

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430099

研究課題名(和文) マウス内耳の細胞内カルシウム動態観測による加齢性難聴の解析基盤構築

研究課題名(英文) Deciphering structural and functional basis of age-dependent hearing loss by using intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics

研究代表者

美野輪 治 (Minowa, Osamu)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発研究員

研究者番号：00181967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢進行性難聴モデルマウスとしての意義を検討するために、カルシウム動態異常をきたす変異体の難聴表現型、特に難聴進行速度の差異と変異部位との関係を解析し、有毛細胞欠失は加齢性難聴進展の大半を説明するが、欠失前の機能低下の寄与もある事が推測され、この機能低下と細胞欠失までの期間の相関が示唆された。

更に発現系整備のための最適化を実施し、適用可能な全変異体に関する動力的dataを収集するための条件を検討した。こうした*in vitro*の動力的dataと*in vivo*での表現型の総合的解析を行う事により、細胞レベルでの老化につながる変化の明示的なマーカーを得る事が発症機構全体の理解のために必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the significance of mouse mutant as a model for age-related progressive deafness, analyzed were phenotypes of mutants causing calcium dynamics abnormality. These analyses showed a relation between rate of deafness progression and a location of mutation site within the molecule. Most of the development of the age-related hearing loss is consequence of hair cell loss, but the certain contribution of the functional decay was presumed. A correlation was suggested between the extent of this functional decay and the period until cell depletion onset. To achieve the optimization of *in vitro* expression system for measuring kinetic data on all applicable mutants, we examined the conditions of the system. It is thought to be essential to find an explicit marker of the change leading to cellular aging caused by calcium dynamics alteration, by accumulating those *in vitro* kinetic data and *in vivo* comprehensive analysis results of the phenotypes, for understanding the whole process.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：加齢性難聴 老人性難聴 モデルマウス カルシウム

(1) 研究開始当初の背景

ヒト加齢性・老人性難聴原因解明の現状；動物モデルの必要性加齢性・老人性難聴は老化に伴う進行的な感音難聴であり、65-75歳の約4人に一人、75歳以上の半数以上に軽度以上の難聴が有り、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、医療面からの加齢性・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、生理学的変化が提案されている。しかしながらその発症機序には未だ不明な点が多く、多角的な解析が必要である。現在主な原因として可能性が議論されているものを列挙すると以下の様である。

- a. 酸化ストレスとミトコンドリア変異・障害
- b. 外界要因による小胞体ストレスからのアポトーシス誘起説
- c. 同、小胞体ストレスからの premature senescence (細胞老化) 誘起説
- d. 外界からのストレス耐性因子であるシャペロン応答機構劣化説
- e. オートファジー誘起説
- f. カルシウム調節異常説
- g. 増殖因子低下説
- h. 光顕的に内耳細胞数と形態に変化が見られない老人性難聴が全体の1/4ある一細胞変成、細胞死を伴わない何らかの機能低下又は、変性前の前駆症状説(1)

この様な多様な原因があり得るとして、これらは、様々な実体のレベルに分散していて、一次的原因から発症に至るまでの或る断面を観察しているにすぎない可能性があり、それぞれは原因というより、多様な発症要因のひとつと考えるべきであろう。従って、発症に至る多様なネットワークシステムを考える必要があり、ヒトの疾患そのものの詳細な解析は困難である事を考えると、加齢と環境ストレスの関与を入り口としたその全容解明のためには、加齢性・老人性難聴のよい動物モデルが不可欠である。

カルシウム調節異常の意義-加齢性聴覚障害へ広範に関与する可能性；  
上述a-hのうち、g, h を除いたa-f は、細胞内の事象に言及している。感覚器神経系以外

の細胞における近年の研究からの知見によると、未解明の部分が大きいながら、f. による細胞内カルシウムの動態が、その他のa-eまでの全ての過程に関与する可能性が示されている。従って、マウス加齢進行性表現型と聴覚障害の進展とカルシウム動態の関係を解析することにより、老人性難聴の発症進展機構の説明が可能になる事が期待される。

(2) 研究の目的

継時的聴覚機能障害・細胞障害を示すマウスモデルが必要である。  
長期にわたる環境ストレス、或は加齢そのものが内耳機能障害・細胞障害を起因する機構；その分子経路は必ずしも明らかではない。マウスモデルを用いたNAHLに関する研究により、様々な経路と原因が指摘され、AAHLとの関連性が指摘される反面、必ずしも共通の機構が働いているのではないとする解釈もある。AAHLの解析の困難さの一つは、モデルを用意し易いNAHLに比して、動物モデルを用意しにくい点にあるが、近年我々は理研ENU誘発変異体開発プロジェクトにおいてその遺伝性モデルの開発に着手し、また海外では大規模なproject が現在進行している(MRC)。例えば理研に於いて樹立された変異体 "M\_290(Pmca2)" は、加齢性聴覚障害の表現型、即ち継時的な聴覚機能低下(ABR閾値の増大)を明瞭に示す。従って、これらの変異体は、“加齢性難聴をpredispose している”のであって、加齢そのもの、環境ストレスによる機能・細胞障害の増悪に対して感受性がより高くなっていると考えられ、こうしたモデルの加齢性変化を継時的に詳細に解析することは、ヒト老人性難聴の発症機構の解明に有益な情報をもたらすと期待される。一方、おなじマウスでの遺伝性難聴モデルであっても、明瞭な継時的変化を示すものでなければ、以上の観点から考えて役には立たない。そこで本研究では、ENU誘発変異体として樹立されたChd23, Pmca2, mir96 遺伝子等に変異が同定されている複数のマウスシステムを用い、継時的な表現型記述と組織学的解析を実施することにより、継時的変化の実体と機能障害の関係を明示する。また、変異体有毛細胞のex vivoでの生理学的解析法によりカルシウム動態を観測するシステムを構築し、その動態異常と進行性表現型の関係を明らかにする

多様な変異体マウス、遺伝子改変マウスシステムを利用できる長所を生かす。

ENUによる変異体は、導入される変異の大部分が点突然変異である事、それにより、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、他の変異体にはない利点を有する。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、実に多様な役割を果たしている。したがって、老人性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点突然変異が不可欠である。理化学研究所の世界有数の遺伝変異マウスのリソースを用い、進行性難聴の表現型を示す複数の遺伝性マウスにおいて、継時的な組織学的・生理学的解析を実施する事により、病態の進展の詳細な記述と、その機構に関する知見を得る。更に、*ex vivo*での生理学的解析法によりカルシウム動態観測システムを構築し、その動態異常と進行性難聴の関係を明らかにし、病態・機構分析の指標とする事を試みる。これらを総合し、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盤を構築する。

### (3) 研究の方法

理化学研究所の世界有数の遺伝変異マウスのリソースを用い、進行性聴覚障害の表現型を示す複数の遺伝性マウス加齢性・老人性難聴モデルとしての意義を確立するため、内耳における基礎的な組織形態学的、生理学的解析を継時的に実施できるシステムを構築し、加齢性内耳障害の記述、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。そのため、継時的な解析において、聴覚機能低下のフェーズと細胞変性、細胞死のフェーズを識別する事を試みる。次いで最適な時期を選別し、*ex vivo*の生理的測定を分光学的手法により行い、カルシウム動態を解析する。これらを、老人性難聴モデルマウスに適用する際に、同時に高脂肪食、カロリー制限の環境負荷の効果も解析する。

### (4) 研究成果

加齢進行性難聴モデルマウスとしての意義を検討するために、カルシウム動態異常をきたす変異体の難聴表現型、特に難聴進行速度の差異と変異部位との関係を解析し、有毛細胞欠失は加齢性難聴進展の大半を説明するが、欠失前の機能低下の寄与もある事が推測され、この機能低下と細胞欠失までの期間の相関が示唆された。

更に発現系整備のための最適化を実施し、適用可能な全変異体に関する動力的 data を収集するための条件を検討した。こうした

*vitro*の動力的 data と *vivo*での表現型の総合的解析を行う事により、細胞レベルでの老化につながる変化の明示的なマーカーを得る事が発症機構全体の理解のために必要と考えられた

### (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)

1. Fukunaga I, Fujimoto A, Hatakeyama K, Aoki T, Nishikawa A, Noda T, Minowa O, Kurebayashi N, Ikeda K, Kamiya K. “In Vitro Models of GJB2-Related Hearing Loss Recapitulate Ca<sup>2+</sup> Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea.” **Stem Cell Reports.** ;7(6):1023-1036..2016 (査読有)

2. Toki H, Minowa O, Inoue M, Motegi H, Karashima Y, Ikeda A, Kaneda H, Sakuraba Y, Saiki Y, Wakana S, Suzuki H, Gondo Y, Shiroishi T, Noda T. “Novel allelic mutations in murine *Serca2* induce differential development of squamous cell tumors.” **Biochem Biophys Res Commun.** 476:175-82.2016. (査読有)

3. Inoue M, Toki H, Matsui J, Togashi Y, Dobashi A, Fukumura R, Gondo Y, Minowa O, Tanaka N, Mori S, Takeuchi K, Noda T. “Mouse models for ROS1-fusion-positive lung cancers and their application to the analysis of multikinase inhibitor efficiency.” **Carcinogenesis.** 37:452-60. 2016. (査読有)

4. Anzai T, Fukunaga I, Hatakeyama K, Fujimoto A, Kobayashi K, Nishikawa A, Aoki T, Noda T, Minowa O, Ikeda K, Kamiya K. “Deformation of the outer hair cells and the accumulation of caveolin-2 in connexin 26 deficient mice.” **PLoS One.** Oct 22;10(10):e0141258. 2015 (査読有)

5. Motegi H, Tsuboi Y, Saga A, Kagami T, Inoue M, Toki H, Minowa O, Noda T, Kikuchi J. “Identification of reliable components in multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS): a data-driven approach across metabolic processes.” **Sci Rep.** Nov 4;5:15710. 2015 (査読有)

6. Iizuka T, Kamiya K, Gotoh S, Sugitani Y, Suzuki M, Noda T, Minowa O, Ikeda K. “Perinatal *Gjb2* gene transfer rescues hearing in a

mouse model of hereditary deafness.” **Hum Mol Genet.** 24:3651-3661, 2015 ( 査読有 )

7. Kidokoro Y, Karasawa K, Minowa O, Sugitani Y, Noda T, Ikeda K, Kamiya K. “Deficiency of transcription factor Brn4 disrupts cochlear gap junction plaques in a model of DFN3 non-syndromic deafness.” **PLoS One.** 9:e108216. 2014 ( 査読有 )

8. Toki H, Inoue M, Minowa O, Motegi H, Saiki Y, Wakana S, Masuya H, Gondo Y, Shiroishi T, Yao R, Noda T. “Novel retinoblastoma mutation abrogating the interaction to E2F2/3, but not E2F1, led to selective suppression of thyroid tumors.” **Cancer Sci.** 105:1360-8. 2014( 査読有 )

9. Kamiya K, Yum SW, Kurebayashi N, Muraki M, Ogawa K, Karasawa K, Miwa A, Guo X, Gotoh S, Sugitani Y, Yamanaka H, Ito-Kawashima S, Iizuka T, Sakurai T, Noda T, Minowa O, Ikeda K. “Assembly of the cochlear gap junction macromolecular complex requires connexin 26.” **J Clin Invest.** 124:1598-607. 2014 ( 査読有 )

10. Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, Fujita T. “Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5.” **Immunity.** 40:199-212. 2014 ( 査読有 )

[学会発表](計 8件)

1. Osamu Minowa, Hideaki Toki, Hiroshi Suzuki, Kazusaku Kamiya, Katsuhisa Ikeda, Tetsuo Noda, “Deafness Model Phenotypes with Impaired Cellular Calcium Sequestration Implies Pathways Contributing Progressive Deafness”, 40<sup>th</sup> ARO midwinter meeting, 2017/02/14, Baltimore, MD. USA

2. Yoshinobu Sugitani, Reiko Sugitani-Yoshida, Katsuyuki Yaginuma, Shigeyasu Nakai, Osamu Minowa, Masaharu Ogawa and Tetsuo Noda, “The temporal-codes of neural stem cells underlying the cell diversity and the tumorigenesis in mice”, Symposium : ”Decoding” of the mouse by developmental genetics approaches; the 48<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015/06/05, Tsukuba International Conference Center, Tsukuba-shi. Ibaraki-ken, Japan

3. Ichiro Fukunaga; Kaori Hatakeyama; Osamu Minowa; Katsuhisa Ikeda; Kazusaku Kamiya, “The Activation of Stem Cell Homing Factors Highly Induces the Cochlear Invasion of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.” 38<sup>th</sup> ARO midwinter meeting, 2015/02/23, Baltimore, MD. USA

4. Kazusaku Kamiya; Ichiro Fukunaga; Kaori Hatakeyama; Takashi Anzai; Osamu Minowa; Katsuhisa Ikeda, “Assembly and Disruption of Cochlear Gap Junction Macromolecular Complex are Regulated by Connexin 26”, 38<sup>th</sup> ARO midwinter meeting, 2015/02/21, Baltimore, MD. USA

5. Kazusaku Kamiya; Keiko Karasawa; Asuka Miwa; Takashi Anzai; Megumi Funakubo; Osamu Minowa; Katsuhisa Ikeda, “Activation of Stem Cell Homing Promotes the Cochlear Invasion of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells “ 37<sup>th</sup> ARO midwinter meeting, 2014/02/24, San Diego, CA, USA

6. \*Yoshinobu Kidokoro; Kazusaku Kamiya; Osamu Minowa; Katsuhisa Ikeda, “Drastic Disruption of Gap Junction Plaque in Brn4 Deficient Mouse, a Model for DFN3 Nonsyndromic Deafness “ 37<sup>th</sup> ARO midwinter meeting, 2014/02/24, San Diego, CA, USA

7. Takashi Iizuka; Kazusaku Kamiya; Osamu Minowa; Tetsuo Noda; \*Katsuhisa Ikeda “Correction of Hearing in the Mouse Model of Hereditary Deafness by Gjb2 Gene Transfer Using Adeno-Associated Viral Vectors “ 37<sup>th</sup> ARO midwinter meeting, 2014/02/24, San Diego, CA, USA

8. Osamu Minowa; Hiromi Motegi; Hideaki Toki; Maki Inoue; Hideki Kaneda; Tomohiro Suzuki; Hiroshi Masuya; Shigeharu Wakana; Yoichi Gondo; Tetsuo Noda, “Deafness Models With Amino Acid Substitution in Plasma Membrane Calcium Pump Suggest Pathways That Differentiate the Phenotype” 37<sup>th</sup> ARO midwinter meeting, 2014/02/23, San Diego, CA, USA

[図書](計 1件)

1. 美野輪治, 八尾良司 「マウスとヒトの違い」、マウス表現型解析スタンダード(実験医学別冊) 46-55. 2016

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

美野輪 治 (MINOWA OSAMU)  
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソ  
ースセンター・開発研究員  
研究者番号：00181967

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

池田 勝久 (IKEDA KATUHISA)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：70159614

神谷 和作 (KAMIYA KAZUSAKU)

順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：10374159

(4)研究協力者

( )