

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861521

研究課題名(和文) ペンドレッド症候群モデルマウスの解析 - 内リンパイオン濃度と難聴の関係

研究課題名(英文) Mechanism of hearing loss in Pendred syndrome model knock-in mouse

## 研究代表者

野村 和弘 (NOMURA, Kazuhiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：60466563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Pendred症候群は難聴と甲状腺腫大をきたす常染色体劣性遺伝病である。Pendred症候群は原因遺伝子slc26a4の変異が原因で治療法は未だない。ヒトPendred症候群では幼少期には聴力が保たれているが、青年期以降に難聴が進行していく。よりヒトに近いモデル動物を解析することでPendred症候群の治療法の解明に近づくことができると考えた。日本人のPendred症候群で最も頻度が高いH723R遺伝子変異をもつノックインマウスを用いて難聴の起るメカニズムを研究した。生後4週では高度の頭部外傷および騒音難聴による内耳への影響は正常群とノックインマウス群で差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Pendred syndrome is a genetic disorder associated with hearing loss and thyroid hypertrophy. It inherits in autosomal recessive manner. Mutation of slc26a4 is the cause of Pendred syndrome. There is no treatment option for Pendred syndrome so far. In human Pendred syndrome patients, hearing is preserved in young age but deteriorates after adolescence. We speculated that analyzing not defect but point mutation of slc26a4 is the best way in animal model study. We used H723R point mutation, which is the most prevalent mutation in Japanese population, knock-in mouse to study the mechanism of hearing loss in Pendred syndrome. At the age of four weeks, there was no significant difference in hearing between wild type and knock-in mice after severe head trauma and noise exposure.

研究分野：内耳

キーワード：Pendred症候群 遺伝難聴 内耳生理 頭部外傷 音響外傷 加齢

1. 研究開始当初の背景

高度難聴児は、新生児 1,000 人に 1 人の割合で出生し、その半数が遺伝難聴と言われている。遺伝難聴では、GJB2 の変異が最も頻度が高いが、2 番目に多いのが Pendrin をコードする SLC26A4 の変異である。Pendrin は 780 アミノ酸残基からなる分子量 85.7kDa の膜タンパク質であり、12 回膜貫通領域を持っていると推定されている。Pendrin は主に内耳、甲状腺、および腎臓で発現しており、内耳では、内リンパ管、内リンパ嚢および蝸牛を構成している多様な細胞に発現している (図 1)。内耳における pendrin の役割は、Cl-/HCO<sub>3</sub>-の交換反応を行い、内リンパ液のイオン濃度の調整を行うことである。これまでの遺伝子解析により、この変異が前庭水管拡大を伴う非症候群性難聴もしくはペンドレッド症候群性難聴といった臨床像を呈することを明らかになっている。

Pendrin ノックアウトマウスは Pendrin タンパクが完全に欠損しており、生後から一貫して聾であった。対して、ヒトでは 150 種類以上の変異ペンドリンが報告され、日本人では 18 種類の point mutation がペンドレッド症候群の原因であり、聴力は若年時には保たれていることが多い。しかし、思春期頃から難聴が進行し、特に外傷を契機に聴力が増悪することが知られている。

そこで、よりヒトに近いモデル動物として、変異 SLC26A4 遺伝子をノックインすることで変異した pendrin タンパク質を発現しているマウス (ノックインマウス) が作製された。このノックインマウスはノックアウトマウスと異なり、生後聴力が保たれ、徐々に聴力が悪化するヒトのペンドレッド症候群の表現型と類似している。

2. 研究の目的

本研究では、SLC26A4 遺伝子変異による難聴発生メカニズムの解明とペンドレッド症候群モデルマウスにおける頭部外傷時に発生する難聴のメカニズムの解明 2 つを目標とする。

1 つ目の目標達成のため、SLC26A4 遺伝子変異型難聴モデルマウスの聴力、内耳形態、蝸牛機能の評価を行う。

2 つ目の目標達成のため、動物に機械的侵襲を加えた時の聴力、内耳形態、蝸牛機能の評価を行う。

3. 研究の方法

ヒト型 (Human cDNA を組み込んだもの) は繁殖可能であり、こちらを実験に使用した。聴力は若年時には野生型と差が無かったため、内耳に負荷をかけた状態での聴力の変化とその時の内耳組織の変化を測定するため、音響外傷時と頭部外傷時の聴力を ABR (聴性脳幹反応) と Rotarod (平衡機能を測定) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 音響外傷時 4 週齢

下記のプロトコルで音響外傷を与え、前後で聴力、前庭機能を測定した (図 1)。はじめに平衡機能 (Rotarod)、聴力 (ABR) を測定後 (図 2) 8-16kHz, 89dB SPL, 2 時間の音響外傷を与えた。音響は波形発生器 (SF-06 ランダムノイズ発生装置、リオン)、可聴周波増幅器 (D-75A、クラウン)、フィルター (NF Corporation) により作成した。音響はドームツイーター (2446H, JBL) により発生させた。騒音レベルは 2250L; Brüel & Kjær を用いて測定した。4 時間後に平衡機能と聴力を測定。7 日後に再度平衡機能と聴力を測定した (図 3,4)。

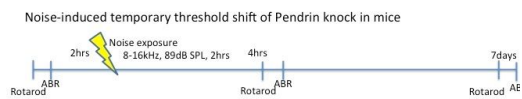


図 1 測定、音響外傷のプロトコル

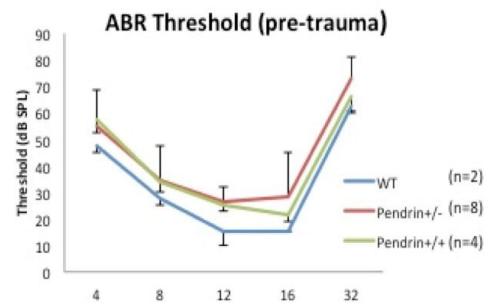


図 2 音響外傷前の聴力

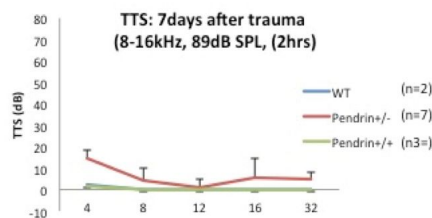
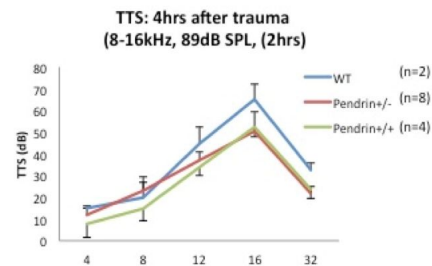


図 3 音響外傷 4 時間後と 7 日後の聴力変化

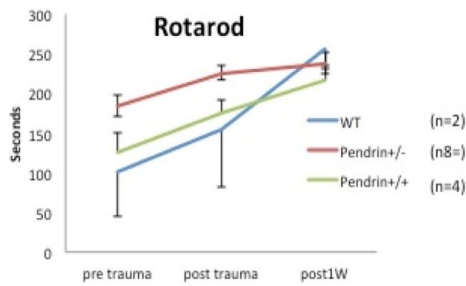


図4 前庭機能の変化、音響外傷前、直後、1週間後

結果：音響外傷7日後の測定では野生型、ヘテロ型、ホモ型間で聴力、平衡機能ともに差を認めなかった(図3,4)。

(2) 頭部外傷時 4週齢

下記のプロトコル(図5)で頭部外傷を与え、前後で聴力、前庭機能を測定した(図6,7,8)。

はじめに平衡機能(Rotarod)、聴力(ABR)を測定後(図6)、麻酔下に2cmの高さから333gの金属を自由落下させ頭部外傷を与えた。一定の力が係るようにマグネットスタンドを用いて装置を作成した。受傷4時間後に平衡機能と聴力を測定。7日後に再度平衡機能と聴力を測定した(図7,8)。

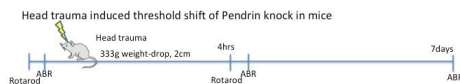


図5 測定、頭部外傷のプロトコル

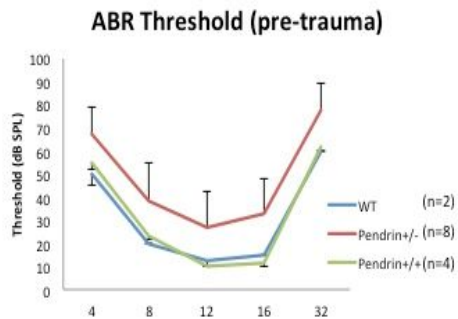


図6 頭部外傷前の聴力

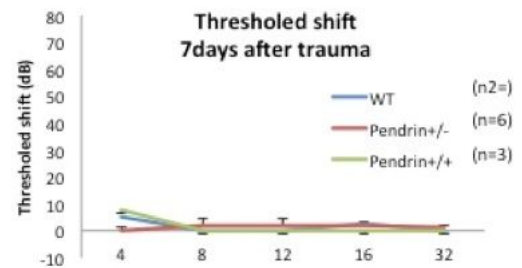
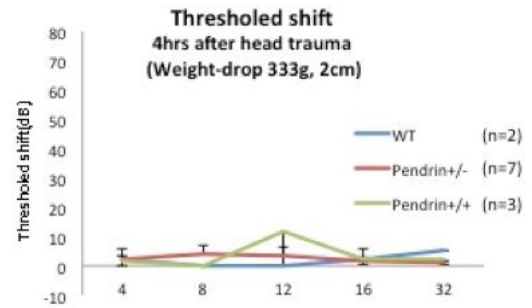


図7 音響外傷4時間後と7日後の聴力変化

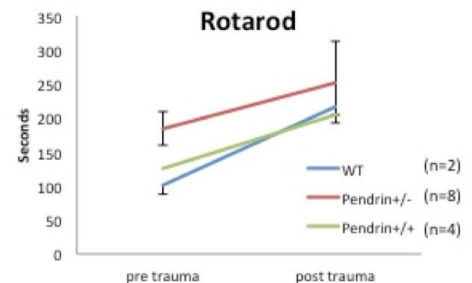


図8 前庭機能の変化、外傷前、外傷1週間後

結果：野生型、ヘテロ型、ホモ型で聴力、平衡機能ともに差を認めなかった(図7,8)。

考察：音響外傷、頭部外傷による内耳機能の変化を観察したが、野生型とPendrinノックインマウス間での聴力・前庭機能変化には差を認めなかった。ヒトでは思春期以降に聴力が悪化してくることから、今回測定したマウスの生後4週目という比較的若い段階ではまだ表現型が変化していない可能性が考えられた。

(3) 成年期以降の聴力変化

4週齢では内耳負荷時(音響外傷、頭部外傷)に野生型との差が認められなかった。ヒトでは加齢とともに聴力は増悪していくため、青年期以降でのPendrinノックインマウスの内耳負荷時の変化を確認すべきであると考えた。現在、マウスを繁殖・育成中である。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 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 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

野村 和弘 ( NOMURA, Kazuhiro )  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号: 60466563

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: