

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592573

研究課題名(和文) エピジェネティック制御機構を利用した進行性/加齢性難聴治療法の検討

研究課題名(英文) Attenuation of Progressive Hearing Loss in DBA/2J Mice by Epigenetic-Modifying Reagents

研究代表者

務台 英樹 (Mutai, Hideki)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・聴覚平衡覚研究部・研究員

研究者番号：60415891

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)：代表者は、進行性/加齢性難聴動物モデルDBA/2Jマウスに対するエピジェネティック調節剤の投与により、聴力低下が有意に抑制されることを見出した。

遺伝子発現網羅解析を実施し、定量的RT-PCR法および免疫組織化学的検証により、蝸牛組織における亜鉛トランスポーターをコードするZip4(Slc39a4)遺伝子発現量の上昇と難聴進行抑制との関連が示された。Zip4発現上昇作用をもつ緑茶カテキン成分EGCG投与によっても聴力低下は有意に抑制された。以上、聴覚がエピジェネティクス制御により調節されること、および蝸牛細胞内での亜鉛取り込み能が聴覚機能維持に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hearing loss can be caused by a combination of multiple environmental and genetic factors. In this study, we investigated whether epigenetic regulatory pathways could modulate a mouse model of progressive hearing loss.

Subcutaneous treatment of DBA/2J mice with a combination of epigenetic modifying reagents, methionine and valproic acid (M+V) significantly reduced the decline of hearing. Microarray analyses and subsequent quantitative RT-PCR and immunohistochemistry demonstrated up-regulation of a zinc importer, Zip4 in the cochlear tissues in association with attenuation of progressive hearing loss. Treatment of DBA mice with EGCG, a major green tea catechin with Zip4-inducing activity resulted in attenuation of hearing decline. This study suggests that epigenetic pathways can modify auditory function and demonstrates that zinc intake in the cochlea via Zip4 mediates the maintenance of mammalian hearing.

研究分野：耳科学 分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 加齢性難聴 亜鉛トランスポーター 緑茶カテキン EGCG

### 1. 研究開始当初の背景

65歳以上人口の3分の1は難聴であるとされ、聴力の維持は高齢化の進むわが国の国民の生活の質に関わる重要課題である。一方、遺伝子発現をゲノムDNAやヒストン修飾により制御する機構であるエピジェネティクスは、環境因子が生体に及ぼす影響の主要な分子機構であり、腫瘍・糖尿病・精神疾患などとの関連が多数報告されている(2004 *Nature* 429:457-63, 2007 *Curr Med Chem* 14:2642-53, 2010 *Genome Res* 20:170-92 など)。

研究代表者はこれまで、エピジェネティック制御機構の主要機能分子であるDNAメチル化酵素、ヒストン脱アセチル化酵素が内耳において時期・細胞特異的に発現していること、生後発達期に、内耳で発現する転写因子 *Pou3f3* がDNAメチル化亢進に伴い発現が減少すること、進行性/加齢性難聴モデルDBA/2Jマウス(DBAマウス)の内耳より聴力低下にともないDNAメチル化レベルが変化する遺伝子領域 *DMahl* が存在すること、などを世界に先駆け発見してきた(2009 *Develop Neurobiol* 69:913-30, 2011 北米耳鼻咽喉科学会など)。この知見から、酸化ストレス傷害などによりおきるとされる進行性/加齢性難聴の分子機序に、エピジェネティクスの影響を追加導入した独自の仮説を提唱している(図1)。

複合要因(騒音の長期暴露、生活習慣(肥満、高血圧など)、遺伝子多型)

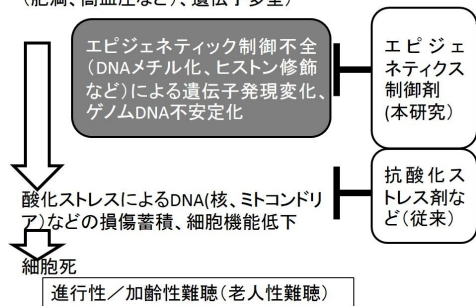


図1 務台が提唱する進行性・可能性難聴の分子機序

申請者はさらに、DNAメチル化酵素及びヒストン脱アセチル化酵素の調節剤 methionine と valproic acid の同時投与(M+V)により、同モデル動物の聴力低下を有意に抑制できる事を見出した(特願2011-007581、図2)。これは従来研究されてきた、抗酸化ストレス剤(2009 *PNAS* 106:19432-37 など)とは標的が異なり、エピジェネティクス調節作用による遺伝子発現正常化を通じた細胞機能維持効果によるものと考えられる。

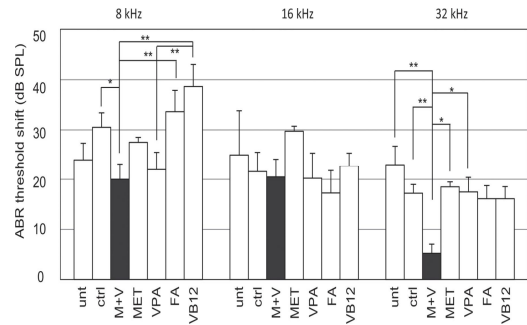


図2 二種のエピジェネティック調節剤(M+V)同時投与によるDBAマウスのABR閾値上昇(難聴進行)の有意な低下

### 2. 研究の目的

本研究はエピジェネティック調節剤による聴力低下抑制効果の薬理作用を詳細に解析することで、難聴発症の分子機序を明らかにし、より効果的な難聴予防・治療法の開発へと発展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

第一に、エピジェネティック調節剤による難聴低下が抑制される難聴動物モデルDBA/2Jマウス蝸牛を用い、エピジェネティック制御下にある遺伝子群および遺伝子ネットワークパスウェイを網羅的に同定し、これを詳細に解析することで、聴力維持機構にエピジェネティック制御機構の関与が重要であることを分子レベルで解明する。第二に、同定された遺伝子標的の発現量調節剤の投与により、より効果的な難聴低下の予防・治療法を提案・検討する。

### 4. 研究成果

薬剤投与・非投与動物群間の蝸牛で遺伝子発現網羅解析を実施し、定量的RT-PCR法および免疫組織化学的検証により、亜鉛トランスポーターをコードする *Zip4(Slc39a4)* 発現量の上昇と難聴進行抑制との関連が同定された(図3)

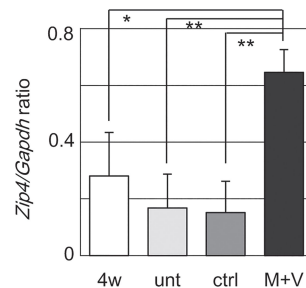


図3 (M+V)群マウス蝸牛における *Zip4* 発現量の有意な上昇

免疫組織化学的解析により、蝸牛内外側壁、コルチ器、らせん神経節などに *Zip4* 分子の強いシグナルが観察された。

*Zip4* 発現上昇作用をもつ緑茶カテキン成

分 EGCG 投与によっても聴力低下は有意に抑制され(図 4 A)、この時蝸牛内 *Zip4* 発現量は有意に上昇していた(図 4 A)。

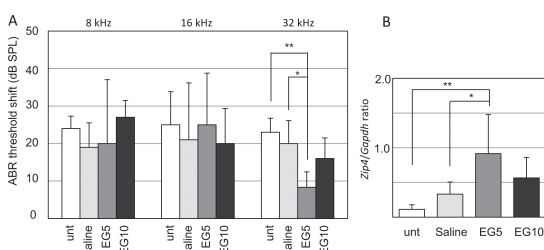


図 4 EGCG 投与による DBA マウスの ABR 閾値上昇の有意な低下と蝸牛内 *Zip4* 発現量上昇

以上、聴覚がエピジェネティクス制御により調節されること、および蝸牛細胞内での亜鉛取り込み能が聴覚機能維持に関与することが示唆された。

## 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 Mutai H, Miya F, Masato Fujii M, Tsunoda T, Matsunaga T. **Attenuation of Progressive Hearing Loss in DBA/2J Mice by Reagents That Affect Epigenetic Modifications Is Associated with Up-Regulation of the Zinc Importer *Zip4***. 2015 *PLOS ONE* 10(4): e0124301. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0124301

2 Masuda S, Namba K, Mutai H, Usui S, Miyanaga Y, Kaneko H, Matsunaga T. **A mutation in the heparin-binding site of noggin as a novel mechanism of proximal symphalangism and conductive hearing loss**. *Biochem Biophys Res Comm* 2014 May 9;447(3):496-502. 査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.015

3 Okamoto Y, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y, Sugiuchi T, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Ogahara N, Takagi A, Taiji H, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T. **Subgroups of enlarged vestibular aqueduct in relation with *SLC26A4* mutations and hearing loss**. *Laryngoscope* 2014 Apr;124(4):E134-140 査読有 doi: 10.1002/lary.24368.

4 松永、鈴木、務台、難波、加我. **次世代シーケンサーを用いた難聴の遺伝子診断に関する検討** *Otol Japan* 2013.23(5) 903-907 査読有

5 Mutai H, Suzuki N, Shimizu A, Torii C, Namba K, Morimoto N, Kudoh J, Kaga K, Kosaki K, Matsunaga T. **Diverse spectrum**

**of rare deafness genes underlies early-childhood hearing loss in Japanese patients: A cross-sectional, multi-center next-generation sequencing study.**

*Orphanet Journal of Rare Diseases* 2013,8: 172 査読有 doi: 10.1186/1750-1172-8-172.

6 Minami S, Mutai H, Nakano A, Arimoto Y,

Taiji H, Morimoto N, Sakata H, Adachi N, Masuda S, Sakamoto H, Yoshida H, Tanaka F, Sugiuchi T, Kaga K, Matsunaga T. **GJB2-associated hearing loss undetected by hearing screening of newborns** *GENE* 2013, 532:41-45 査読有 doi: 10.1016/j.gene.2013.08.094.

7 Watabe T, Matsunaga T, Namba K, Mutai H, Inoue Y, Ogawa, K. **Moderate hearing loss associated with a novel *KCNQ4* non-truncating mutation located near the N-terminus of the pore helix**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013, 432: 475-479. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.118.

8 Matsunaga T, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S. **Genetic analysis of *PAX3* for diagnosis of Waardenburg syndrome type I**. *Acta Oto-Laryngologica* 2013, 133: 345-51. 査読有 doi:10.3109/00016489.2012.744470.

9 Minami S, Masuda S, Usui T, Mutai H, Matsunaga T. **Comorbid of *GJB2* and *WFS1* mutations in one family**. *Gene*, 2012,501: 193-7. 査読有 doi: 10.1016/j.gene.2012.03.060.

10 Matsunaga T, Mutai H, Kunishima S, Kazunori Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Okamoto Y, Shinden S, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K. **A prevalent founder mutation of *OTOF* and additional genotype-phenotype correlations identified in Japanese patients with congenital or early-onset auditory neuropathy**. *Clinical Genetics* 2012, 82: 425-432. 査読有 doi: 10.1111/j.1399-0004.2012.01897.x.

[学会発表](計 7 件)

1 務台英樹、宮冬樹、藤井正人、角田達彦、松永達雄 **DBA/2J マウスのメチオニン・バルプロ酸による難聴進行抑制と候補標的遺伝子の亜鉛トランスポーター*Zip4*** 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 平成 27 年 5 月 25 - 26 日 一ツ橋学術総合センター (東京)

2 務台英樹、藤井正人、松永達雄  
**DBA/2J マウスの難聴進行を抑制したエピジェネティクス調節剤の分子機構解析** 第 24 回日本耳科学会 平成 26 年 10 月 16-18 日 朱鷺メッセ (新潟市)

3 Mutai H, Miya F, Fujii M, Matsunaga T  
**Attenuation of Progressive Hearing Loss in DBA/2J Mice by Epigenetic-Modifying Reagents Is Associated with Up-Regulation of the Zinc-Importer *Zip4/Slc39a4***  
第 38 回北米耳鼻咽喉科学会総会 2015 年 2 月 21-25 日 Baltimore Marriott Waterfront, Baltimore (USA)

4 務台英樹、難波一徳、加我君孝、松永達雄 **孤発例の先天性難聴患者における稀少難聴遺伝子変異の同定**。第23回日本耳科学会 平成25年11月24-26日 シーガイアコンベンションセンター (宮崎市)

5 Mutai H, Suzuki N, Atsushi Shimizu A, Torii C, Namba K, Kudoh J, Kosaki K, Matsunaga M. **Target-captured next generation sequencing of reported deafness genes reveals variability of genetic background of hereditary hearing loss in Japan.** 第 9 回聴覚・難聴の分子生物学学会 2013 年 6 月 22-25 日 Stanford University, Palo Alto(USA)

6 鈴木直大、務台英樹、鳥居千春、清水厚志、宮冬樹、難波一徳、工藤純、小崎健次郎、松永達雄 **カスタムターゲットリシーケンスによる難聴関連遺伝子の変異探索**  
第 57 回日本人類遺伝学会 平成 24 年 10 月 24 - 27 日 大宮ソニックシティ、大宮市

7 務台英樹・藤井正人・松永達雄 **難聴モデル DBA/2J マウスに対するエピジェネティクス調節と聴力変化の検討** 第 22 回日本耳科学会 平成 24 年 10 月 4 - 6 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

〔図書〕(計 件)

〔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：  
出願年月日：  
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  
務台 英樹 (MUTAI, Hideki)  
国立病院機構東京医療センター臨床研究センター・聴覚平衡覚研究部・研究員  
研究者番号：60415891

(2) 研究分担者  
宮 冬樹 (MIYA, Fuyuki)  
理化学研究所・統合生命医科学研究センター・リサーチアソシエイト  
研究者番号：50415311

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：