

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 6 月 20 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791659

研究課題名（和文） 加齢性難聴に関わるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名（英文） Study of epigenetic mechanism underlying age-related hearing loss

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

研究成果の概要（和文）：聴覚は、社会生活上のコミュニケーションに重要な体性感覚である。本研究では、齧歯類および霊長類聴覚上皮でのエピジェネティック制御機構の存在を示し、加齢性・進行性難聴動物モデルであるDBA/2Jマウス聴覚上皮において、聴力低下に伴い、特定の遺伝子のメチル化レベル・転写レベルに変化がおきることを見出した。DBA/2Jマウスに対し、エピジェネティクス主要酵素の調節剤投与により、有意な聴力低下抑制効果を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Auditory function is important for social communication. This study revealed evidence of epigenetic regulatory mechanism in rodent and primate auditory sensory epithelia. In DBA/2J, a mouse model of progressive/age-related hearing loss, several genes were found to change the genomic methylation levels as well as transcription levels in the auditory epithelium during progress of hearing loss. Treatment of the animals with drugs to modify epigenetic mechanism successfully attenuated the progress of hearing loss.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学

1. 研究開始当初の背景

聴覚は視覚とともに、社会生活上のコミュニケーションを行なう上で必要不可欠な体性感覚のひとつである。65歳以上で3分の1の人が患う加齢性難聴の克服は、高齢化社会における国民の生活の質にかかわる重要課題である。疾患の病因は内外環境要因と遺伝的要因に大別され、加齢性難聴もその例外ではない。加齢性難聴発症を説明する分子機序

の一つとして、酸化ストレス傷害説がある（2007 J Pathol 211: 188-97）。騒音などの酸化ストレス傷害の長期の蓄積が蝸牛細胞死と聴力低下にいたる、という説を支持する報告は多いが、フリーラジカルスカベンジャー、抗炎症ステロイド剤などの投与による難聴防止効果は限定的である（2007 Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 15:358-63）。これは、加齢性難聴発症に対する本質的理解

が不十分なためと考えられる。また、加齢性難聴と関連する一塩基多型 (SNP) の網羅的探索が、実験動物 (2003 Nat Genet 35: 21-23) や欧米での人検体を用いた大規模解析 (2007 J Med Genet 44:570-8) で進められている。同定された候補遺伝子は統計的有意差をもつ危険因子であり、SNP によるわずかな遺伝子機能の変異を、難聴発症の直接の原因と証明することは困難である。また、遺伝子治療のような根本的治療法の実現には長期間を要すると思われる。

近年急速に研究が進展しているエピジェネティック制御機構は、遺伝子の発現をゲノムメチル化などの修飾により調節する分子機構であり、長期から永続的な遺伝子発現量調節に特に強く関わることが知られている (2002 Genes Dev 16:6-21)。この制御機構の内外環境因子による調節の結果として、臓器機能発現に重要な遺伝子の発現量変化が起こり、これにより遺伝子変異を原因としない疾患の発症機序が説明できると考えられる。ゲノムメチル化変化と老化 (2003 Metabolism 52:5-9) との直接の関連は複数の臓器で報告されており、また、神経系疾患としても、統合失調症患者大脳前頭前野におけるゲノムメチル化修飾変化と動物モデルでのメチル化修飾抑制による行動異常の改善 (2005 PNAS 102:9341-9346、2005 Biol Psychiatry 57:500-509)、アルツハイマー病患者脳とゲノムメチル化修飾の関連 (2008 PLOS 3:e2698) が報告されている。以上のことから、加齢性難聴は、内外の環境因子によりエピジェネティック制御機構が調節され、それにより聴覚や抗酸化ストレスに関わる遺伝子発現が長期的に抑制され、細胞機能や傷害抵抗性が低下し、結果として聴力が低下するという分子機序を仮定すると説明できる。エピジェネティック制御機構は本質的に酵素による修飾反応であり、薬剤治療の標的となりうる。

2. 研究の目的

研究代表者は、エピジェネティック制御機構が加齢性難聴発症の分子機序に関連すると考え、この仮説の検証を目的とした。

3. 研究の方法

感覚細胞・神経障害型の進行性・加齢性難聴モデルである DBA/2J マウスを用い、ABR (聴性脳幹反応) 法によって測定される聴力低下前後 (4 週齢対 12 週齢) において聴覚上皮における DNA メチル化レベル、遺伝子発現量が同時に変化する遺伝子を定量的 PCR 法を用いて探索した。また DBA/2J マウスに対してエピジェネティクス調節剤を単独あるいは複数同時に投与し、聴力低下に対する影響、DNA メチル化レベル、遺伝子発現量を測定した。また免疫組織化学的、形態学的検討も行った。

4. 研究成果

DBA/2J マウスの聴覚上皮において、聴力低下に伴い、複数のゲノム領域のメチル化レベル変化がおきることを見出した。また、メチル化レベルが変化する領域の遺伝子の発現量について定量的かつ詳細な検討を進め、メチル化レベル変化に関連して有意に発現量変化する遺伝子を同定することに成功した。DNA メチル化酵素をはじめとするエピジェネティクス関連分子がラット、マウス、サルの聴覚上皮で発現していることを初めて明らかとし、この機構が哺乳類全般で聴覚機能の調節に関与していることを示唆した。

DBA/2J マウスに対し、エピジェネティクス制御剤を単独・あるいは組み合わせて投与し、聴力低下に対する抑制効果を検討した。複数のエピジェネティクスの主要酵素を調節することにより、低周波数・高周波数に対して、有意な聴力低下抑制効果を与えることに成功した。さらに遺伝子メチル化変化、発現量変化および形態的变化について検討を加えた。本研究は進行性・加齢性難聴の発症機構に、従来知られていなかったエピジェネティクスが関与していることを強く示唆するものであり、新規の加齢性難聴治療法開発へとつながる可能性をもつ。

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 8 件)

1 ***In silico* Modeling of the Pore Region of a KCNQ4 Missense Mutant from a Patient with Hearing Loss.** Namba K, Mutai H (equal contributor), Kaneko H, Hashimoto S, Matsunaga T. **BMC Research Notes.** 査読有 2012, 5: 145. PMID 22420747

2 A novel animal model of hearing loss caused by acute endoplasmic reticulum stress in the cochlea. Fujinami Y, Mutai H (equal contributor), Mizutari K, Nakagawa S, and Matsunaga T. **Journal of Pharmacological Sciences.** 査読有 2012, 118: 363-72. PMID 22362185

3 **Systematic analysis of mitochondrial genes associated with hearing loss in the**

Japanese population: dHPLC reveals a new candidate mutation. Mutai H, Kouike H, Teruya E, Takahashi-Kodomoari I, Kakishima H, Taiji H, Usami S, Okuyama T and Matsunaga T. **BMC Medical Genetics**. 査読有 2011, **12**:135. PMID 21989059

4 Late-phase recovery in the cochlear lateral wall following severe degeneration by acute energy failure. Mizutari K, Nakagawa S, Mutai H, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T. **Brain Res**. 査読有 2011 1419:1-11. PMID 21925650

5 Enhanced expression of C/EBP homologous protein (CHOP) precedes degeneration of fibrocytes in the lateral wall after acute cochlear mitochondrial dysfunction induced by 3-nitropropionic acid. Fujinami Y, Mutai H, Kamiya K, Mizutari K, Fujii M, Matsunaga T. **Neurochemistry International**. 査読有 2010 (56) 487-494, PMID 20026213

6 Promoted cell Proliferation by Connexin 30 Gene Transfection fo Head-and-Neck Cancer Cell Line. Ozawa H, Mutai H, Tatsuo Matsunaga T, Tokumaru Y, Fujii M, Sakamoto K, Tomita T, Ogawa K, **Anticancer Res**. 査読有 2009 (29) 1981-1986, PMID 19528455

7 Expression of Pou3f3/Brn-1 and its genomic methylation in developing auditory epithelium. Mutai H, Nagashima R, Sugitani Y, Noda T, Fujii M, Matsunaga T. **Develop. Neurobiol**. 査読有 2009 (69) 913-930, PMID 19743445

8 Mitotic activity and specification of fibrocyte subtypes in the developing rat cochlear lateral wall. Mutai H, Nagashima R, Fujii M, Matsunaga T. **Neuroscience** 査読有 2009 (163) 1255-1263, PMID 19660533

[学会発表] (計 8 件)

1 Shujiro Minami; Kazunori Namba; Hideki Mutai; Tatsuo Matsunaga. Genotype and Phenotype Correlation in GJB2 Mutations (DFNB1) and Structural Analysis of Non-Inactivating Mutations. 第35回北米耳鼻咽喉科学会 2012年2月25-29日 発表26日 サンディエゴ、米国.

2 務台英樹・泰地 秀信、宇佐美 真一、松永 達雄 dHPLC 法を用いた日本人難聴者におけるミトコンドリア遺伝子多型解析 第21回日本耳科学会総会 2011年11月24日-26日 発表24日 沖縄コンベンションセンター.

3 松永達雄、新正由紀子、山本聡、難波一徳、務台英樹、加我君孝温度感受性 Auditory Neuropathy における OTOF 遺伝子の新規特異的変異の同定第21回日本耳科学会総会 2011年11月24日-26日 発表24日 沖縄コンベンションセンター.

4 Hideki Mutai, Susumu Nakagawa Kazunori Namba, Masato Fujii, Tatsuo Matsunaga. Expression of *DNA methyltransferases (Dnmts)* in developing auditory epithelium and possible role for maintenance of hearing. 第34回 北米耳鼻咽喉科学会 2011年2月19日-23日 発表20日 バルチモア 米国

5 松永達雄、國島伸治、務台英樹、難波一徳、加我君孝 日本人小児 Auditory

Neuropathy における OTOF 遺伝子解析と治療法選択への活用 第 55 回人類遺伝学会 埼玉県さいたま市大宮区桜木町 1-7-5 2010 年 10 月 27 日-30 日発表 28 日 大宮ソニックシティ

6 務台英樹・藤井正人・松永達雄 聴覚発達・老化と関連する DNA メチル化修飾とメチル化酵素 Dnmt3a/3b の発現 第 20 回日本耳科学会総会 2010 年 10 月 7 日-9 日 発表 8 日 愛媛県ひめぎんホール

7 務台英樹、藤井正人、松永達雄 発達中および成熟個体聴覚上皮における DNA メチル化酵素 Dnmt3a/3b の発現 第 4 回 日本エピジェネティクス研究会年会 2010 年 5 月 28 日-29 日 発表 28 日 米子市文化ホール

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：難聴疾患の予防又は治療剤
発明者：務台英樹、松永達雄、藤井正人
権利者：国立病院機構
種類：特許
番号：2011-007581
出願年月日：2011 年 1 月 18 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 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

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 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：