

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09733

研究課題名（和文）遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いた有毛細胞障害機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Hair Cell Dysfunction Mechanisms Using Genetically Modified Zebrafish

研究代表者

山下 裕司 (Yamashita, Hiroshi)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00210419

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：先天性難聴の原因の50%は遺伝子によるものと推定されている。本研究は、難聴関連遺伝子を欠損した遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いて、難聴のメカニズムを解明し治療法を探ることを目的とした。TMPRSS3、LOXHD1、STRCの遺伝子欠損ゼブラフィッシュを作成した。これらのゼブラフィッシュの側線器有毛細胞と行動学的特徴を解析した結果、LOXHD1bは側線器有毛細胞に、LOXHD1aは内耳有毛細胞に発現することを発見した。LOXHD1b欠損動物では感覚毛の形態異常はわずかに見られるのみであったが、水流に対する反応が有意に低下していた。研究は継続中であり、追加データが得られ次第報告する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで原因不明とされていた先天性難聴の大部分に遺伝子の病的バリエーションが関与することが明らかになってきた。最近、一部の原因遺伝子においては、その役割が解明され、先天性難聴の機序も明らかになってきている。本研究においては、難聴の原因となることが知られているものの、機序が不明な先天性難聴を対象とし、難聴の原因となっている遺伝子の機能解明を目的とした。海外では遺伝子の病的バリエーションが原因となっている一部に先天性難聴に対して遺伝子治療の試験が開始されており、本研究で得られた知見も将来の先天性難聴の治療に有益となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recent studies estimate that at least 50% of congenital hearing loss cases are caused by genetic factors. This research aims to elucidate the mechanism of hearing loss and explore potential treatments using genetically modified zebrafish with mutations in hearing-related genes. Zebrafish lacking the TMPRSS3, LOXHD1, and STRC genes were created. Analysis of their lateral line hair cells and behavioral characteristics revealed that LOXHD1b is expressed in lateral line hair cells, while LOXHD1a is expressed in inner ear hair cells. Although LOXHD1b-deficient animals showed only minor sensory hair morphology abnormalities, their response to water flow was significantly reduced. The study is ongoing, and additional data will be reported as it becomes available.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先天性の聴覚障害の発生頻度は、出生 1000 人に約 1 人と言われており、先天性疾患の中で最も高頻度に認められる疾患の一つである。近年の調査によると、先天性難聴の原因の少なくとも 50% は遺伝子が関与していると推測されるが、難聴の遺伝子解析と臨床応用に関する研究が進んでおり、実際の臨床でも難聴の原因遺伝子が特定された患者をよく経験する。現在までに難聴に関与するとされる遺伝子は 200 種類ほどであるとされており、その原因遺伝子ごとに難聴の程度や予後、随伴疾患の予測など、臨床上有用であるが、根本的な治療法はなく、補聴器や人工内耳で対応されているのみである。本研究では、遺伝性難聴の根本的な治療法はないかという「問い」を解決するべく、ゼブラフィッシュの側線器有毛細胞を用いた基礎的研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒトの先天性難聴の原因となっている遺伝子変異をゼブラフィッシュに発現させ、側線器有毛細胞の解剖学的、生理学的変化を明らかにする。さらに、変異のないタンパク質やその他の薬剤を投与することで、側線器有毛細胞の解剖学的、生理学的変化が改善できるかどうかを検討する。これまでの研究から、先天性難聴の多くの原因遺伝子が同定され、原因タンパク質の機能についても遺伝子改変マウスなどで明らかにされつつある。しかしながら、哺乳動物では難聴遺伝子を発現した有毛細胞は側頭骨内に存在するため、動物が生存した状態で観察することは困難であった。本研究では、難聴遺伝子変異を発現した有毛細胞について、生体を生存させたまま観察することで、生理学的な変化について検討可能である。難聴を引き起こす遺伝子変異に対して機能回復に有効な薬剤を検討するための薬剤スクリーニングが行われた研究はほとんどないため、本研究は独自性が高いものである。

### 3. 研究の方法

#### 遺伝子改変ゼブラフィッシュの作成

本研究では、ヒト遺伝性難聴の原因となる遺伝子を側線器有毛細胞に発現するゼブラフィッシュを作成することから実験を開始する。そのために、側線器有毛細胞に発現する難聴遺伝子を選択する必要がある。ヒトの有毛細胞に発現するとされる難聴遺伝子の中で、ゼブラフィッシュにも存在するものを GeneBank で検索し、選択した。これらの遺伝子がゼブラフィッシュに存在することは報告されているが、実際にゼブラフィッシュの側線器に発現しているかどうかについて報告がない場合には、それぞれ確認する必要がある。そのために、ゼブラフィッシュの発現遺伝子より、これらの難聴遺伝子のクローニングを行った。

クローニングされた遺伝子を用いてプローブを作成し、in situ hybridization により、側線器有毛細胞に発現があるかどうかを確認する。予備実験として、遺伝性難聴 DFNB77 の原因遺伝子 LOXHD についてプローブを作成し、in situ hybridization を施行した。

本研究では、LOXHD 以外の遺伝子についても 3~5 種類を選択し、ゼブラフィッシュにおいてクローニングを行い、側線器有毛細胞における遺伝子の発現を確認する。難聴遺伝子をノックアウトした遺伝子をゼブラフィッシュ胚にマイクロインジェクションすることで、難聴遺伝子を持つ個体を作成する。この個体を繁殖させることで、安定して遺伝子改変ゼブラフィッシュの稚魚を供給できる体制を構築する。

#### 表現型（生理学的特徴、解剖学的特徴）の解析

遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いて、表現型（生理学的、解剖学的特徴）を解析する。生理学的特徴の解析としては、遊泳の姿勢や遊泳範囲などについてビデオで撮像し、画像解析を行う。また、暗所における水中の姿勢や流水中の姿勢についても同様に解析する。

また、解剖学的な特徴を解析するために、遺伝子改変動物の側線器について標本作製し、電子顕微鏡で観察する。あるいは、抗 parvalbumin 抗体を用いて有毛細胞をラベルし、蛍光顕微鏡で観察し、野生型との相違について検討する。

### 4. 研究成果

#### 遺伝子改変ゼブラフィッシュの作成

ヒトの有毛細胞に発現するとされる難聴遺伝子の中で、ゼブラフィッシュにも存在するものを選択した（表 1）。

本研究では LOXHD1、TMPRESS3、STRC 遺伝子を選択し、これらの遺伝子改変ゼブラフィッシュを作成した。LOXHD1 遺伝子はゼブラフィッシュにおいては LOXHD1a と LOXHD1b が存在する、それぞれの遺伝子に相補的な配列のプローブを作成し、in situ hybridization を行った結果を図に

示す。LOXHD1b 遺伝子は、ゼブラフィッシュにおいても、側線器有毛細胞に発現していることが明らかになった。一方で LOXHD1a は内耳の有毛細胞に発現していた。本研究では LOXHD1a 欠損ゼブラフィッシュと LOXHD1b 欠損ゼブラフィッシュを作成した。

遺伝性難聴病名	原因遺伝子 (ヒト)	ゼブラフィッシュで対応する遺伝子	発現箇所
DFNB 8/10	TMPRSS3	TMPRSS3、TMPRSS3a	内有毛細胞・ラセン神経節にも発現
DFNB 16	STRC	si:ch211-150j10.4	外有毛細胞間の水平方向の上部のコネクタ (lateral link) の形成
DFNB 25	GRXCR1	ヒトと同一	有毛細胞におけるアクチン組織化に関与
DFNB 67	LHFPL5	LHFPL5a、LHFPL5b	毛束の形態形成
DFNB 72/95	GIPC3	ヒトと同一	毛束の成熟および有毛細胞の長期生存
DFNB 77	LOXHD1	LOXHD1a、LOXHD1b	有毛細胞に発現
DFNB 88	ELMOD3	ヒトと同一	不動毛、kinociliaと蝸牛感覚細胞に関与
DFNB 99	TSPEAR	ヒトと同一	有毛細胞に発現

表:ヒト有毛細胞に発現し、ゼブラフィッシュにも存在する難聴遺伝子

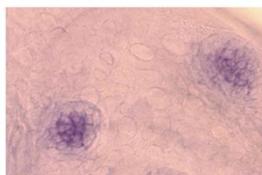
### 表現型 (生理学的特徴、解剖学的特徴) の解析

側線器における表現型を解析する目的で LOXHD1b 欠損ゼブラフィッシュを解析した。免疫組織化学染色、電子顕微鏡での解析を行ったが、側線器有毛細胞においては、野生型と比べて、明かな変化は認めなかった。動物の行動学的解析を行うために、野生型ゼブラフィッシュと LOXHD1b 欠損ゼブラフィッシュの遊泳状態を比較した。画像解析ソフトを用いた解析を行ったが、通常の状態では遊泳状態に差は認められなかったが、水流に対する反応は LOXHD1b 欠損ゼブラフィッシュにおいて有意に低下していることが明らかになった。

研究期間に十分に解析できていなかったが、現在、LOXHD1a 欠損ゼブラフィッシュの解析を継続する予定である。



ゼブラフィッシュ全体図



側線器拡大図

図 ゼブラフィッシュ稚魚によるin situ hybridization  
ヒト難聴遺伝子LOXHDが側線器有毛細胞に発現していることを確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuura Takafumi, Sugahara Kazuma, Yamamoto Yohei, Tsuda Junko, Hashimoto Makoto, Yamashita Hiroshi	4. 巻 143
2. 論文標題 Prevention of progressive hearing loss in a mouse model of diabetes by oral intake of eicosapentaenoic acid ethyl ester	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 113 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2023.2170463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi Yuki, Sugahara Kazuma, Takemoto Yosuke, Tsuda Junko, Hirose Yoshinobu, Hashimoto Makoto, Yamashita Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Protective effect of astaxanthin nanoemulsion on mammalian inner ear hair cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e15562 ~ e15562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.15562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto Makoto, Koizuka Izumi, Yamashita Hiroshi, Suzuki Mamoru, Omori Koichi, Origasa Hideki, Takeda Noriaki, Shojaku Hideo	4. 巻 -
2. 論文標題 Diagnostic and therapeutic strategies for vestibular neuritis of the Japan society for equilibrium research	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2022.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shunsuke Tarumoto, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Yoshinobu Hirose, Junko Tsuda, Yosuke Takemoto, Hironori Fujii, Takafumi Matsuura, Hiroaki Shimogori, Junji Ohgi, Hiroshi Yamashita.	4. 巻 47
2. 論文標題 Effect of preservation on the physical and chemical properties of the temporal fascia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 377-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2019.12.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Junko Tsuda, Kazuma Sugahara, Hiroshi Yamashita	4. 巻 7
2. 論文標題 Glycative stress and the inner ear disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycative stress research	6. 最初と最後の頁 240-247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24659/gsr.7.3_240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe Katsuya, Nishimura Shogo, Sugahara Kazuma, Yamashita Hiroshi, Tanizawa Yukio	4. 巻 7
2. 論文標題 A patient with sudden hearing loss induced by propylthiouracil	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e06196 ~ e06196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e06196	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計46件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩本 文, 菅原一真, 橋本 誠, 山下裕司
2. 発表標題 STRC 遺伝子 knock out ゼブラフィッシュの表現型についての検討
3. 学会等名 第123回 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本 文, 菅原一真, 橋本 誠, 山下裕司
2. 発表標題 STRC遺伝子knock outゼブラフィッシュの表現型の検討
3. 学会等名 第67回 日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aya Iwamoto, Kazuma Sugahara, Makoto Hashimoto, Junko Tsuda, Hiroshi Yamashita
2. 発表標題 Effect of defective bone calcium metabolism on otolith formation in zebrafish
3. 学会等名 The7th East Asian Symposium on Otology (EASO 2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本 文, 樽本俊介, 菅原一真, 広瀬敬信, 橋本 誠, 山下裕司
2. 発表標題 STRC 遺伝子 knock out ゼブラフィッシュの作成について
3. 学会等名 第122回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本 文, 菅原一真, 広瀬敬信, 橋本 誠, 山下裕司
2. 発表標題 STRC 遺伝子 knock out ゼブラフィッシュの作成について
3. 学会等名 第66回 日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樽本俊介, 浅岡洋一, 菅原一真, 広瀬敬信, 松浦貴文, 橋本 誠, 清木 誠, 山下裕司
2. 発表標題 LOXHD1b遺伝子ノックアウトゼブラフィッシュの行動解析について
3. 学会等名 第121回 日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樽本俊介, 菅原一真, 広瀬敬信, 橋本 誠, 松浦貴文, 山下裕司
2. 発表標題 LOXHD1b 遺伝子ノックアウトゼブラフィッシュの行動解析について
3. 学会等名 第30回 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下裕司
2. 発表標題 めまい・難聴に関する最近の知見-内耳のアンチエイジング-
3. 学会等名 札幌ENTカンファレンス
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅原 一真  (Sugahara Kazuma)  (20346555)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授   (15501)	
研究分担者	橋本 誠  (Hashimoto Makoto)  (50343299)	山口大学・医学部附属病院・講師   (15501)	
研究分担者	廣瀬 敬信  (Hirose Yoshinobu)  (80555714)	山口大学・医学部附属病院・講師   (15501)	削除：2021年9月30日

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	樽本 俊介  (Tarumoto Shunsuke)	山口大学・医学系研究科・大学院生	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関