前核にマイクロインジェクションし、偽妊娠 ICR 雌マウスに移植して産仔を得た。変異の確認は、SURVEYOR Mutation Detection System および sequence 解析により行った。

4. 研究成果

(1) OHC-TRECK マウスは DT の投与により聴力障害を呈する

OHC-TRECK マウスは 4 系統のファウンダーが得られた。5 週齢の各系統および WT マウスに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DT を腹腔投与し、7 日後に ABR による聴力測定を行った。その結果、#6 系統は聴力の低下を示さなかったが、#38 系統は高度難聴を、#53 系統は中高度難聴を、#65 系統は中度難聴を示した (図 2)。最も重篤な聴力障害を呈し、聴力の個体差も小さい #38 系統を誘導型 OHC 破壊モデルとして詳細な解析を行うこととした。

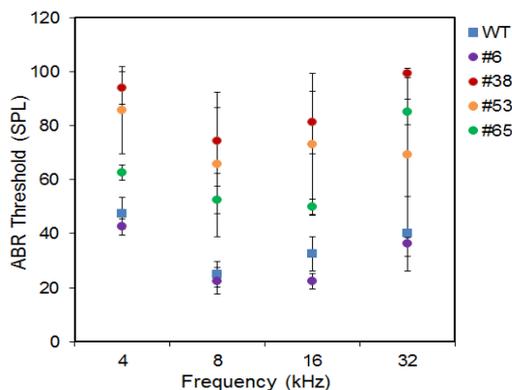


図 2 OHC-TRECK マウス各系統の聴力閾値

DT 非投与 / 投与の OHC-TRECK マウスおよび WT マウスの 8 kHz、90 dB のトーンピップ音に対する ABR 波形を図 3 に示した。DT 非投与の OHC-TRECK マウスは正常な波形を示すが、DT 投与 OHC-TRECK マウスでは電位変化が著しく低下していた。

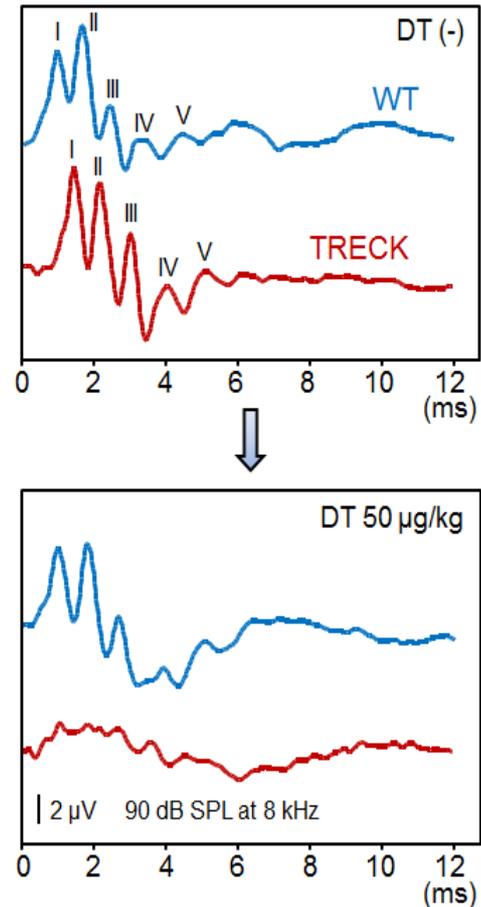


図 3 DT 投与による ABR 波形の変化

5 週齢の OHC-TRECK マウスおよび WT マウスに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DT を腹腔投与し、7 日後に DPOAE を測定した。DT 非投与の OHC-TRECK マウスは WT マウスと同様の DPOAE を示したが、DT 投与 OHC-TRECK マウスでは DPOAE がほとんど検出されず、OHC の伸縮運動が認められないことが明らかとなった。(図 4)

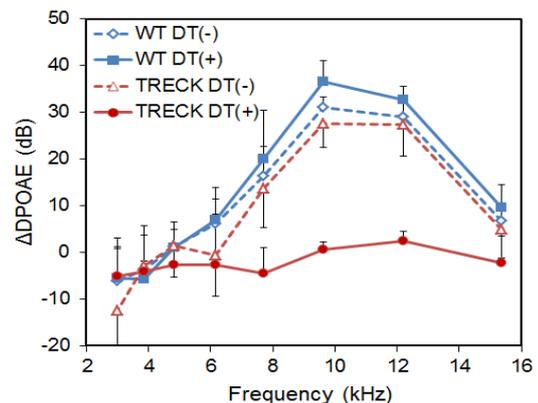


図 4 DT 投与 OHC-TRECK マウスでは DPOAE が消失する

(2) OHC-TRECK マウスは DT の投与により OHC が特異的に破壊される

5 週齢の OHC-TRECK マウスに 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DT を腹腔投与して 7 日後、内耳蝸牛コルチ器の whole mount 標本を作製し、抗ミオシン VI (MYO6) 抗体で有毛細胞を、ファロイジンで F-actin を、DAPI で核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。DT 非投与の OHC-TRECK マウスは 1 列の OHC と 3 列の IHC が整列する完全に正常な形態を示したが、DT 投与 OHC-TRECK マウスでは OHC が消失していた。一方、IHC は正常な形態を保っていた (図 5)。

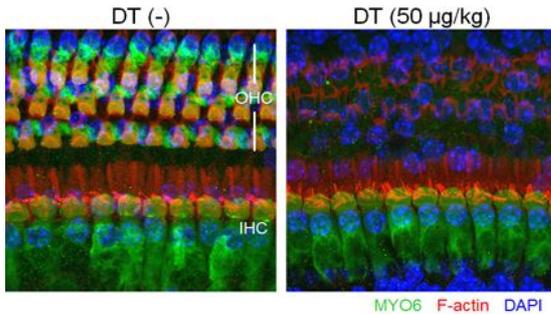


図 5 OHC-TRECK マウスは DT 投与により OHC が特異的に破壊される

(3) OHC-TRECK マウスを用いた OHC 特異的発現遺伝子の探索

OHC の機能の特徴付ける遺伝子を同定するために、4 週齢で 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の DT を腹腔投与して 7 日後の OHC-TRECK マウスおよび WT マウス、DT 非投与の 5 週齢の OHC-TRECK マウスおよび WT マウスの内耳蝸牛より RNA を調整し、発現遺伝子のマイクロアレイ解析を行った。さらに、詳細な情報を得るために RNA-seq 解析 (文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」による支援を受けた) を行った。マイクロアレイ解析と RNA-seq 解析において、DT 投与 OHC-TRECK マウスで特に著しい発現減少が認められる遺伝子として EF ハンド型 Ca^{2+} 結合タンパク質をコードする Oncomodulin (Ocm) を同定した。

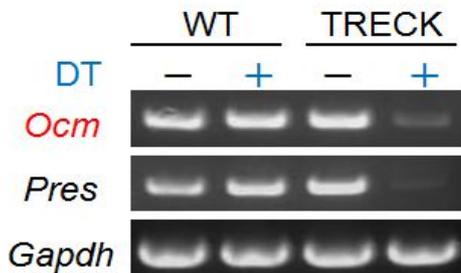


図 6 内耳蝸牛における遺伝子発現

Ocm の内耳における発現を検証するために RT-PCR を行った。Ocm mRNA の発現は OHC 特異的に発現する Pres と同様に DT 投

与 OHC-TRECK マウスの内耳で発現が減少していることが実証された (図 6)。また、WT マウスのコルチ器の whole mount 標本の免疫染色を行った結果、OCM は OHC 特異的に発現しており、細胞質と核に発現が認められたが、特に核に強い発現が確認された (図 7)。

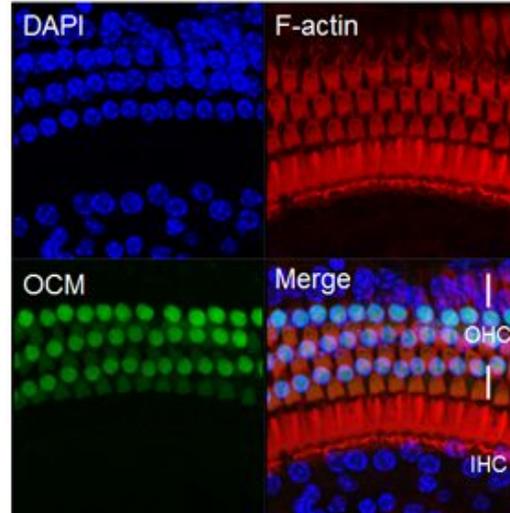


図 7 OCM は OHC 特異的に発現している

さらに、RNA-seq のデータを精査した結果、Ocm や Pres 以外には、GABA 作動性ニューロン関連遺伝子群が DT 投与 OHC-TRECK マウスで大きく減少することが明らかとなった。

(4) Ocm-KO マウスの樹立

聴覚における Ocm の機能を解明するために CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を行い、Ocm-KO マウスを樹立した。本マウスに生じた変異は PAM 配列の 5'側 7 塩基を欠失するフレームシフト変異であった。抗 OCM 抗体による免疫染色を行った結果、Ocm-KO マウスでは OCM の発現が消失していた (図 8)。

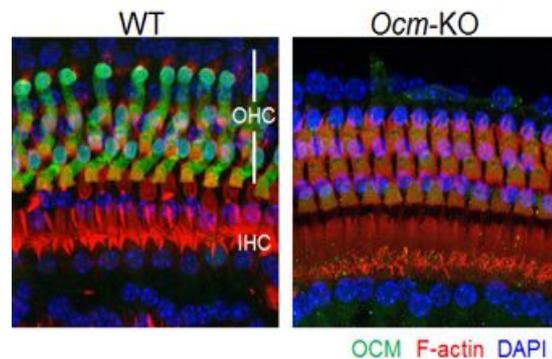


図 8 Ocm-KO マウスでは OCM の発現が消失する

(5) 総括

本研究で樹立した OHC-TRECK マウスは、

DTを投与することにより、OHCが特異的に破壊され、重篤な聴覚障害を引き起こした。OHC-TRECKマウスを用いた内耳蝸牛における発現遺伝子の網羅的探索により、OHC特異的発現遺伝子として *Ocm* を同定し、*Ocm* の機能を解明するために、*Ocm*-KOマウスを樹立した。今後、*Ocm*-KOマウスの表現型を詳細に解析することにより、*Ocm* の聴覚における役割を明らかにしていく。また、RNA-seq解析の結果、GABA作動性ニューロン関連遺伝子群がOHCの機能に重要な役割を果たしていることを示唆するデータを得た。この結果は哺乳類の聴覚路でGABAが抑制性神経伝達物質として重要な役割を担っていることを裏付けている。さらに、RNA-seqの解析結果を精査することにより、OHCの機能の特徴付ける遺伝子が同定されることが期待される。一方、OHC-TRECKマウスはDT投与前には正常な聴力を示し、DTの投与によって誘導的に難聴となることから、突発性難聴のモデルとなり得る。TRECK-OHCマウスはOHCの機能解明のためのツールにとどまらず、難聴の治療法・予防法の開発や再生医療への応用が期待される。

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 5 件)

Suzuki S, Ishikawa M, Ueda T, Ohshiba Y, Miyasaka Y, Okumura K, Yokohama M, Taya C, Matsuoka K, Kikkawa Y: Quantitative trait loci on chromosome 5 for susceptibility to frequency-specific effects on hearing in DBA/2J mice. *Exp. Anim.*, in press, 査読有
DOI: 10.1538/expanim.14-0110

Miyasaka Y, Suzuki S, Ohshiba Y, Watanabe K, Sagara Y, Yasuda SP, Matsuoka K, Kominami R, Kikkawa Y: Compound heterozygote between the functional null *Cdh23v-ngt* allele and hypomorphic *Cdh23ahl* allele leads to early-onset progressive hearing loss in mice. *Exp. Anim.*, (2013) 62, 333-346, 査読有
DOI: 10.1538/expanim.62.333

Matsuoka K, Saito M, Shibata K, Sekine M, Shitara H, Taya C, Zhang X, Takahashi TA, Kohno K, Kikkawa Y, Yonekawa H: Generation of mouse models for type 1 diabetes by selective depletion of pancreatic beta cells using toxin receptor-mediated cell knockout. *Biochem. Biophys. Res. Com.* (2013) 436,

400-405, 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.114

Matsuoka K, Shitara H, Taya C, Kohno K, Kikkawa Y, Yonekawa H: Novel Basophil- or Eosinophil-Depleted Mouse Models for Functional Analysis of Allergic Inflammation. *PLoS ONE* (2013) 8, e60958, 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0060958

Kikkawa Y, Seki Y, Okumura K, Ohshiba Y, Miyasaka Y, Suzuki S, Ozaki M, Matsuoka K, Noguchi Y, Yonekawa H: Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp Anim*, 61, 85-98, 2012, 査読有
DOI: 10.1538/expanim.61.85

[学会発表](計 15 件)

松岡 邦枝, 安田 俊平, 宮坂 勇輝, 和田 健太, 設楽 浩志, 山口 碧, 多屋 長治, 吉川 欣亮: 内耳外有毛細胞選択的破壊マウスを用いた特異遺伝子の探索、第62回日本実験動物学会総会、2015. 5. 28、京都テルサ(京都府・京都市)

Kikkawa Y, Miyasaka Y, Wada K, Tokano H, Kitamura K, Matsuoka K: Establishment of a Novel Mouse Model for Hearing Impairment by Selective Ablation of Outer Hair Cells in the Inner Ear. *Inner Ear Biology Workshop 2014*, 2014. 11. 2, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

吉川 欣亮, 宮坂 勇輝, 和田 健太, 設楽 浩志, 松岡 邦枝: in vivo 誘導型内耳感覚細胞破壊による細胞特異的機能遺伝子の同定、日本遺伝学会第86回大会、2014. 9. 19、長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市)

米川 博通, 松岡 邦枝, 吉川 欣亮, 設楽 浩志, 河野 憲二, 多屋 長治: 毒素受容体を用いた標的細胞破壊法(TRECK法)によるヒト疾患モデルマウスの作製、日本遺伝学会第86回大会、2014. 9. 19、長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市)

松岡 邦枝, 宮坂 勇輝, 設楽 浩志, 和田 健太, 戸叶 尚志, 喜多村 健, 米川 博通, 吉川 欣亮: 新規誘導型内耳有毛細胞破壊マウスの開発と応用、日本実験動物科学技術さっぽろ2014(第61回日本実験動物学会総会・第48回日本実験動物技術者協会総会 合同大会)、2014. 5. 16、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

関 優太, 鈴木 沙理, 宮坂 勇輝, 松岡 邦

枝、吉川 欣亮：マウス Myo6 変異体の解析によって明らかとなった優性難聴発症のメカニズム、日本実験動物科学技術さっぽろ 2014 (第 61 回日本実験動物学会総会・第 48 回日本実験動物技術者協会総会合同大会)、2014. 5. 16、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

小原 央、大芝 泰弘、鈴木 沙理、宮坂 勇輝、関 優太、安田 俊平、松岡 邦枝、設楽 浩志、吉川 欣亮：BALB/c 亜系統間には高音域の聴力差が存在する、日本実験動物科学技術さっぽろ 2014 (第 61 回日本実験動物学会総会・第 48 回日本実験動物技術者協会総会 合同大会)、2014. 5. 16、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

小原 央、大芝 泰弘、鈴木 沙理、宮坂 勇輝、関 優太、安田 俊平、松岡 邦枝、設楽 浩志、吉川 欣亮：BALB/cA 系統の高音特異的早発性難聴の発症原因となる hfhl 遺伝子座の同定、第 36 回日本分子生物学会年会、2013. 12. 5、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

松岡 邦枝、設楽 浩志、戸叶 尚史、宮坂 勇輝、和田 健太、喜多村 健、吉川 欣亮：新規誘導型内耳有毛細胞破壊マウスの開発、第 36 回日本分子生物学会年会、2013. 12. 4、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Suzuki S, Ohshiba Y, Obara Y, Miyasaka Y, Yasuda SP, Seki Y, Matsuoka K, Kikkawa Y: Novel QTLs underlying early-onset, high-frequency hearing loss in BALB/cA mice. 27th International Mammalian Genome Conference, 2013. 9. 16, Salamanca, Spain

Ohshiba Y, Suzuki S, Obara Y, Miyasaka Y, Yasuda SP, Seki Y, Matsuoka K, Kikkawa Y: Identification of novel susceptibility loci leading to early-onset high-frequency hearing loss in BALB/cA mice. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference, 2013. 6. 24, Palo Alto, California, USA

Seki Y, Matsuoka K, Suzuki S, Miyasaka Y, Ohshiba Y, Wada K, Takebayashi H, Kikkawa Y: A new spontaneous mutation in the mouse myosin VI gene. 9th Molecular Biology of Hearing & Deafness Conference. 2013. 6. 24, Palo Alto, California, USA

松岡 邦枝、設楽 浩志、吉川 欣亮、河野

憲二、多屋 長治、米川 博通：TRECK 法による好塩基球除去マウスおよび好塩基球除去マウスの樹立と解析、日本実験動物科学・技術 九州 2012 (第 59 回日本実験動物学会総会・第 46 回日本実験動物技術者協会総会 合同大会)、2012. 5. 24、別府国際コンベンションセンター(大分県・別府市)

大芝 泰弘、鈴木 沙理、関 優太、松岡 邦枝、吉川 欣亮：マウス高周波特異的難聴発症に關与する新たな遺伝子座の同定、第 26 回モロシヌス研究会、2012. 5. 15、東京大学弥生講堂一条ホール(東京都・文京区)

関 優太、松岡 邦枝、鈴木 沙理、和田 健太、望月 英志、若菜 茂晴、竹林 浩秀、吉川 欣亮：内耳有毛細胞の stereocilia 形成・維持に異常を示す 2 つの Myosin VI 突然変異アレルの同定、第 26 回モロシヌス研究会、2012. 5. 15、東京大学弥生講堂一条ホール(東京都・文京区)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/mammal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 邦枝 (MATSUOKA, Kunie)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：40291158

(2) 研究分担者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20280787