

厚生科学研究研究費補助金

感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究
(H10-感覚器-010)

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 喜多村 健

平成 13 (2001) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究-----	1
喜多村 健	
II. 分担研究報告書	
1. 分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究-----	7
喜多村 健	
2. 分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究-----	11
川上 潔	
3. 分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究-----	14
米川 博通	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	19

総括研究報告書

分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

主任研究者 喜多村 健 東京医科歯科大学教授

研究要旨 ホメオボックス遺伝子変異が疑われる内耳奇形マウスの難聴を検出し、内耳組織学的検索で血管条の萎縮を同定した。内耳発生時期に感覚細胞消失と内リンパ嚢拡大を呈する PDS 遺伝子変異を、前庭水管拡大症症例において同定した。耳の発生分化に重要な Six 遺伝子群の生体機能および BOR 症候群の原因遺伝子産物 Eya1 蛋白質の変異による機能の欠陥を解析した。内耳奇形マウスのジャクソンシェーカーの候補遺伝子としてキネシン遺伝子変異を同定し、内耳内の発現を観察した。

分担研究者

川上 潔 自治医科大学・教授
米川博通 東京都臨床研究所
副所長

A. 研究目的

感音難聴の発症機構を分子細胞レベルにて解明し、難聴者の難聴改善を発症機構の観点から模索する。そのために、難聴者を対象にして、新たな難聴遺伝子を同定する。また、分子モーター遺伝子と耳の発生に関与するホメオボックス遺伝子の変異の有無、難聴発症前の症例においては遺伝子診断を行う。さらに、実験動物モデルにおいて分子モーターならびにホメオボックス遺伝子機能を解析し、分子モーター障害による難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成

のメカニズムを解明する。側頭骨病理の検索を行う。実験動物モデルにおいて、難聴遺伝子の同定を行い、難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを解明する。

Six 遺伝子および Eya 遺伝子の耳の発生における役割とその分子機能を明らかにする為に、Six4 遺伝子破壊マウスの解析と、Eya1 遺伝子の変異による Eya1 蛋白質の機能の異常を明らかにする。

ジャクソンシェーカー（Jackson shaker: js）マウスの聴覚障害の原因の候補遺伝子としてキネシン様タンパク質 DAK（Deafness-Associated Kinesin）の異常とヒト聴覚障害発症との関わりについて解析を行う。

B. 研究方法

原因不明の感音難聴症例、遺伝性非

症候群性感音難聴家系の難聴者ならびに血縁者で協力が得られる症例を対象とし難聴遺伝子の同定を行う。対象症例からは、所属施設の倫理審査委員会より、承認を得ているインフォームドコンセントを書面で得た後に、ゲノム DNA を採取する。実験動物を用いた研究は、所属の実験動物センターの承認を得て施行されている。

ミトコンドリア 3243 変異症例である MELAS の剖検時に得られた側頭骨標本において、ミトコンドリア遺伝子変異と側頭骨病理を検討する。

C57/C3H 系統の LacZ をレポーターとしたトランスジェニックマウスと C57 の交配より得られた新しい内耳奇形マウス Zfc-02 の ABR を計測した。

Six4 遺伝子ノックアウトマウスの胎仔および成体について、形態的観察、聴力検査およびマーカ遺伝子の発現の解析を行った。また、BOR 症候群および白内障を発症する患者で同定された EYA1 遺伝子の変異をマウス Eyal 遺伝子に導入し、Six および Dach との相互作用や、転写活性化能について、検証した。

DAK 特異的なアミノ酸配列を標的にペプチド抗体を作製した。これを用いてマウス各組織に対するウェスタンブロットティングおよび蝸牛管の免疫染色を行った。

ヒトの 17 番染色体 17q25 へ優性遺伝様式を示す非症候群性難聴が新たにマップされており、この聴覚障害と DAK との関連性を Stanford G3 および TNG Radiation hybrid (RH) panel を

用いた DAK のヒト染色体へのマッピングおよびシーケンシングによる突然変異の探索を行った。

C. 研究結果

ミトコンドリア遺伝子変異は、母系遺伝が想定される遺伝性難聴家系ならびに遺伝性の要因は明らかでない弧発性の原因不明の感音難聴症例にて同定された。コネキシン 26 遺伝子変異は、両側性の原因不明の感音難聴症例にて同定された。

MELAS 症候群の側頭骨組織からミトコンドリア遺伝子変異 3243 を検出し、内耳組織間の変異ミトコンドリア遺伝子の頻度を計測し、脳組織、末梢血、脾臓と比較して変異ミトコンドリア遺伝子の比率が内耳で高頻度であった。病理組織学的研究では、内耳組織のみならず脳幹の聴覚経路の病変を同定した。

耳石障害と内リンパ嚢の拡大による反復性めまい発作が主症状である、前庭水管拡大症の PDS 遺伝子変異を明らかにした。

内耳奇形マウス Zfc-02 ホモ接合体は、顔が平たく体躯が小さいという表現型であった。また、著しい回転行動を呈した。ABR はホモ接合体では反応を認めず、ヘテロ接合体はコントロールに比べ 20 から 30dB 程度の、聴覚閾値の上昇を認めた。

脳神経節や耳胞の発生過程で特異的発現のみられる Six4 遺伝子破壊マウスはホモ個体も生存可能であった。耳の形態や聴力については、異常がみ

られなかった。また、各神経節や、筋肉における特異的マーカー遺伝子 (neuroD1、Myogenin など) の発現を野生型とホモ個体で比較したところ、差が認められなかった。EYA1 の変異のうち S454P と L472R 及び R307X は Six、Dach や G 蛋白質との相互作用に欠損がみられた。

DAK の発現の検索では、内有毛および外有毛細胞さらに外柱細胞に強く発現が認められ、さらに蝸牛神経細胞にも発現が認められた。一方、DAK の突然変異による聴覚障害が予想される js マウスにおいても同様の解析を試みた結果、その発現は明らかに低下していた。ヒト聴覚障害 DFNA20 は第 17 番染色体 D17S836 (114.4cM)-D17S668 (126.5cM)間にマップされており、DAK はその 10cM 以上セントロメア側にマップされた。さらに、DAK において DFNA20 患者の突然変異を探索した結果、蛋白コード領域に変異は認められなかった。

D. 考察

前庭水管拡大症例で同定された PDS 遺伝子変異は、内耳発生時期に多くの転写因子と協同発現すると予想されている。また、ノックアウトマウスでは、感覚細胞消失、耳石形成障害、内リンパ嚢拡大がみられている。したがって、転写ならびにホメオボックス遺伝子と共に内耳発生、分化に深く関与していると予想される。

MELAS 症候群の側頭骨組織から検出されたミトコンドリア遺伝子変異 3243 は、内耳細胞にて高頻度に認められ、内耳病変との密接な関連を同定し

た。同症例の病理組織学的研究では、内耳組織のみならず脳幹の聴覚経路の病変も認め、系統疾患としての特徴もみられた。今回対象とした内耳奇形マウス Zfc-02 の原因遺伝子は、顔貌、体幹の表現型にも異常を認め、ホメオボックス遺伝子の変異が疑われる。

Six4 遺伝子の遺伝子破壊マウスに表現型が見られないのは、ほかの Six 遺伝子 Six1、Six2、Six5 などとの機能重複が原因である可能性が高い。それらを検証するために、Six1/Six4 および Six4/Six5 の二重変異マウスを作成することとした。Eya ドメインに存在する多くの点突然変異のうち、Six および Dach との相互作用が欠損しているものが同定された。分子機能の変異による、耳の形成異常が生じる機構を解析する糸口になることが期待される。

キネシン様蛋白 DAK の遺伝子座近傍に難聴遺伝子の存在が推定されている症例では、蛋白コード領域に変異は認められなかったが、DAK がヒト難聴の原因遺伝子でもある可能性を示唆できた。

E. 結論

内耳発生時期に発現すると想定されている PDS 遺伝子変異を、前庭水管拡大症例において同定した。原因不明感音難聴症例からミトコンドリア遺伝子 1555 変異、コネキシン 26 遺伝子変異を同定し、MELAS 症候群の側頭骨組織から高率のミトコンドリア遺伝子変異 3243 を内耳細胞で検出した。

Six 遺伝子群には機能重複の存在が

示唆された。

ヒト聴覚障害モデルであるジャクソンシェーカー(Jackson shaker: js)マウスの聴覚障害の原因となる候補遺伝子として DAK (Deafness-Associated Kinesin)を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takago H, Yokoyama K, Kitamura K: A vasoactive agent enhances the effect of ATP on cochlear blood flow. Acta Otolaryngol(Stockh) (in press)
2. Ozaki H, Watanabe Y, Takahashi K, Kitamura K, Tanaka A, Urase K, Momoi T, Sudo K, Sakagami J, Asano M, Iwakura Y, Kawakami K : *Six4*, a putative *myogenin* gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. Mol Cell Biol (in press)
3. Kamiya K, Takahashi K, Kitamura K, Momoi T, Yoshikawa Y : Mitosis and apoptosis in postnatal auditory system of the C3H/He strain. Brain Res (in press)
4. Kitamura K, Takahashi K, Tamagawa Y, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Ishikawa K, Hagiwara H : Deafness Genes. J Med Dent Sci 47:1-11, 2000
5. Kitamura K : Neurofibromatosis 2. Kitamura K, Steel KP(eds) : Genetics in Otorhinolaryngology. Adv Otorhinolaryngology 56 : 244-248, 2000
6. Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Nishizawa M, Xue-Zhong Liu, James Walsh, Karen P. Steel, Steve D.M. Brown: Sensorineural Hearing Impairment, Non-Syndromic, Dominant DFNA11. Kitamura K, Steel KP (eds): Genetics in Otorhinolaryngology. Adv Otorhinolaryngology 56: 103-106, 2000
7. Kitamura K, Steel KP(eds) : Genetics in Otorhinolaryngology. Adv Otorhinolaryngology 56, 2000
8. Kitamura K, Takahashi K, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Tamagawa Y, Ishikawa K, Ichimura K, Hagiwara H : Mutations of the Pendred syndrome gene(PDS) in patients with large vestibular aqueduct. Acta Otolaryngol (Stockh) 120 : 137-141, 2000
9. Iwasaki S, Tamagawa Y, Ocho S, Hoshino T, Kitamura K: Hereditary sensorineural hearing loss of unknown cause involving mitochondrial DNA 1555 mutation. ORL 62 : 100-103, 2000
10. Sakai O, Curtin H, Fujita A, Kakoi H, Kitamura K : Otosclerosis : Computed tomography and Magnetic Resonance imaging. Am J Otolaryngol 21 : 116-118, 2000
11. Kanazawa T, Hagiwara H, Kitamura K, Labyrinthine involvement and multiple perforations of the tympanic membrane due to group A streptococcal acute otitis media. J Laryngol Otol 114 : 47-49, 2000
12. Hagiwara H, Kanazawa T, Ishikawa K, Fujii T, Kitamura K, Noguchi Y, Iino Y : Invasive verrucous carcinoma : a bone histopathology report. Auris Nasus Larynx 27 : 179-183, 2000

13. Muto, S., Nemoto, J., Okada, K., Miyata, Y., Kawakami, K., Saito, T., and Asano Y.: "Intracellular Na⁺ directly Modulates Na⁺, K⁺-ATPase gene expression in Normal rat kidney epithelial cells." *Kidney Int.*, 57, 1617-1635 (2000)
14. Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, and Ikeda, K.: "Six family genes-Structure and function as transcription factors and their roles in development." *BioEssays* 22, 616-626 (2000)
15. Kobayashi, M., Osanai, H., Kawakami, K., and Yamamoto, M.: "Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites." *Mech. Dev.* 98, 151-155 (2000)
16. Kawakami, K.: "Transcriptional regulation of Na,K-ATPase alpha 1 subunit gene." In: "Control and diseases of sodium dependent transport proteins and ion channel", Y. Suketa, E. Calafiori, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada, and E. M. Wright. (eds). pp.27-30, Elsevier, (2000)
17. Ozaki, H., Watanabe, Y., Takahashi, K., Kitamura, K., Tanaka, A., Urase, K., Momoi, T., Sudo, K., Sakagami, J., Asano, M., Iwakura, Y. and Kawakami, K.: "Six4, a putative myogenin gene regulator, is dispensable for mouse embryonal development." *Mol. Cell. Biol.* in press (2001)
18. Wada T, Wakabayashi Y, Takahashi S, Ushiki T, Kikkawa Y, Yonekawa H, Kominami R: A point mutation in a cadherin gene, Cdh23, causes deafness is a novel mutant , waltzer mouse Niigata (submitted)
2. 学会発表
1. 喜多村 健:難聴遺伝子 第9回奈良県耳鼻咽喉科感覚医学研究会 平成12年4月15日
2. 喜多村 健:難聴と遺伝子 足立区耳鼻咽喉科医会学術講演会 東京. 平成12年10月28日
3. 喜多村 健:メニエール病の診断. 第59回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 教育セミナー 東京, 2000年12月1日
4. 喜多村 健:難聴と遺伝子. 順天堂大学耳鼻咽喉科学教室学術集会 順天堂大学 2001年3月14日
5. 黒石川泰, 野口佳裕, 喜多村 健: 難聴遺伝子診断のためのインフォームドコンセントーミレニアムプロジェクト等の答申を受けてー. 厚生省特定疾患対策研究事業 前庭機能異常調査研究班、急性高度難聴調査研究班 平成12年度合同総会 2001年1月14日 東京
6. 戸叶尚史, 岡村洋沖, 喜多村 健, 野瀬俊明: 内耳奇形マウス (Zfc-02) の聴覚行動異常について. 厚生省特定疾患対策研究事業 前庭機能異常調査研究班、急性高度難聴調査研究班 平成12年度合同総会 2001年1月14日 東京

7. 岡村洋沖、喜多村 健：内耳発育過程における水チャネルー Aquaporin の発現と消退について一。厚生省特定疾患対策研究事業 前庭機能異常調査研究班、急性高度難聴調査研究班 平成12年度合同総会 2001年1月14日 東京
8. 田中亨、川上潔、吉田浩己、深山正久：アンドロゲン依存性癌増殖における FGF8 と第 89 回日本病理学会総会、大阪、2000 年 4 月 11-13 日。
9. 田中亨、川上潔、吉田浩己、深山正久：アンドロゲン依存性癌増殖における FGF8 とサイクリン D1 の相互誘導機能。第 73 回日本内分泌学会学術総会、京都、2000 年 6 月 16-18 日。
10. Ikeda, K. and Kawakami, K. : Analysis of Eya co-activator complex. 4th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, August 26-30, 2000. (Abstracts p.145)
11. Kawakami, K. and Sato, S. : Target genes of Six proteins. 4th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, August 26-30, 2000. (Abstracts p.158)
12. Kawakami, K., Ozaki, H., Sato, S., Ikeda, K. : Evolution and function of Six family genes. The Sixth Asian Conference on Transcription, Beijing, October 23-27, 2000. (Abstracts p.15)
13. 尾崎秀徳、渡辺陽子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、川上潔：ホメオボックス遺伝子 Six4 欠損マウスの解析。第 23 回日本分子生物学会年会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日。(プログラム・講演要旨集 p.737)
14. 和田匡史、若林雄一、牛木辰男、米川博通、小南 凌：先天性聴覚障害モデルマウス (ns) 遺伝子座近傍の物理地図作製。第 23 回日本分子生物学会年会 2000. 12.13-16、神戸
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び・免疫アレルギー等研究事業）

分担研究報告書

分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

主任研究者 喜多村 健 東京医科歯科大学教授

研究要旨 内耳発生時期に感覚細胞消失と内リンパ嚢拡大を呈する PDS 遺伝子変異を、前庭水管拡大症症例において同定した。原因不明感音難聴症例からミトコンドリア遺伝子 1555 変異、コネキシン 26 遺伝子変異を同定し、MELAS 症候群の側頭骨組織から高率のミトコンドリア遺伝子変異 3243 を内耳細胞で検出した。ホメオボックス遺伝子変異が疑われる内耳奇形マウスの難聴を検出し、内耳組織学的検索で血管条の萎縮を同定した。

A. 研究目的

感音難聴の発症機構を分子細胞レベルにて解明し、難聴者の難聴改善を発症機構の観点から模索する。そのために、難聴者を対象にして、新たな難聴遺伝子を同定する。また、分子モーター遺伝子と耳の発生に関与するホメオボックス遺伝子の変異の有無、難聴発症前の症例においては遺伝子診断を行う。さらに、実験動物モデルにおいて分子モーターならびにホメオボックス遺伝子機能を解析し、分子モーター障害による難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを解明する。側頭骨病理の検索を行う。実験動物モデルにおいて、難聴遺伝子の同定を行い、難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを解明する。

B. 研究方法

原因不明の感音難聴症例、遺伝性非症候群性感音難聴家系の難聴者ならびに血縁者で協力が得られる症例を対象とし難聴遺伝子の同定を行う。対象症例からは、所属施設の倫理審査委員会より、承認を得ているインフォームドコンセントを書面で得た後に、ゲノム DNA を採取する。実験動物を用いた研究は、所属の実験動物センターの承認を得て施行されている。

ミトコンドリア 3243 変異症例である MELAS の剖検時に得られた側頭骨標本において、ミトコンドリア遺伝子変異と側頭骨病理を検討する。

C57/C3H 系統の LacZ をレポーターとしたトランスジェニックマウスと C57 の交配より得られた新しい内耳奇形マウス Zfc-02 の ABR を行った。

ABRはステンレス針電極を用い、鼻尖部に陽極及び接地電極、右耳後部に陰極を置き、slope 0.1ms、duration 1ms、10kHz の tone pip を外耳孔 20cm 前方より一秒に一回の頻度で与えた。測定は110dBより10dBステップで反応がなくなるまで行った。なお、ABRのコントロールとして5週齢のC3Hを使用した。

C. 研究結果

ミトコンドリア遺伝子変異は、母系遺伝が想定される遺伝性難聴家系ならびに遺伝性の要因は明らかでない孤発性の原因不明の感音難聴症例にて同定された。コネキシン 26 遺伝子変異は、両側性の原因不明の感音難聴症例にて同定された。

MELAS 症候群の側頭骨組織からミトコンドリア遺伝子変異 3243 を検出し、内耳組織間の変異ミトコンドリア遺伝子の頻度を計測し、脳組織、末梢血、脾臓と比較して変異ミトコンドリア遺伝子の比率が内耳で高頻度であった。病理組織学的研究では、内耳組織のみならず脳幹の聴覚経路の病変を同定した。

耳石障害と内リンパ囊の拡大による反復性めまい発作が主症状である、前庭水管拡大症の PDS 遺伝子変異を明らかにした。

内耳奇形マウス Zfc-02 ホモ接合体は、顔が平たく体躯が小さいという表現型であった。また、著しい回転行動を呈した。ABR はホモ接合体では反応を認めず、ヘテロ接合体はコントロール

に比べ 20 から 30dB 程度の、聴覚閾値の上昇を認めた。

D. 考察

前庭水管拡大症例で同定された PDS 遺伝子変異は、内耳発生時期に多くの転写因子と協同発現すると予想されている。また、ノックアウトマウスでは、感覚細胞消失、耳石形成障害、内リンパ囊拡大がみられている。したがって、転写ならびにホメオボックス遺伝子と共に内耳発生、分化に深く関与していると予想される。

MELAS 症候群の側頭骨組織から検出されたミトコンドリア遺伝子変異 3243 は、内耳細胞にて高頻度に認められ、内耳病変との密接な関連を同定した。同症例の病理組織学的研究では、内耳組織のみならず脳幹の聴覚経路の病変も認め、系統疾患としての特徴もみられた。今回対象とした内耳奇形マウス Zfc-02 の原因遺伝子は、顔貌、体幹の表現型にも異常を認め、ホメオボックス遺伝子の変異が疑われる。

E. 結論

内耳発生時期に発現すると想定されている PDS 遺伝子変異を、前庭水管拡大症症例において同定した。原因不明感音難聴症例からミトコンドリア遺伝子 1555 変異、コネキシン 26 遺伝子変異を同定し、MELAS 症候群の側頭骨組織から高率のミトコンドリア遺伝子変異 3243 を内耳細胞で検出した。

ホメオボックス遺伝子変異が疑われる内耳奇形マウスの難聴を検出して、内耳組織学的検索で血管条の萎縮を同定し、耳の発生時期に出現する遺伝子変異による難聴のモデルを提示できた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takago H, Yokoyama K, Kitamura K: A vasoactive agent enhances the effect of ATP on cochlear blood flow. Acta Otolaryngol(Stockh) (in press)
2. Ozaki H, Watanabe Y, Takahashi K, Kitamura K, Tanaka A, Urase K, Momoi T, Sudo K, Sakagami J, Asano M, Iwakura Y, Kawakami K: *Six4*, a putative *myogenin* gene regulator, is not essential for mouse embryonal development. Mol Cell Biol (in press)
3. Kamiya K, Takahashi K, Kitamura K, Momoi T, Yoshikawa Y: Mitosis and apoptosis in postnatal auditory system of the C3H/He strain. Brain Res (in press)
4. Kitamura K, Takahashi K, Tamagawa Y, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Ishikawa K, Hagiwara H: Deafness Genes. J Med Dent Sci 47:1-11, 2000
5. Kitamura K: Neurofibromatosis 2. Kitamura K, Steel KP (eds): Genetics in Otorhinolaryngology. Adv Otorhinolaryngology 56: 244-248, 2000
6. Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Nishizawa M, Xue-Zhong Liu, James Walsh, Karen P. Steel, Steve D.M. Brown. Sensorineural Hearing Impairment, Non-Syndromic, Dominant DFNA11. Kitamura K, Steel KP (eds): Genetics in Otorhinolaryngology. Adv Otorhinolaryngology 56: 103-106, 2000
7. Kitamura K, Steel KP(eds): Genetics in Otorhinolaryngology. Adv Otorhinolaryngology 56, 2000
8. Kitamura K, Takahashi K, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Tamagawa Y, Ishikawa K, Ichimura K, Hagiwara H: Mutations of the Pendred syndrome gene(PDS) in patients with large vestibular aqueduct. Acta Otolaryngol (Stockh) 120: 137-141, 2000
9. Iwasaki S, Tamagawa Y, Ocho S, Hoshino T, Kitamura K: Hereditary sensorineural hearing loss of unknown cause involving mitochondrial DNA 1555 mutation. ORL 62: 100-103, 2000
10. Sakai O, Curtin H, Fujita A, Kakoi H, Kitamura K: Otosclerosis: Computed tomography and Magnetic Resonance imaging. Am J Otolaryngol 21: 116-118, 2000
11. Kanazawa T, Hagiwara H, Kitamura K, Labyrinthine involvement and multiple perforations of the tympanic membrane due to group A streptococcal acute otitis media. J Laryngol Otol 114: 47-49, 2000
12. Hagiwara H, Kanazawa T, Ishikawa K, Fujii T, Kitamura K, Noguchi Y, Iino Y: Invasive verrucous carcinoma: a temporal bone histopathology report. Auris Nasus Larynx 27: 179-183, 2000

2. 学会発表

1. 喜多村 健:難聴遺伝子 第9回奈良県耳鼻咽喉科感覚医学研究会 平成12年4月15日

2.喜多村 健:難聴と遺伝子 足立区耳鼻咽喉科医会学術講演会 東京. 平成12年10月28日

3.喜多村 健:メニエール病の診断. 第59回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 教育セミナー 東京, 2000年12月1日

4. 喜多村 健:難聴と遺伝子. 順天堂大学耳鼻咽喉科学教室学術集会 順天堂大学 2001年3月14日
235.

5. 黒石川泰, 野口佳裕, 喜多村 健: 難聴遺伝子診断のためのインフォームドコンセントーミレニアムプロジェクト等の答申を受けてー. 厚生省特定疾患対策研究事業 前庭機能異常調査研究班、急性高度難聴調査研究班 平成12年度合同総会 2001年1月14日 東京

6. 戸叶尚史, 岡村洋沖, 喜多村 健, 野瀬俊明:内耳奇形マウス (Zfc-02) の聴覚・行動異常について. 厚生省特定疾患対策研究事業 前庭機能異常調査研究班、急性高度難聴調査研究班 平成12年度合同総会 2001年1月14日 東京

7. 岡村洋沖, 喜多村 健:内耳発育過程における水チャネルー Aquaporin の発現と消退についてー. 厚生省特定疾患対策研究事業 前庭機能異常調査研究班、急性高度難聴調査研究班 平成12年度合同総会 2001年1月14

日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生省科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫アレルギー等研究事業）
分担研究報告書

分子モーター耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

分担研究者 川上 潔 自治医科大学教授

研究要旨 耳の発生分化に重要な Six 遺伝子群の生体機能および BOR 症候群の原因遺伝子産物 Eya1 蛋白質の変異による機能の欠陥を解析した。

A 研究目的

Six 遺伝子および Eya 遺伝子の耳の発生における役割とその分子機能を明らかにする為に、Six4 遺伝子破壊マウスの解析と、Eya1 遺伝子の変異による Eya1 蛋白質の機能の異常を明らかにする。

B 研究方法

Six4 遺伝子ノックアウトマウスの胎仔および成体について、形態的観察、聴力検査およびマーカ遺伝子の発現の解析を行った。また、BOR 症候群および白内障を発症する患者で同定された EYA1 遺伝子の変異をマウス Eya1 遺伝子に導入し、Six および Dach との相互作用や、転写活性化能について、検証した。

C 研究成果

脳神経節や耳胞の発生過程で特異的発現のみられる Six4 遺伝子破壊マウスはホモ個体も生存可能であった。耳の形態や聴力については、異常がみられなかった。また、各神経節や、筋肉における特異的マーカ遺伝子

(neuroD1、Myogenin など) の発現を野生型とホモ個体で比較したところ、差が認められなかった。EYA1 の変異のうち S454P と L472R 及び R307X は Six、Dach や G 蛋白質との相互作用に欠損がみられた。

D 考察

Six4 遺伝子の遺伝子破壊マウスに表現型が見られないのは、ほかの Six 遺伝子 Six1、Six2、Six5 などとの機能重複が原因である可能性が高い。それらを検証するために、Six1/Six4 および Six4/Six5 の二重変異マウスを作成することとした。Eya ドメインに存在する多くの点突然変異のうち、Six および Dach との相互作用が欠損しているものが同定された。分子機能の変異による、耳の形成異常が生じる機構を解析する糸口になることが期待される。

E 結論

Six 遺伝子群には機能重複の存在が示唆された。耳の形成に必須な Eya1 遺伝子の変異のうち、Six や Dach との相互作用ができなくなる変異が見つ

かったことから、これらの分子間相互作用が耳の形成に必須であることがわかった。

F 研究発表

1. 論文発表

1. "Intracellular Na⁺ directly modulates Na⁺,K⁺-ATPase gene expression in normal rat kidney epithelial cells." *Kidney Int.*, 57, 1617-1635 (2000) Muto, S., Nemoto, J., Okada, K., Miyata, Y., Kawakami, K., Saito, T., and Asano, Y.
2. "Six family genes-Structure and function as transcription factors and their roles in development." *BioEssays* 22, 616-626 (2000) Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, and Ikeda, K.
3. "Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites." *Mech. Dev.* 98, 151-155 (2000) Kobayashi, M., Osanai, H., Kawakami, K., and Yamamoto, M.
4. "Transcriptional regulation of Na,K-ATPase alpha1 subunit gene." In: "Control and diseases of sodium dependent transport proteins and ion channel", eds. Y. Suketa, E. Calafiori, M. Lazdunski, K. Mikoshiba, Y. Okada, and E. M. Wright., pp. 27-30, Elsevier, (2000) Kawakami, K.
5. "Six4, a putative myogenin gene regulator, is dispensable for mouse

embryonal development." *Mol. Cell. Biol.* in press (2001) Ozaki, H., Watanabe, Y., Takahashi, K., Kitamura, K., Tanaka, A., Urase, K., Momoi, T., Sudo, K., Sakagami, J., Asano, M., Iwakura, Y. and Kawakami, K.

2. 学会発表

1. 田中亨、川上潔、吉田浩己、深山正久:アンドロゲン依存性癌増殖における FGF8 と第 89 回日本病理学会総会、大阪、2000 年 4 月 11-13 日。
2. 田中亨、川上潔、吉田浩己、深山正久:アンドロゲン依存性癌増殖における FGF8 とサイクリン D1 の相互誘導機能。第 73 回日本内分泌学会学術総会、京都、2000 年 6 月 16-18 日。
3. Ikeda, K. and Kawakami, K. : Analysis of Eya co-activator complex. 4th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, August 26-30, 2000. (Abstracts p.145)
4. Kawakami, K. and Sato, S. : Target genes of Six proteins. 4th EMBL Transcription Meeting, Heidelberg, August 26-30, 2000. (Abstracts p.158)
5. Kawakami, K., Ozaki, H., Sato, S., Ikeda, K. : Evolution and function of Six family genes. The Sixth Asian Conference on Transcription, Beijing, October 23-27, 2000. (Abstracts p.15)

6. 尾崎秀徳、渡辺陽子、浅野雅秀、岩倉洋一郎、川上潔：ホメオボックス遺伝子 Six4 欠損マウスの解析。第 23 回日本分子生物学会年会、神戸、2000 年 12 月 13-16 日。（プログラム・講演要旨集 p.737)

G 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
分担研究報告書

難聴遺伝子の解析

分担研究者 米川博通 （財）東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所副所長

研究要旨

本研究は、マウスで同定された聴覚障害の原因遺伝子の情報をヒトに応用し、聴覚障害発症の原因究明、および聴覚障害児に対する遺伝子診断法の開発などに利用することを目的とした。我々が用いたジャクソンシェーカー（Jackson shaker: *js*）と呼ばれるマウスは、内耳コルチ器に存在する外有毛細胞の感覚毛が形成不全を起こすことによって、聴覚に障害を生じた突然変異マウスである。我々はさらに、形態的、機能的に同様な表現型を示すマウス（Waltzer Mouse Niigata: v^{ngt} ）を最近単離した。これまでに我々は、ポジショナルクローニングによって、2つの難聴マウスの遺伝子 js 、および v^{ngt} の候補として、キネシン様タンパク質DAK（Deafness-Associated Kinesin）、および新規のカドヘリン分子種Cadherin 23であることを同定し、そのcDNA、および遺伝子の一次構造を明らかにした。これらの情報をヒトの聴覚障害に応用するため、それぞれの遺伝子のヒトホモログの単離を試みた。その結果、ヒトDAKではすでに完全長cDNAが単離でき、ヒトDAKの一次構造とDAK遺伝子座が、ヒトでは17番染色体長腕の24-25（17q24-25）領域に存在することを明らかにした。さらに、これらの難聴原因遺伝子候補の生体内機能に影響を及ぼす修飾遺伝子の存在も明らかになった。今後これらの情報をもとに、これらの遺伝子がヒトの聴覚障害にどの程度関わるかということ明らかにすると共に、もし関わる場合には遺伝子情報に基づく新生児等の遺伝子診断法の確立などの基礎的資料となることが強く期待できる。

A. 研究目的

ヒトの遺伝性聴覚障害は、新生児の約1,000~2,000人に1人と高頻度に出現する重要な遺伝性疾患である。ヒトの場合、このような遺伝性疾患の原因遺伝子の同定には、その遺伝性疾患が集積されている家系と染色体特異的DNA多型マーカーとを用いた連鎖解析が用いられてきた。実際、本研究の標的疾患である遺伝性聴覚障害においても、この方法により数多くの成果が報告されてきた。一方、遺伝性聴覚障害には数多くの

非症候群性のものが存在し、そのため集積家系の収集にかなりの困難さを伴うことや、聴覚障害者同士での婚姻例の多さが原因となり、単一の家系において類似の表現型を示す複数の原因遺伝子の混在することなどは、ヒトでの連鎖解析を行う上での大きな障害となっている。本研究は、ヒト聴覚障害モデルマウスの研究成果をヒトに応用することで、これらの障害を克服するための1つの手段として有効であることを明らかにするため行った。

我々はこれまで、ヒト聴覚障害モデルの1つである、ジャクソンシェーカー (Jackson shaker: *js*) マウスの聴覚障害の原因となる遺伝子のポジショナルクローニングを行ってきた。その結果、候補遺伝子としてキネシン様タンパク質DAK (Deafness-Associated Kinesin) を単離した。マウス DAKのcDNA、および遺伝子の構造をもとに、ヒトホモログの単離を試みた結果、ヒト DAKの完全長cDNAが単離できた。また、この結果得られたヒト DAKのcDNA、およびその遺伝子の一次構造の情報をもとに、今後 DAKの異常とヒト聴覚障害発症との関わりについて解析を行うことにした。

また、最近 js と形態的、機能的に類似の表現型を持つ難聴マウス、Waltzer Mouse Niigata: v^{ngt} を単離し、その原因候補遺伝子を同定した。それとともに、これら2種類の難聴遺伝子に影響を及ぼす修飾遺伝子の同定を行った。

B. 研究方法

1. 内耳におけるDAKの発現の検索

DAK特異的なアミノ酸配列を標的にペプチド抗体を作製した。これを用いてマウス各組織に対するウェスタンブロッティングおよび蝸牛管の免疫染色を行った。

2. js 突然変異導入によるマウス系統間の聴力および内耳表現型の比較

js 突然変異をヘテロの状態で持つ C57BL/6J- js +/、C3H/HeN- js +/および js 突然変異を日本産野生マウスMSM系統に導入したコンジュニックマウスMSM/Ms- js +/の聴力をABR (Auditory Brainstem Response)により測定した。ABRは8、16および32kHzのトーン

ピップ音により行った。また、それらの蝸牛管の内耳組織切片を作製し、表現型の比較を行った。

3. ヒト聴覚障害DFNA20とDAKの関連性の検討

ヒトの17番染色体17q25へ優性遺伝様式を示す非症候群性難聴が新たにマップされた。この聴覚障害とDAKとの関連性をStanford G3およびTNG Radiation hybrid (RH) panelを用いたDAKのヒト染色体へのマッピングおよびシーケンシングによる突然変異の探索を行った (ミシガン大学Friderici博士との共同研究)

4. 新たに発見された難聴マウスWaltzer

mouse niigata(v^{ngt})の候補遺伝子の単離

難聴マウスWaltzer mouse niigata(v^{ngt})と日本産野生マウスMSMとの戻し交配を行い、得られた遺伝子座領域でBACクローンによる物理地図を構築した。得られた整列BACクローンから、さらに v^{ngt} 遺伝子座を狭め、最終的にはその部分を全てシーケンスすることによって、発現遺伝子断片 (EST) を探した。そのESTを用いて難聴、及び正常マウスの突然変異部位の検索を行い、それをもとに完全長cDNAクローン、その遺伝子の一次構造を決定した (新潟大学医学部木南 凌教授との共同研究)。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来の材料についてはその全てに市販品を使用した。このため、倫理面での問題は無いと考え、特段の配慮は行わなかった。また、マウス等の動物実験に関しては、財団法人東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所の実験動物委員

会で承認と所長からの許可を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1. 内耳におけるDAKの発現の検索

DAKのアミノ酸配列をもとに合成したペプチドを用いて抗ペプチド抗体を作製し、これを用いて、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、精巣においてその発現が強く認められた。次に精巣を用いてjsマウスとの発現の比較を行った結果、野生型との差異は認められなかった。また、マウス内耳蝸牛管およびその組織切片の免疫染色を行った結果、内有毛および外有毛細胞さらに外柱細胞に強く発現が認められ、さらに蝸牛神経細胞にも発現が認められた。一方、DAKの突然変異による聴覚障害が予想されるjsマウスにおいても同様の解析を試みた結果、その発現は明らかに低下していた。

2. js突然変異導入によるマウス系統間の聴力および内耳表現型の比較

js突然変異をヘテロの状態でもつC57BL/6J-js/+、C3H/HeN-js/+およびMSM/Ms-js/+の聴力をABRにより測定した。すべての個体で生後6ヶ月までは正常な聴力を保持していた。その後1ヶ月間隔でABRを測定した結果、C3H/HeN-js/+およびMSM/Ms-js/+においては18ヶ月齢まで正常な閾値を示したが、C57BL/6J-js/+の個体においては6-8ヶ月齢で劇的に聴力が衰え、高度難聴を発症した。また、内耳の表現型を観察した結果、C57BL/6J-js/+の個体は蝸牛神経細胞が大きく減少し、さらにコルチ器の退縮が顕著に認められた。一方、野生型のC57BL/6J系統

も加齢により高度難聴を発症することが知られており、この系統の個体においても同様の解析を行った結果、10-12ヶ月齢で難聴を発症することが明らかとなり、蝸牛神経細胞の減少およびコルチ器の退縮が認められた。従って、js突然変異の存在がC57BL/6J系統の難聴を促進するものと考えられた。

3. ヒト聴覚障害DFNA20とDAKの関連性の検討

DAKのヒト染色体上の位置をRHマッピングにより決定したところ、DAKは第17番染色体のセントロメアから99.5cMの位置にマップされた。ヒト聴覚障害DFNA20は第17番染色体D17S836 (114.4cM)-D17S668 (126.5cM)間にマップされており、DAKはその10cM以上セントロメア側にマップされた。さらに、DAKにおいてDFNA20患者の突然変異を探索した結果、蛋白コード領域に変異は認められなかった。

4. 新たに発見された難聴マウスWaltzer

mouse niigata(v^{ngt})の候補遺伝子の単離

Waltzer mouse niigata(v^{ngt})とMSMの戻し交配分離個体約1,650頭を解析し、原因遺伝子座をマウス第10染色体D10Mit258近傍に位置づけた。これをもとに13個のBACからなる整列クローンを構築した。さらにこの領域を詳細に検討した結果、 v^{ngt} 遺伝子座は約200kbの範囲に存在することが確実となった。そこで、この部分を全てシーケンスし、EST解析プログラムでESTを検索の結果、5つのESTが発見できた。このうちの1つに、Waltzer mouse niigataと他の近交系の間で突然変異が見られた。その分子はカドヘリン

の1種でCadherin 23であった。現在、この遺伝子がWaltzer mouse niigataの責任遺伝子であるか否かを、トランスジェニックマウスの系を用いて検討しているところである。

D. 考察

本研究事業の終了時まで、我々はマウスを用いて、2種類の難聴原因遺伝子 js と v^{ngt} の候補を同定した。前者はキネシン様蛋白DAK、他方はカドヘリンの一種、Cadherin 23であった。さらに我々は js の機能に影響を及ぼす修飾遺伝子の存在を明らかにし、またこの修飾遺伝子は晩発性の難聴を引き起こす遺伝子であった。この様に原因遺伝子2つは、早発性難聴、一方修飾遺伝子は晩発性難聴に関係することから、これら3種類の遺伝子を有効に使えば、ヒト難聴の分子生物学的、分子遺伝学的な原因解明に大きな寄与を与えるものと期待された。

また、今年度我々は初めてマウスの成果をヒトに応用できた。結果は、残念ながら否定的であったが、我々がこれまで培ってきた実験技術が、ヒト難聴にも十分応用可能であるという手応えをつかんだ。この成果を基礎に、さらに研究を進め、我々の究極の目的である難聴の原因の分子生物学的機構解明、ヒト難聴患者への応用、特に遺伝性難聴を持つ新生児への遺伝子診断等に役立ててゆきたいと考えている。

E. 結論

ヒト聴覚障害モデルであるジャクソンシェカー(Jackson shaker: js)マウスの聴覚障害

の原因となる候補遺伝子としてDAK (Deafness-Associated Kinesin)を同定した。このマウスDAKの情報をもとにヒトDAKのホモログを単離し、cDNAおよび遺伝子の構造を明らかにした。この js 遺伝子座のヒトのシンテニック部分にDFNA20の遺伝子座が存在したため、ヒトのDAK遺伝子の異常を検索したが、異常は発見できなかった。しかし、この例のように、マウスの結果を基礎にヒトの難聴を解析できる見通しが立った。また、今回、 js 遺伝子座の機能に影響を及ぼす遺伝子座がC57BL/6Jゲノム中に存在することが明らかになった。この遺伝子座は検討の結果、晩発性難聴に関与していることが明らかになったため、若年性難聴、晩発性難聴、それぞれのマウスモデルが得られることとなった。これらの結果は、いずれもがヒト難聴を解析する上での大きな遺伝的ツールとなると期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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. 投稿中

2. 学会発表

1) 和田匡史・若林雄一・牛木辰男・米川博通・木南 凌：先天性聴覚障害モデルマウス (ns) 遺伝子座近傍の物理地図作製。第23回日本分子生物学会年会 2000.12.13 - 16. 神戸

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iwasaki S, Tamagawa Y, Ocho S, Hoshino T, Kitamura K	Hereditary sensorineural hearing loss of unknown cause involving mitochondrial DNA 1555 mutation.	ORL	62	100-103	2000
Kitamura K, Takahashi K, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Tamagawa Y, Ishikawa K, Ichimura K, Hagiwara H	Mutations of the Pendred syndrome gene(PDS) in patients with large vestibular aqueduct.	Acta Otolaryngol(Stockh)	120	137-141	2000
Kitamura K, Takahashi K, Tamagawa Y, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Ishikawa K, Hagiwara H	Deafness Genes.	J Med Dent Sci	47	1-11	2000
Kitamura K	Neurofibromatosis 2.	Kitamura K, Steel KP (eds): Genetics in Otorhinolaryngology AdvOtorhinolaryngology	56	244-248	2000
喜多村 健	感音性難聴の遺伝子について	耳鼻と臨床	46(6)	494-495	2000
黒石川泰, 喜多村 健	めまいの遺伝子学的アプローチ	Clinical Neuroscience	18	17-20	2000
喜多村 健, 野口佳裕, 黒石川泰, 古宇田寛子, 玉川雄也, 高橋克昌, 石川浩太郎	遺伝子異常による難聴	耳鼻頭頸	72	641-653	2000
喜多村 健	遺伝と遺伝子	JOHNS	16(11)	1712-1714	2000
喜多村 健	難聴の遺伝子診断	感染・炎症・免疫	30(3)	257-259	2000
Muto S, Nemoto J, Okada K, Miyata Y, Kawakami K, Saito T, Asano Y	Intracellular Na ⁺ directly modulates Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase gene expression in normal rat kidney epithelial cells.	Kidney Int.	57	1617-1635	2000
Kawakami K, Sato S, Ozaki, Ikeda K	Six family genes-Structure and function as transcription factors and their roles in development.	Bio Essays	22	616-626	2000
Kobayashi M, Osanai H, Kawakami K, Yamamoto M.	Expression of three zebrafish Six4 genes in the cranial sensory placodes and the developing somites.	Mech. Dev.	98	151-155	2000

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Nishizawa M, Xue-Zhong Liu, James Walsh, karen P. Steel, Steve D.M. Brown	Sensorineural Hearing Impairment, Non-Syndromic, Dominant DFNA11.	Kitamura K, Steel KP	Genetics in Otorhinolaryngology AdvOtorhinolaryngology 56	Karger	Basel	2000	103-106
Kawakami K	Transcriptional regulation of Na ⁺ , K-ATPase alpha1 subunit gene.	Y Suketa, E Calafiori, M Lazdunski, K Mikoshiba, Y Okada, E. M. Wright.	Control and diseases of sodium dependent transport proteins and ion channel.	Elsevier	Amsterdam	2000	27-30