

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650100

研究課題名（和文） 動物モデルを用いた難聴発症後の社会行動モニタリング

研究課題名（英文） Monitoring of social behavior associated with onset of hearing loss used model mice

研究代表者

吉川 欣亮（KIKKAWA YOSHIKI）

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

研究成果の概要（和文）：難聴発症後の社会行動の基礎データを蓄積するため、早発性難聴モデルマウスである DBA/2J (D2) と遅発性難聴モデルマウスである C57BL/6J (B6) 間で F₂ マウスを作製し、社会行動のモニタリングを行った。その結果、不動時間および行動速度において早発性難聴個体と正常聴力個体間において明確な差異が認められ、難聴個体の自発行動の低下が示された。また、これらの行動データを指標とし、QTL 解析を行った結果、行動速度とかんれんする QTL が第 4 番染色体に検出され、さらに、関連解析の結果、この領域の遺伝子型が D2 ホモの個体は行動速度が低下することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To accumulate the basic data of social behavior after onset of hearing loss, we analyzed open field activities using by F₂ mice between DBA/2J (D2, model for early-onset hearing loss) and C57BL/6J (B6, model for late-onset hearing loss). The F₂ mice were classified as groups of normal hearing (NH) and hearing impairment (HI), and we detected that HI mice significantly remained in the same place compared with the NH mice. In addition, HI mice were slower than NH mice in the moving time; these results suggested that HI mice affect voluntary behavior by hearing defects. By QTL analysis, we identified QTLs on chromosome 4 that significantly associated with the moving time. Moreover, F₂ mice of genotype D2/D2 homozygote at a marker of chromosome 4 associated with the moving times that were significantly slower than BALB/B6 heterozygote and B6/B6 homozygote mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	0	2,100,000
2010 年度	500,000	0	500,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	150,000	3,250,000

研究分野：哺乳類遺伝学，実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：遺伝学，医療・福祉，社会医学，難聴，疾患モデルマウス，社会行動モデルマウス，QTL

1. 研究開始当初の背景

(1) 聴覚から受容される情報量は極めて多く、ヒトの生活に多大な影響を与えており、

難聴患者、特に突発性難聴患者は大きなストレス、不安を抱えて生活することを余儀なくされる。従って、突発性難聴患者に対する発

症後のアフターケアは極めて重要な問題となっている。特に、リハビリテーションを行う上で、患者の精神状態、心理状況を把握し、そのデータ収集・蓄積することが最も有用であると考えられるが、発症後の難聴患者の精神状態、心理状況を把握するために行われる調査はアンケート、インタビューによるものが主となっており、患者の先入観にとらわれず、その社会行動を調査することがより重要になると考えられる。しかし、実際に患者を対象として詳細な社会行動を調査することは困難である。従って、ヒトが突発性難聴を発症したとき、その後どのような社会行動を示し、どのような精神状態に陥るのかを把握するためには動物モデルを利用するのが現在のところ有効な方法の一つであると考えられる。

(2) このような実験・調査に用いる動物モデルとしては聴覚に異常を示すヒト難聴モデルマウスが有効であると考えられる。マウスには現在 100 種を超える難聴モデルが存在しており、ヒト突発性難聴の動物モデルとしては、遺伝的に均一化された近交系マウスがモデルマウスとして有効であり、さらに、我々は突発性難聴のモデルとなるようなマウス系統を本研究の予備実験の段階で同定していた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は聴力低下モデルマウスを用い、さらに交配実験を加え、ヒト社会に類似した状況を構築し、聴力低下後のマウスに生殖行動、情報交換行動、他個体への攻撃行動、反復行動などの社会行動にどのような変化を示すのかを経時的に詳細にモニターすることを目的とした。

(2) 加えて、行動モニタリングを行ったすべての個体について全染色体に網羅的に設定した遺伝子マーカーを用いて遺伝子型判定を行い、各行動パラメータに対して QTL 解析を行い、行動形質と遺伝子間の相関についても調査することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 突発性聴力低下モデルコロニーの作成と社会行動モニタリング

性成熟後に劇的な聴力低下を示す DBA/2J (D2) 系統に約 12 ヶ月齢で聴力低下を示す C57BL/6J (B6) 系統間で F₂ マウス個体群を作成し、D2 の早発型難聴発症の責任遺伝子である *Fascin2* (*Fscn2*) 近傍の遺伝子マーカーの遺伝子型の判定を行うことによって将来的に聴力低下を示す個体と正常な聴力を維

持する個体かを識別した。遺伝子型判定後の個体は、Auditory Brainstem Response (ABR) 法により聴力測定後、正常聴力個体を選抜し、雌雄 1 : 1 および 2 : 1 の比率でオープンフィールド内において、1 日 1 時間、週 2 回、8 週間のサイクルでビデオ撮影を行い、自発活動量、移動速度、旋廻回数、探索行動のパラメータについてマウスの情動・行動パターンを観察した。また、同様にケージ内に同居させ、経時的に行動パターンをモニターした。観察後の個体は ABR 法により聴力測定することにより実際に聴力レベルを検証した。

(2) JF1 系統の社会行動モニタリング

遺伝的背景が均一化され、聴力にのみ個体差が存在する JF1 系統について、ABR 法によって聴力測定後、(1) と同様の解析を行った。また、JF1 の復帰突然変異体である JF1St マウスと JF1 難聴個体の組み合わせにおいても行動解析を実施した。

(3) 社会行動の遺伝学的解析

社会行動の各パラメータを観察後、それぞれの個体から DNA を抽出し、各染色体に等間隔に設置した遺伝子マーカーを用いて遺伝子型判定を行い、各行動パターンの QTL 解析を Map Manager を用いて行った。また、同定した QTL と表現型の関連解析は、GraphPad Prism を用い、One-way ANOVA およびボンフェローニ検定により行った。

4. 研究成果

(1) 突発性聴力低下モデルコロニーの作成と社会行動モニタリング : B6 および D2 マウス間で F₂ マウスを作成し、遺伝子型判定後、脳幹刺激反応閾値を測定することにより聴力を評価した結果、ほとんどの個体は正常聴力個体 (12 kHz の聴力閾値 : 10~30 dB) に分類された。これらを遺伝子型判定の結果から予測した難聴発症個体と正常個体を 1 : 1 および 2 : 1 の比率で、社会行動をモニターした結果、どちらの比率においても難聴発症を予測した個体と正常聴力と予測した個体においては 1~3 ヶ月齢においては行動の差異はほぼ認められなかったが、約 3 ヶ月齢で行動パターンに差異が認められ、難聴発症を予測した個体において行動差異が認められ、特に、難聴を発症した個体ではある一定の場所に留まる不動時間が長くなる傾向にあり、両者では約 2 倍の差が認められ、また、行動速度の低下も明らかとなった (図 1)。加えて、聴力正常個体と難聴発症個体の接触回数も減少し、特に、難聴発症個体からの接触回数が減少していた。この傾向はケージ内においても示され、さらに ABR による聴力測定の結果も予測とほぼ一致しており、今回得られ

た結果から難聴発症後のマウスは、正常聴力個体に比べ、不安により自発行動が低下するものと考えられた。

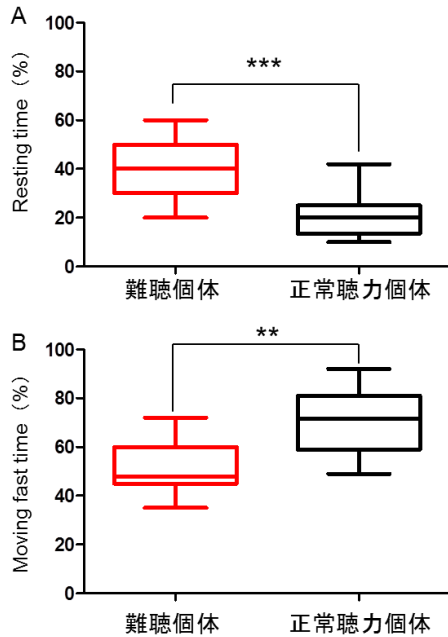


図1. (B6 x D2)F₂個体における社会行動の差異. A, マウスが不動になった時間の比率; B, マウスが速く歩いた時間の比率. **P<0.01, ***P<0.001

(2) JF1 系統の社会行動モニタリング

ABR 法により聴力測定後、JF1 マウスの聴力損失個体と聴力維持個体に分類し、行動解析を行った結果、それらの個体間で行動に統計学的に有意な差は認められなかった。この結果は、JF1 聴力維持個体の聴力閾値が 50 dB 以上であったことが原因であると考え、JF1 とその復帰突然変異体であり、聴力も正常閾値に回復している JF1-s⁺との間で行動比較を行なった。その結果、JF1-s⁺が行動速度における速度の上昇が認められたが、統計学的な有意差は認められなかった。

(3) 社会行動の遺伝学的解析

性成熟後に劇的な聴力低下を示す DBA/2J (D2) 系統と約 12 ヶ月齢で聴力低下を示す C57BL/6J (B6) 系統の F₂ マウス社会行動モニタリングの結果、早発性の難聴個体は不動時間が長期化、行動速度の低下および接触回数の低下も検出が認められた。そこでこれらの行動データを指標として、QTL 解析を実施した。その結果、すべてのカテゴリーにおいて第 11 番染色体に高い LOD スコアが検出されたが、この領域は D2 の早発性難聴の責任遺伝子の一つである *Fscn2* が存在する領域であることから、この QTL は行動のデータを支配する領域ではなく、D2 の聴力を反映するものだと考えられた。一方、行動速度の低下に

おいては、聴力を指標とした QTL 解析において検出されなかった統計学的に優位な QTL が複数検出され、特に、4 番染色体の末端部に LOD スコア 4.2 と Significant の値 (3.1) を超える QTL が得られ、この領域には難聴後の社会行動と関連する遺伝子の存在することが示唆された。そこでこの領域の遺伝子マーカーを用いて関連解析を行った結果、この領域が D2 のアレルをホモに持つ個体は、統計学的に有意 (P < 0.05) に行動速度の低下を示し、この領域に難聴発症後の行動と関連する遺伝子座が存在する可能性が示された (図 2)。

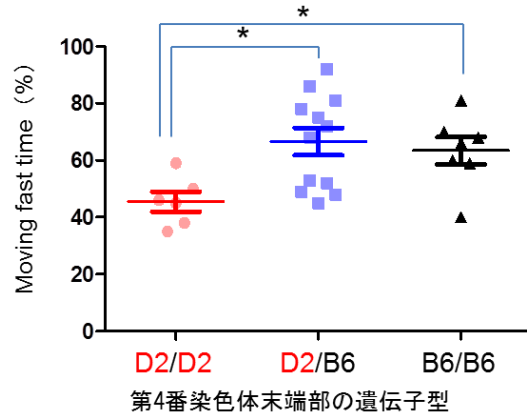


図2. (B6 x D2)F₂個体の遺伝子型と行動速度との関連. *P<0.05

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 1 件)

- ① Kikkawa Y*, Seki Y, Okumura K, Ohshiba Y, Miyasaka Y, Suzuki S, Ozaki M, Matsuoka K, Noguchi Y and Yonekawa H: Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp. Anim.*, 61, 85-98. 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/61/2/61_2_85/_article

[学会発表] (計 7 件)

- ① Suzuki S *et al.* Genetic interaction in hearing abilities of inbred mice. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 14 日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ② 吉川欣亮 他 近交系マウスの遺伝的背景に潜む視聴覚機能修飾因子. 日本遺伝学会第 83 回大会 (招待講演), 2011 年 9 月 22 日, 京都大学 (京都)
- ③ 鈴木沙理 他 遺伝的背景の差異によるマウス近交系の聴力特性の差異. 第 58 回日本実験動物学会総会, 2011 年 5 月 25 日, 船堀タワーホール (東京)

- ④鈴木沙理 他 マウスの早発性難聴発症に関する第5番染色体上の複数の感受性遺伝子. 日本遺伝学会第82回大会, 2010年9月22日, 北海道大学(札幌)
- ⑤鈴木沙理 他 近交系マウス DBA/2J の早発性難聴に関与する *Cdh23* と相互作用する修飾遺伝子の同定. 2010年5月12日, 京都テルサ(京都)
- ⑥Suzuki S *et al.* Mapping of quantitative trait loci for early onset hearing loss in DBA/2J mice. 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月11日, パシフィコ横浜(横浜)
- ⑦Okumura K *et al.* Difference in hearing ability among *Ednrb* down-regulated JF1 mice coincides with melanocyte survival of cochlear stria vascularis 23rd International Mammalian Genome Conference, November 2, 2009, La Jolla, California

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 欣亮 (KIKKAWA YOSHIAKI)
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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

和田 健太 (WADA KENTA)
東京農業大学・生物産業学部・助教
研究者番号: 20508113

(4) 研究協力者

奥村 和弘 (OKUMURA KAZUHIRO)
千葉県立がんセンター・研究所・
博士研究員
研究者番号: 80584680

鈴木 沙理 (SUZUKI SARI)
東京農業大学大学院・生物産業学研究科
博士前期課程

植田卓也 (UEDDA TAKUYA)
東京農業大学大学院・生物産業学研究科
博士前期課程