

## モデルマウスを用いた加齢性難聴感受性遺伝子の ポジショナルクローニング

●木南 凌 ◆若林 雄一

新潟大学大学院医歯学総合研究科

### 〈研究の目的と進め方〉

モデルマウスを利用し聴覚障害原因遺伝子を単離する。vn (niigata waltzer) マウスはICRマウスから突然変異により誕生した聴覚・平衡感覚障害を示す新しい変異マウスである。一方、jsマウスは古典的な難聴モデルマウスである。これらの変異を担う難聴原因遺伝子をポジショナルクローニング法で単離する。続いて、ヒト相同遺伝子を単離し、早期遺伝子診断法の開発、予防対策に貢献する。

先天性難聴とともに、加齢性難聴(AHL: age related hearing loss)感受性遺伝子を同定する。加齢性難聴は人類に最も多い慢性疾患の一つであり、遺伝的要因の存在が指摘されている。加齢と共に難聴を呈するマウス系統を利用し、連鎖解析により感受性遺伝子を単離する。現在知られているヒト先天性難聴原因遺伝子の約半分はマウスモデルのゲノム解析から単離されたものであり、聴覚障害ではマウスモデル解析がヒトのそれと直接対応するという特色がある。高齢者にみられる遺伝性難聴原因遺伝子をモデルマウスを用いて単離し、加齢に伴う聴力低下の診断、治療計画に貢献する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

先天性難聴原因遺伝子をポジショナルクローニング：①vnおよびjsマウスそれぞれを交配し、連鎖解析を行う。1000-2000頭の戻し交配マウスを作製する。連鎖解析から、候補領域を含むBACコンテイングを作製し、塩基配列決定後候補遺伝子を検索する。②候補遺伝子の全長のcDNA配列を決定し、ns変異マウス、js変異マウスでの変異を見つける。③cDNAクローンをもつベクターを作製し、遺伝子導入マウスを作製する。このマウスとnsマウス(またはjsマウス)を交配し、表現型すなわち難聴が回復されるかどうかを検討する。

加齢性難聴感受性遺伝子の同定：①B6マウスは10ヵ月齢で聴力低下を呈するが、MSMマウスは18ヵ月齢でも正常聴力を保持する。そこで、1本の染色体のみをB6マウスに置換したコンソミック系統を利用し、加齢性難聴感受性遺伝子の染色体マッピングを行う。聴力測定はABR法を用いる。染色体が特定された後はさらにコンジェニックマウスを作製し、ポジショナルクローニングを行う。②MSM/B6コンソミック系統をB6マウスに交配し、得られたマウスを対象にABRによる聴力測定と遺伝子型の決定を行う。解析マウス数は100頭で、聴覚測定期間は1年2ヵ月を予定している。さらに、独立のコンジェニックマウスを20系統作製しつつある。③の詳細な連鎖解析の結果を参考にし、関心領域を含むコンジェニック系統のABR測定を行う。両解析から候補遺伝子座領域は2cM-10cMの間に限定されると予想される。同時に、コルチ器官および蝸牛神経細胞、有毛細胞の顕微鏡観察を行う。④ハプロタイプ解析を行う。候補領域のSNPs(一塩基多型)を検索し、加齢性難聴を示す系統(B6, ICR, など)と加齢性難聴を示さない系統(MSM, C3Hなど)のハプロタイプを決定する。ハプロタイプの保存領域は領域に

よって異なるが、候補領域を1 Mb以内にまで限定されると予想している。⑤候補感受性遺伝子を単離、同定する。(1)候補遺伝子の検索と多型(DNA変異)の検索。データベース上で候補領域に存在する遺伝子を検索する。個々の候補遺伝子の内耳、神経節での発現をRT-PCR法で調べ、発現遺伝子について遺伝子多型、変異の有無を検索し、原因遺伝子を同定する。(2)候補遺伝子を含むBACクローンをマイクロインジェクションによりB6個体に導入し、6ヶ月飼育後、経時的にABRにより聴力を測定し、表現型の回復を確認する。

### 〈研究期間の成果〉

1.モデルマウスを用いた聴覚障害原因遺伝子のポジショナルクローニング：vn (niigata waltzer) マウスはICRマウスから突然変異により誕生した聴覚・平衡感覚障害を示す新しい変異マウスである。このモデルマウスを利用し、聴覚障害原因遺伝子をポジショナルクローニング法で単離した。

ホモのMSMマウスをvnマウスに戻し交配し、1700個体を得た。マウス全染色体上のマーカーを用い、これらの戻し交配個体について連鎖解析を行った。その結果、第10番染色体上のD10Mit258付近にvn座の存在することが明らかとなった。さらに第10番染色体上のマーカーを用いて連鎖解析を行ったところ、vn遺伝子座はD10Mit59からD10Mit258までの2.67cMの範囲に存在することが明らかとなった。この領域にはすでにwaltzer(v)変異がマップされていたので、その異なった変異アレルをもつマウスであると想像された。そこで、vn変異マウスとwaltzer(v)変異マウスを交配し、ダブルヘテロマウスでの発症を検討した。この相補性テストでの発症が確認され、vn変異とwaltzer(v)変異はallelicであることが分かった。

物理地図をYAC, BACクローンをを用いて作成し、さらに詳細な連鎖解析を行ったところ、非組換え領域は二つのBACクローンで完全にカバーされていた。これらの二つのクローンについてランダム塩基配列決定を行い、遺伝子・エクソンを検索した結果、一つの候補としてカドヘリン様遺伝子が見つかった。そこで、vnマウスcDNAを単離し、塩基配列決定を行うと、カドヘリン・Cdh23遺伝子にフレームシフト変異を検出した。それは146番目のGがvnマウスでは欠失することによる。さらにゲノムDNAを調べたところ、この一塩基の欠失はイントロン2の3'側のAG部位のGがAに置換することにより生ずることがわかった(その結果、AAGとなる)。これによりカドヘリン23遺伝子がvnマウスの変異の原因遺伝子であることが判明した。論文投稿の準備中に、アメリカのグループからv変異の原因遺伝子としてカドヘリンCdh23をクローン化したという報告があった。また、ヒトの難聴遺伝子であることも確かめられていた。我々の論文はその2ヵ月後に発表され、同様の報告がその後異なる2グループからからも報告され(HMG, AJHG)、カドヘリンCdh23が聴覚障害原因遺伝子であることが確定した。

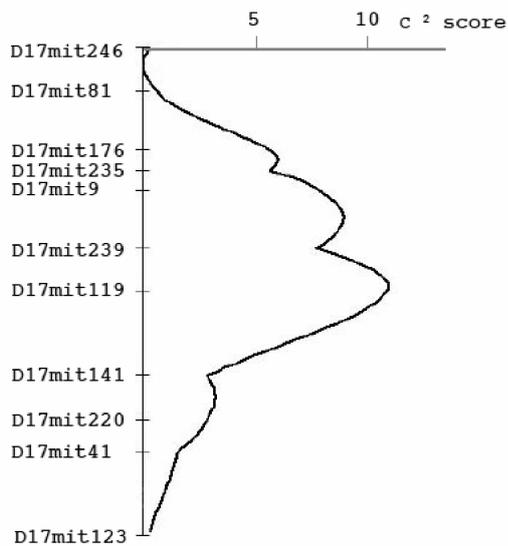


図1 新規ahl遺伝子座のQTL解析:マウス第17番染色体のコンソミックマウスとB6マウスを交配し、そのプロジェニーについて、加齢性難聴と遺伝子座との相関を遺伝解析した。D17Mit119座に有意なピークがみられる。

jsマウスは古くから存在する遺伝性聴覚障害モデルである。js遺伝子のゲノム解析、ポジショナルクローニングについては計画通りに進展し、原因遺伝子・Sansを単離した(吉川ら、Human Molecular Genetics, 2003)。これは日本発の特記すべき成果である。SansはAnkyrinリポーターとSAMドメインをもつ新規蛋白をコードする遺伝子であり、jsマウスにのみフレームシフト変異が観察された。Jsに対応するヒト疾患はUsher IG型症候群で、この患者DNAにもSansに変異が見られており、ヒト疾患の診断への貢献が実現されている。

## 2. モデルマウスを用いた加齢性難聴原因遺伝子のポジショナルクローニング

(1)コンソミック系統を利用した遺伝解析:コンソミック系統(consomic mouse strains)は、背景マウスにドナーマウスから1本の染色体のみを置換したマウス系統である。我々が利用してきたコンソミック系統はドナーマウスとしてMSM系統、背景マウスとしてB6系統を用いたものである(作製者、城石、米川)。このコンソミック系統を用いた加齢性難聴感受性遺伝子(ahl)の遺伝解析系の立ち上げ準備から行った。B6マウスは生後8カ月以内では顕著な聴力低下は認められないが、生後10カ月齢以降になると90dB以上の高度難聴を示す。一方、MSMは聴力低下を18カ月齢でも示さない。作製されたコンソミック系統、すなわち染色体1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 13, 15, 17および19のコンソミック系統について各々2カ月ごとに聴力測定をした。その結果、1番、2番6番および17番染色体番が置換したマウス系統は1年を経過しても難聴を示さないことが分かった。すなわち、これらの染色体上に加齢性難聴感受性遺伝子が存在する。その中でも、17番染色体を置換した系統がもっとも難聴を抑制する効果の強いことから、17番染色体上の遺伝子を単離することにした。そこで、17番コンソミックマウス(ヘテロ型)とB6を交配し、17番染色体上の11のマーカー座と難聴の連鎖解析を行った。21頭のB6由来の17番染色体(B/B)をもつ個体、25頭のMSM由来(B/M)の17番染色体をもつ個体、43頭の

17番染色体上の組み換え体が得られた。組み換え体のみ、6ヶ月齢と12ヶ月齢でABRで聴力を測定したところ、12ヶ月齢で各個体の聴力に明らかな相違がみられた。そこで、この時点での聴力閾値が45dB以下のAHL陰性群(n=29)と、50dB以上のAHL陽性群(n=14)にわけ、MapManagerを用いたQTLマッピングを行った。その結果、D17Mit119に連鎖のピークを示した(図1参照)。これはD17Mit119近傍にAHLに感受性(抵抗性)遺伝子の存在を示唆するものである(Nemoto et al. 2004)。現在まで、加齢性難聴を引き起こす感受性遺伝子座はマウス第10番、第5番にマップされ、それぞれahl, ahl2とよばれている。そこで、新しい17番染色体上の感受性遺伝子をahl3と名付けた。最近、ahlの本体がChd23であるという報告があった(Johnson et al. 2002)。

(2)形態学的観察:加齢マウスのコルチ器、ラセン神経節および有毛細胞の形態を光学・走査顕微鏡を用いて観察した。20ヶ月齢17番コンソミック(閾値30dB)では軽度の有毛細胞の脱落がみられたが、コルチ器の構造は保たれていた。また、ラセン神経節細胞密度は若年B6に比し低下しているものの、12ヶ月齢B6マウスよりも保たれていた。一方、20ヶ月齢13番コンソミック(高度難聴)では、外有毛細胞の脱落、変性は顕著であったが、コルチ器の構造は保たれラセン神経節の細胞密度は17番と同程度という予想外の結果であった。走査電子顕微鏡で17番コンソミックマウスの内耳の形態を、MSM、B6、13番コンソミックマウスと比較、観察した。12ヶ月齢のB6と16ヶ月齢の13番コンソミックマウスでは聴毛の変形と有毛細胞の部分的脱落が観察されたが、16ヶ月齢のMSMと17番コンソミックマウスではこのような変化は観察されなかった。これらの変化は先天性難聴を呈する変異マウスにも観察され、17番コンソミックマウスで観察された内耳有毛細胞の形態維持は優れた聴力の保持と関連するものと考えられた。

以上より、新しい加齢性難聴感受性遺伝子(Ahl3)をもつマウスは生後一年を経過すると、ABR閾値の上昇と内耳有毛細胞の形態的異常が観察されることが明らかになった。Ahl3は加齢に伴った難聴の進行を抑制する機能をもつと考えられる。

(3)新しい解析系の検討:ICR系統が早期にすなわち、生後3-6カ月に高度難聴を示すことが分かった。その内耳を調べると、有毛細胞の欠落が観察された。しかし、現存する純系のICR系統はそのような高度加齢性難聴を示さないことが判明し、さらに解析を加えるのを中止した。

(4)コンジェニックマウスの作製と解析:コンソミックマウスをB6に戻した交配個体から、17番コンジェニックマウスを順次作製し、最終的には20系統作製した。まず、9種類のコンジェニックマウスが完成して、各5頭以上作製して、加齢性難聴との関連性を検討した。使用したマーカーはセントロメア側よりmit246(0cM,7.5Mb)、mit81(5.5cM,29.6Mb)、mit176(12.0cM,40.9Mb)、mit235(18.6cM,44.5Mb)、mit9(25.1cM,49.4Mb)、mit119(33.9cM,65.3Mb)、mit220(40.4cM,77.1Mb)、mit41(47cM,80.5Mb)、mit123(50.3cM,92.0Mb)の9種類である。得られた9種類のコンジェニックマウス系統で、MSM由来の領域は13Mbから73Mbであり、それぞれが重複しない領域は最短で3.4Mb、もっとも長い領域は20.2Mbある。今後の解析がやり易いように、できるかぎり2-10Mb程度の領域に狭める方針である。順次ABRを測定、解析を進めている。はじめに作製された約80頭のマウスは6、12、14か月齢での測定終了、遅れて作製された約100頭は6か月齢での測定を終了している。MSMマ

ウスから1本の染色体をB6マウスに置換したコンソミック系統の聴力をABRで測定した。

(5)騒音性難聴感受性の解析：マウス10番染色体上の加齢性難聴感受性遺伝子・ahl-1は騒音性難聴（音響外傷）感受性遺伝子でもあるとの報告があり、加齢性難聴と騒音性難聴の関連性が注目されている。騒音性難聴感受性遺伝子が単離されると、感音難聴のメカニズムの一部が解明でき、加齢に伴う聴力低下の診断、騒音作業等者の聴覚管理、治療計画に貢献が期待される。そこで、ahl3をもつ17番コンソミックマウスを用い、そのは騒音性難聴（音響外傷）感受性の有無を検討した。10週齢のマウスに音響外傷実験・ABR測定（後述）を行った結果、ahl3もやはり騒音性難聴（音響外傷）感受性を担う遺伝子であることが分かった。

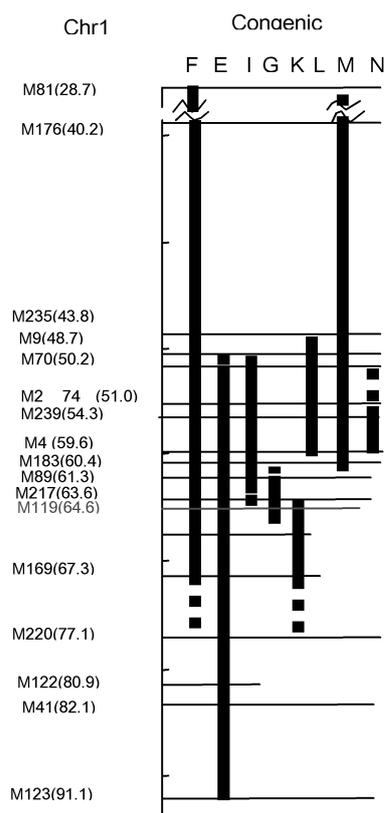


図2 ahl3遺伝子単離のために作製されたコンジェニックマウスと騒音性難聴感受性遺伝子座：音響外傷実験から、騒音性難聴感受性遺伝子はD17Mit70座からD17Mit89座までの領域に存在することが明らかになった。

①音響外傷実験系の確立：自作の音響外傷装置を用いて、異なった周波数と異なった音圧の純音（持続音）を当てることが可能となり、適切な音響外傷実験の条件を検討した。その結果、10kHzの周波数、100dBの音圧を標準として用いるのが最適と判断された。一方、ABRを用いた聴力測定の周波数は4、8、10、16、20、32kHzを用いてきたが、16kHzのみの測定で十分聴力経過が測定できることが分かった。測定日は、音刺激前（コントロールとして使用）および暴露後1日、3日、7日、14日にABR測定を行ってきた。今後は測定をもっと簡単に（16kHzに限り、刺激前、1日、3日後のみの計測）できると考えている。

②得られた10種類のコンジェニックマウス系統で、MSM由来の領域は13Mbから73Mbであり、マッピング情報を与える最短領域は3.4Mb、もっとも長い領域は10.2Mbで

ある。ahl3座を含む約10Mb領域をMSMゲノムに由来するコンジェニックマウスでは聴力低下は認められず、少なくともこの領域に騒音性難聴（加齢性難聴）感受性が存在することが分かった。現在、これらの系統から、音響外傷実験に利用するためのさらに詳細なコンジェニック系統（図2参照）を作製中である。

③マウス系統の種類によって騒音性難聴（音響外傷）感受性に差のあることが報告されているが、それを我々の系で確かめてみた。用いたのは、代表的なB6、BALB/c、CBAの3系統である。結果は、B6>BALB/c>>CBA、という順に音響外傷感受性が大きかった。これは文献どおりであり、遺伝的背景の違いにより音響外傷感受性が異なることが我々の実験系でも確認された。

④B6マウスを対象に種々の音響条件を検討した。10kHzの純音を用いて、音の大きさを90、100、110、120dBと変化させ各1時間ずつ音を当てた。また、110dBでは音刺激時間を30分および1時間で検討した。実験①の結果とあわせて検討した結果、100dBの音圧で、1時間刺激が適当と判断された。

⑤17番コンジェニックマウスを用いて、音響外傷実験を行った。10kHz-100dBの純音を1時間暴露し、親系統のB6マウスとコンジェニックマウスを比較した。16kHzで聴力を測定すると、B6マウスでは14日後も60dB程度のPTS（permanent threshold shift）を示すのに対して、17番コンジェニックマウスは1日目に60dB程度のTTS（temporary threshold shift）を示すが、3日後には聴力が回復した。この結果から17番染色体上に騒音性難聴（音響外傷）感受性遺伝子が存在すると考えられる。3種類のコンジェニックマウス（図2：系統E、F、I）を用いて得られた騒音性難聴感受性遺伝子座の位置（Mit119近傍）は、加齢性難聴感受性遺伝子ahl3とよく一致し、騒音性難聴感受性遺伝子と加齢性難聴感受性遺伝子ahl3はおそらく同一の遺伝子であろうと考えている。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

先天性難聴遺伝子の単離は進展し、現在まで約50の遺伝子が単離されているが、加齢性および騒音性難聴に焦点を絞った研究は少ない。わずかに加齢性難聴を引き起こす原因遺伝子座(ahl)がマウス第10染色体に同定されたこと（1997）、ミトコンドリア因子がそれを修飾する（2001）ということ、最近このahlの本体がChd23である（Johnson et al. 2002）という報告があるのみである。今後の研究が期待されている。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初計画にあったjs遺伝子座を導入し、難聴発症時期を早める系の導入は途中で中止した。その理由は研究経過のなかで必要のないことが明らかとなったからである。第2の問題点は、個体によりABR測定にばらつきのあることである。現在、交配したN1世代マウスを対象に遺伝解析を進めているが、ばらつきがあるため詳細なコンジェニックマウスを作製し、同じ遺伝的背景をもつ複数・多数個体での解析が必要となる可能性が大いにある。最後にマウスの交配に時間のかかること、である。

#### 〈今後の課題〉

17番染色体上にある加齢性難聴原因遺伝子座(ahl-3)は、高密度マッピングの結果、数Mbレベルにまで限定されている。もう1-2頭のコンジェニックマウス系統の作製と解析で、候補遺伝子の検索に進める。その努力を行っているところである。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 670

Kikkawa, Y., Mburu, P., Morse, S., Kominami, R., Townsend, S., and Brown, SD., Mutant analysis reveals whirlin as a dynamic organizer in the growing hair cell stereocilium, *Hum. Mol. Genet*, 14, 391-400 (2005).

2. 670

Nemoto, M., Morita, Y., Mishima, Y., Takahashi, S., Nomura, T., Ushiki, T., Shiroishi, T., Kikkawa, Y., Yonekawa H., and Kominami. R., Ahl3, a third locus on mouse chromosome 17 affecting age-related hearing loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 324,1283-1288 (2004).

3. 670

Kikkawa, Y., Shitara, H., Wakana, S., Kohara, Y., Takada, T., Okamoto, M., Taya, C., Kamiya, K., Yoshikawa, Y., Tokano, H., Kitamura, K., Shimizu, K., Wakabayashi, Y., Shiroishi, T., Kominami, R., and Yonekawa. H., Mutations in a new scaffold protein Sans cause deafness in Jackson shaker mice, *Hum. Mol. Genet*, 12, 453-461 (2003).

4. 670

Wada, T., Wakabayashi, Y., Takahashi, S., Ushiki, T., Kikkawa, Y., Yonekawa, H., and Kominami, R., A point mutation in a cadherin gene, *Cdh23*, causes deafness in a novel mutant, *Waltzer Mouse Niigata*, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 283, 113-117 (2001).