

マウスモデルを用いた多因子性難聴発症に関する
遺伝学的研究

2015年

鈴木 沙理

序章

難聴はヒト集団において最も一般的な感覚器疾患であり、コミュニケーション障害などのクオリティ・オブ・ライフに多大な影響を与える。難聴の原因は遺伝的要因および環境要因を含むが、半数は遺伝的要因によって発症することが明らかとなっており [Morton and Nance, 2006]、実際に多くの難聴原因遺伝子座が連鎖解析によってマップされている [Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org/>]。また、それらマップされた遺伝子座のうち多くの難聴の原因となる変異がヒトで同定されているが、そのほぼすべての変異は、単一遺伝子によって引き起こされる先天性難聴に関連する遺伝子に同定されたものであり、一部の先天性難聴、進行性難聴 (progressive hearing loss: PHL)、加齢性難聴 (age-related hearing loss: AHL)、老人性難聴 (senile hearing loss: SHL) など量的質的遺伝子座 (quantitative trait locus: QTL)、すなわち複数の遺伝子因子の効果によって発症する多因子性難聴についてはその原因となる変異および遺伝子は不明である。

さらに、ヒトにおいて QTL の効果によって発症する難聴は、騒音、加齢、耳毒性薬物、ウイルスや細菌感染等の環境要因の影響によってその発症時期および重篤度が修飾される [Mills and Going, 1982; Fransen *et al.*, 2003]。それら

環境要因は遺伝学的解析の妨げとなり、患者の生涯を通して環境要因からの難聴への影響をすべて理解することは不可能である。従って、多因子性難聴に関連する QTL のうち、原因遺伝子が同定されたものは僅か一例のみであり [Friedman *et al.*, 2009]、幾つかのゲノムワイド関連解析 (genome-wide association studies: GWAS) が難聴を標的として行われているものの、その実態は不明である [e.g., Dickson *et al.*, 2010; Van *et al.*, 2010; Yokoyama *et al.*, 2012; Giroto *et al.*, 2014]。

多因子性難聴の原因となる QTL を同定するための一つの確立された手法としては、バイオリソースとして近交系マウスを用いた順遺伝学的解析である。近交系マウスは、ハンドリングも容易であり、統一された環境で遺伝解析を行うことが可能である。また、近交系マウスは遺伝的にホモ化された多くの系統が維持をされており [Casellas, 2011]、そのゲノム配列と近交系マウス間の遺伝的多型も公開され [Keane *et al.*, 2011; Takada *et al.*, 2013]、さらに、多くの系統において聴力の表現型解析もなされている [Zheng *et al.*, 1999; Kikkawa *et al.*, 2012]。さらに、近交系マウスのうち、数系統は聴力測定解析によって複数の QTL の効果によって発症時期が修飾されることも報告されている [Zheng *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Kikkawa *et al.*, 2012]。例えば、C57BL/6J (B6) 系統は中程度の周波数 (1-10 kHz) では 9-15 ヶ月齢、高周波数 (10-20 kHz) は 4-10 ヶ月齢、

続いて超音波周波数 (<20 kHz) は 2-6 ヶ月齢において重度難聴発症を示し、遅発性 AHL モデルとして広く使われている [Henry and Chole, 1980; Miyasaka *et al.*, 2013]。また、その発症は cadherin 23 (*Cdh23*) 遺伝子の *ahl* 変異 (*Cdh23^{ahl}*, c.753G>A) であることが報告されている [Noben-Trauth *et al.*, 2003]。一方、DBA/2J (D2J) マウスは B6J マウス同様難聴を発症するが、早発性 AHL を発症し、約 8 ヶ月齢までに超音波周波数～低周波数にかけて早発性の重度難聴発症を示す [Johnson *et al.*, 2008]。この両者の難聴発症時期および重篤度の差異は、D2J の遺伝的背景には難聴発症を早期化する QTL が存在することを示唆しており、このような難聴発症時期および重篤度を修飾する QTL は異なる近交系マウス系統間の交配群を用いた遺伝解析によって同定され、これまで *ahl*, *phl* および *hfhl* (high-frequency hearing loss) 遺伝子座の存在が明らかとなっている [Kikkawa *et al.*, 2012]。

本研究はこのような難聴発症時期および重篤度が異なる近交系マウスを利用し、順遺伝学的なアプローチによって難聴発症に関与する QTL の同定を試みたものである。特に、本研究では研究期間を考慮し、早発性の重度難聴発症が知られている D2J および NOD/Shi (NOD) 系統を選択し、研究計画を立案・実施した。すなわち、本研究は両系統と遅発性難聴発症系統である B6J 系統の交配による交配個体群を作製・解析によって QTL 連鎖解析を実施したものであり、結

果として両系統の難聴発症に影響を与える新規の QTL を同定したものである。それらの結果は、第 1 章において D2J 系統の難聴発症、第 2 章において NOD 系統の難聴発症に関する QTL 同定の解析方法、結果および考察について述べ、さらに総合討論した。

第1章 DBA/2J マウスの早発性・進行性難聴の遺伝要因の同定

第1項 緒論

Dilute brown non-agouti (DBA) 系統は米国ジャクソン研究所の創始者である Clarence Cook Little 博士により、1909年にチョコレート色(淡褐色)の毛色から選抜された最古の近交系統であり [Morse, 1978]、1929年～1930年に DBA/1 および DBA/2 を含む数種の亜系統が樹立された [http://jaxmice.jax.org/strain/000671.html]。DBA/2J (D2J) マウスはそれらの亜系統の中で最も医学研究分野において汎用されており、その毛色変異の原因となる Myosin Va の *d* アレル [Jenkins *et al.*, 1981; Moore *et al.*, 1994] を始めとした様々な変異アレルにより D2J マウスは聴原発作 [Fuller and Sjursen, 1967; Neumann and Collins, 1991]、緑内障 [Anderson *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2013]、アルコールおよびモルヒネ不耐性 [Cunningham *et al.*, 1992; Belknap *et al.*, 1993; Porcu *et al.*, 2014] などの表現型を発症し、様々な疾患のヒトモデルマウスであることが報告されている。

一方、D2J マウスは早発性 AHL を示す (PHL) ことが報告されており、約 8 ヶ月齢までに超音波周波数～低周波数に重度な難聴を発症する [Zheng *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2008]。序章で述べたように、その遺伝的原因の一つは多くの

近交系マウス系統の AHL の責任遺伝子として cadherin 23 (*Cdh23*) 遺伝子の *ahl* 変異 (*Cdh23^{ahl}*, c.753G>A) であることが報告され [Noben-Trauth *et al.*, 2003]、D2J 系統は *Cdh23^{ahl/ahl}* ホモアレルの効果により難聴を発症する。また、B6J と比較して D2J は有意に早く AHL を発症し、このような AHL 発症時期の差異は、D2J の *Cdh23^{ahl}* アレルに加え、他の遺伝的要因の効果によるものであり、代表例として D2J の早発性 AHL 遺伝子座が Johnson *et al.* [2008] によって第 11 番染色体上に同定され、*ahl8* と命名された。さらに、その責任遺伝子として、Shin *et al.* [2010] はアクチンクロスリンカー蛋白質をコードする *fascin 2 (Fscn2)* 遺伝子の c.326G>A ミスセンス変異 (p.Arg109His) を同定した。一方、Nagtegaal *et al.* [2012] は D2J マウスの低周波数特異的および早発性難聴に関与する *ahl9* 遺伝子座を第 18 番染色体上に同定している。このようにこれまでの研究から、D2J の AHL 発症は複数の感受性 QTL によって促進されることが示された。

そこで本章では、D2J マウスの難聴発症に関与する新たな QTL の同定を目的として実施した順遺伝的解析の結果を示した。特に、本研究では新たな D2J の難聴発症に関連する新たな遺伝的要因を特定し、D2J マウスの早発性 AHL における高周波数難聴特異的に効果をもつ第 5 番染色体上の QTL についてその解析結果を述べる。

第2項 材料および方法

1. マウス

DBA/2Jcl (D2) および C57BL/6Jcl (B6J) 系統は日本クレア (Tokyo, Japan) から購入し、公益財団法人東京都医学総合研究所および東京農工大学生物産業学部の動物施設において飼育維持した。また、すべての動物実験は文部科学省が定めた研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省告示第七十一号）および日本学術会議により定義された動物実験指針のガイドラインに従って定義された東京都医学総合研究所および東京農工大学の実験動物委員会および倫理委員会の承認を受け実施した。

2. 聴力測定

D2J マウスの聴力は auditory brain stem response (ABR) を測定することにより評価した。マウスはペントバルビタールナトリウム (60-80 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔した。ABR は TDT System III (TDT, Alachua, FL, USA) および BioSigRP ソフトウェア (TDT) を用いて 8-, 16-および 32-kHz のトーンピップ音刺激を測定した。測定のため、脳波測定用のステンレススチール針電極は頭頂の皮下と（陽極: 活性）、左右反対の頭頂の皮下に（陰極: 非活性）、および心電図

確認用のアースを背部にそれぞれ挿入した。次に音源（スピーカー）はマウスの外耳道に挿入し、各周波数、0.1 ms のトーンピップ音刺激（sound pressure level in decibels: dB SPL）の持続時間は 1 ms で、50 ms 間自由空間内で繰り返した。ABR 閾値は、10 dB SPL のステップで音刺激を減少させ、ABR 波形が認識されなくなった音の 5 dB SPL 前後を測定し、それぞれの音刺激から ABR 閾値を得た。また、本研究において D2J および B6J マウスの ABR は両耳をランダムに測定し、D2J および B6J の F₁ および N₂ マウスは右耳のみを測定した。

3. QTL 連鎖解析

本研究では D2J マウスの早発性 AHL に関与する感受性遺伝子座のマッピングのため、D2J と B6J 間の 14 個体の F₁ マウス (BDF₁) に D2J 戻し交配個体した (BDF₁ × D2J) N₂ マウスを 90 個体作製した。90 個体の N₂ マウスの DNA は、Microsatellite Database of Japan [<http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/top.jsp>] を参照して D2J および B6J 間において PCR 断片のバンドサイズの異なる 103 個のマイクロサテライト多型マーカー (Table 1) を用いて PCR-Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) により遺伝子型を判定した。遺伝子型判定のための PCR 増幅は KAPA2G Fast PCR Kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) を用いて、95°C 2 分間を 1 サイクルと、95°C 15 秒、58°C 20 秒、72°C 5 秒を 40 サイクル

Table 1. Microsatellite markers used in genetic mapping of the susceptibility locus associated with early-onset AHL in D2J mice.

Chromosome	Marker name	Ensembl Position (bp)	Chromosome	Marker name	Ensembl Position (bp)
1	<i>D1Mit294</i>	11741307	7	<i>D7Mit21</i>	3266568
1	<i>D1Mit373</i>	26478481	7	<i>D7Mit314</i>	43571645
1	<i>D1Mit214</i>	58233965	7	<i>D7Mit148</i>	92745007
1	<i>D1Mit134</i>	80267876	7	<i>D7Mit330</i>	119656690
1	<i>D1Mit370</i>	168000922	8	<i>D8Mit172</i>	17804003
1	<i>D1Mit206</i>	173004198	8	<i>D8Mit50</i>	89351668
1	<i>D1Mit459</i>	187647303	8	<i>D8Mit200</i>	114663894
1	<i>D1Mit293</i>	192998594	8	<i>D8Mit156</i>	128895504
2	<i>D2Mit32</i>	25346284	9	<i>D9Mit90</i>	32500455
2	<i>D2Mit433</i>	57297111	9	<i>D9Mit205</i>	37298324
2	<i>D2Mit12</i>	103101322	9	<i>D9Mit113</i>	85796734
2	<i>D2Mit194</i>	143931525	9	<i>D9Mit51</i>	106412277
2	<i>D2Mit147</i>	172394708	9	<i>D9Mit52</i>	122702676
3	<i>D3Mit60</i>	6808535	10	<i>D10Mit189</i>	18383585
3	<i>D3Mit92</i>	26182244	10	<i>D10Mit186</i>	75681135
3	<i>D3Mit42</i>	121461791	10	<i>D10Mit180</i>	118150611
4	<i>D4Mit101</i>	9702613	11	<i>D11Mit227</i>	17277052
4	<i>D4Mit111</i>	53550839	11	<i>D11Mit36</i>	83842594
4	<i>D4Mit52</i>	114800671	11	<i>D11Mit124</i>	99190655
4	<i>D4Mit339</i>	134367426	11	<i>D11Mit203</i>	116363361
4	<i>D4Mit48</i>	141151816	11	<i>D11Mit103</i>	117167319
4	<i>D4Mit312</i>	141893970	12	<i>D12Mit182</i>	10870603
4	<i>D4Mit341</i>	NM*	12	<i>D12Mit2</i>	41646392
4	<i>D4Mit233</i>	145224944	12	<i>D12Mit158</i>	82619016
4	<i>D4Mit256</i>	154990439	12	<i>D12Mit8</i>	113419742
5	<i>D5Mit1</i>	17618146	13	<i>D13Mit17</i>	21293266
5	<i>D5Mit348</i>	24919119	13	<i>D13Mit248</i>	52947494
5	<i>D5Mit352</i>	35614967	13	<i>D13Mit196</i>	112761758
5	<i>D5Mit81</i>	50331325	13	<i>D13Mit35</i>	119339644
5	<i>D5Mit233</i>	52697226	14	<i>D14Mit10</i>	12481829
5	<i>D5Mit300</i>	54486435	14	<i>D14Mit193</i>	71521620
5	<i>D5Mit255</i>	54954339	14	<i>D14Mit170</i>	106265795
5	<i>D5Mit197</i>	64649088	15	<i>D15Mit179</i>	13489923
5	<i>D5Mit336</i>	72488531	15	<i>D15Mit60</i>	44264658
5	<i>D5Mit113</i>	77255215	15	<i>D15Mit241</i>	87170085
5	<i>D5Mit309</i>	79502721	15	<i>D15Mit79</i>	103472156
5	<i>D5Mit7</i>	93297205	16	<i>D16Mit108</i>	6248008
5	<i>D5Mit155</i>	99690609	16	<i>D16Mit4</i>	36240487
5	<i>D5Mit10</i>	104239005	16	<i>D16Mit19</i>	78811756
5	<i>D5Mit24</i>	112317683	16	<i>D16Mit106</i>	97830150
5	<i>D5Mit425</i>	119880441	17	<i>D17Mit246</i>	8459684
5	<i>D5Mit95</i>	124829235	17	<i>D17Mit31</i>	34744039
5	<i>D5Mit214</i>	126090176	17	<i>D17Mit89</i>	63639035
5	<i>D5Mit372</i>	132127239	17	<i>D17Mit221</i>	90087704
5	<i>D5Mit97</i>	137003596	18	<i>D18Mit111</i>	21513305
5	<i>D5Mit99</i>	140957413	18	<i>D18Mit177</i>	40982507
5	<i>D5Mit222</i>	142503346	18	<i>D18Mit184</i>	66819243
6	<i>D6Mit170</i>	24381333	18	<i>D18Mit7</i>	76847626
6	<i>D6Mit19</i>	77554468	19	<i>D19Mit128</i>	17250645
6	<i>D6Mit55</i>	114282098	19	<i>D19Mit10</i>	47152792
6	<i>D6Mit200</i>	145935340	19	<i>D19Mit33</i>	56195632
6	<i>D6Mit15</i>	146428986			

*Not mapped: markers are not mapped to the assembly in the current Ensembl database.

の条件下で行い、その PCR 産物は 4%アガロースゲルを用いて電気泳動により分離した。また、N₂ マウスの遺伝子マッピングには、表現型の量的形質として生後 3 ヶ月齢 (±5 日) の 8-, 16-および 32- kHz の ABR 閾値を測定した。連鎖解析は、1.0 cM のステップサイズを用いた Haley-Knott 回帰による single-QTL ゲノムスキャンを R 統計パッケージの R/qtl プログラム [Broman and Sen, 2009] を用いた QTL interval マッピングにより実施した。また、統計学的に有意な logarithm of odds (LOD) スコアは R/qtl を用いて 1,000 回の並び替え検定によって決定し、さらに、有意差検定においては 2 グループ間の比較には Student's t-test および Welch's correction を用いて、3 グループ間の比較は one-way ANOVA および Tukey's post-hoc multiple comparison test により実施し、それらのカラム間統計および P 値の算出には GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) を用いた。また、すべての ABR 閾値のデータは平均値 ± 標準偏差 (standard deviation: SD) で示した。

4. 変異スクリーニング

RNA 抽出のためのサンプルは生後 12 週齢の D2J および B6J マウスの脳幹および 3 週齢の D2J および B6J マウスの蝸牛を用いた。これらのサンプルからの RNA 抽出は PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Grand Island, NY, USA) を使用し、

0.5 μ g の RNA を鋳型として SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) のキットのプロトコールに従って cDNA を合成した。また、本研究では urocortin 遺伝子 (*Ucn*)、glutaredoxin, cysteine rich 1 遺伝子 (*Grxcr1*)、purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 2 遺伝子 (*P2rx2*)、Sad1 and UNC84 domain containing 1 遺伝子 (*Sun1*)、Fascin 1 遺伝子 (*Fscn1*)、および actin, beta 遺伝子 (*Actb*) の B6J および D2J マウス間の解析するため、それらの遺伝子のエクソン領域および untranslated region (UTRs) の一部を含むようにプライマーをデザインした (Table 2)。 *P2rx2* および *Sun1* への解析においては予備実験の段階で 3' 領域にオルタネイティブスプライシングが検出されたため、部分的な塩基配列の決定についてはゲノム DNA を鋳型として用いた。PCR 増幅は KOD-FX Neo (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて 94°C 2 分間 1 サイクルと、98°C 10 秒、68°C 3 分を 45 サイクルの条件下で行った。PCR 生産物は QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて精製し、BigDye Terminator kit (Life Technologies) を用いてシーケンシングを行い、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer により解析をした。

5. 定量的 RT-PCR

定量的 RT-PCR (quantitative RT-PCR: qRT-PCR) を実施するためのサンプルは

Table 2. Information of primers for the sequencing of *Ucn*, *Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1*, *Fscn1* and *Actb*.

Gene symbol (GenBank accession number)	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Position*
<i>Ucn</i> (NM_021290.2)	Ucn_F2	TGCTCCCCAAGGCGTCTTCAG	20 - 40
	Ucn_R2	TAGGTAAGGGAAAGGGTCAAGGC	506 - 528
<i>Grxcr1</i> (NM_001018019.2, NC_000071.6**)	Grxcr1_F2	TGTGGCAAGGGGGATGAACTGACAG	2 - 26
	Grxcr1_R2	TGAGGCTTTCTTAGGCAGAAAGC	950 - 972
	Grxcr1_seq_F5	TGCAGCAGCCATCAGCTGAC	451 - 470
	Grxcr1-DNA-F9	AGTGCCCGTTCAACCTTTGTGAGTG	78343 - 78367
	Grxcr1-DNA-R6	AGACAAACAGGAAGGGAAGGAGCTTC	78673 - 78697
	<i>P2rx2</i> (NM_153400.4, NC_000071.6**)	P2rx2_F1	ACGAGAGGCCGAGAGTGTGAGGCG
P2rx2_R1		AGATCCAGGTCTGTAGCTTAGTG	1548 - 1570
P2rx2_seq_F2		ACATTGCAAGCCAGAAAGAGTG	724 - 744
P2rx2_seq_F4		TTCTGGGACTACGAGAC	156 - 172
P2rx2-DNA-F8		TACCAATGTCGGAAACAAAAGTGTG	906 - 930
P2rx2-DNA-R4		AGGTAGAGCTGTGAACCCCTCATGCTC	1207 - 1232
<i>Sun1</i> (NM_001256115.1, NM_024451.2, AC_000027.1**)	Sun1_F1	AGGCAGCATGGTCTGAGACGGTG	58 - 80
	Sun1_R1	AGTTCCAGTGTTATGGCGTCTTGG	2746 - 2769
	Sun1_seq_F3	ACTTCTTCTCACTCCTACCAG	1285 - 1305
	Sun1_seq_F4	ACTGCTGCAGAATATCACACAC	2030 - 2051
	Sun1-seq-F7	AGCACCTTGAGATACACACAGC	1024 - 1045
	Sun1-seq-F8	AACCAAGCTGAAAGCAGGC	1751 - 1769
	Sun1-DNA-F9	TGTGCACATTTGGAGGGAAACACATG	14371 - 14395
	Sun1-DNA-R2	AGTTCAAATGCTGTGTGCCCTCAATG	14650 - 14674
	Sun1-DNA-F12	TCTCAGTTAAGGAGAGGCCACCACAG	28917 - 28942
	Sun1-DNA-R5	ATGAAAGAAGCCCTCAGAAAGAGCAG	29373 - 29398
	Sun1-DNA-F13	ATCTCTGACACTCCTGAGGCAATGGTC	30032 - 30057
	Sun1-DNA-R6	TAACTGTATAGATGCAGAGGCGC	30583 - 30606
	<i>Actb</i> (NM_007393.3)	Actb-F1	GAGCACAGCTTCTTTGCACTCCTTC
Actb-R1		CAAAGAAAGGGTGTAACCGCAGCTCAG	1219 - 1246
<i>Fscn1</i> (NM_007984.2)	Fscn1-F1	TGTGGAGAACTGCAGCGGGCTAAGC	1 - 25
	Fscn1-R1	GTAAGGATAACAGGAGGGACTGACGAG	1602 - 1628

*Positions are according to the published mRNA sequences (*Ucn*, *Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1*, *Actb* and *Fscn1*) and genomic sequences (*Grxcr1*, *P2rx2* and *Sun1*).

**Accession numbers for genomic sequence.

生後 3 週齢の D2J および B6J マウスの蝸牛を RNAlater (Ambion) 内において抽出し、同液内で 3 時間室温にインキュベート後、4°C で 12~17 時間インキュベートした。翌日、PureKink RNA Mini Kit (Ambion) の 1% 2-mercaptoethanol/Lysis Buffer 中に蝸牛を浸し、QIAshredder (Qiagen) を用いてホモジナイズ後、PureLink RNA Mini Kit (Ambion) のプロトコールに従って RNA を抽出した。抽出した total RNA は Recombinant DNase I (TaKaRa, Otsushi, Japan) によって DNase 処理し、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した。qRT-PCR は合成した cDNA (10~20ng/μl) をサンプルとし、Table 3 に示した *Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1*, *Fscn1* および *Actb* のプライマーセットを用い、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) および LightCycler 480 Instrument (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) の標準プロトコールに従って増幅・定量することにより行った。得られたシグナル値は、hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) のシグナルを中央値とし、幾何平均としてそれぞれ 3 サンプルのデータを基準化した。さらに、D2J および B6J 間の遺伝子発現データの統計解析は Student's t-test および Welch's correction により実施した。

Table 3. Information of primers for quantitative RT-PCR (qRT-PCR) of *Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1*, *Fscn1* and *Actb*.

Gene symbol (GenBank accession no)	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Position*
<i>Grxcr1</i> (NM_001018019.2)	Grxcr1-qRT-F8	ACATAGCTCTAAACGGTGACTATGG	592 - 616
	Grxcr1-qRT-R5	AAGGTC TTGCAGTTCTCCTGATTC	726 - 749
<i>P2rx2</i> (NM_153400.4)	P2rx2-qRT-F6	TATGACCCTGCCCTTCAGGCTACAAC	957 - 983
	P2rx2-qRT-R2	ACGTCAATTCGAATCCCATAGGC	1044 - 1066
<i>Sun1</i> (NM_001256115.1)	Sun1-qRT-F10	ACCACATTCACCATGGAACACATTC	2424 - 2448
	Sun1-qRT-R2	TGGTCATAGGTGAACCGTCCCAGAG	2542 - 2566
<i>Actb</i> (NM_007393.3)	Actb-qRT-F1	AGACCTCTATGCCAACACAGTGCTG	952 - 976
	Actb-qRT-R1	ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTG	1139 - 1163
<i>Fscn1</i> (NM_007984.2)	Fscn1-qRT-F1	ACTCTGGATGCCAACCGTTCCAG	1301 - 1323
	Fscn1-qRT-R1	AGCCACCTTATTGTAGTCACAGAAC	1456 - 1480
<i>Hprt1</i> (NM_013556.2)	Hprt1_F1	GGGACATAAAAGTTATTGGTGGAGATG	481 - 507
	Hprt1_R1	CAACAACAACTTGTCTGGAATTTCAA	688 - 714

*Positions are according to the published mRNA sequences.

第3項 結果

1. D2J マウスの聴力評価

D2J マウスの ABR 閾値のデータは、現在までに報告されているいくつかの研究グループ間で異なっていた [Zheng *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2010; Nagtegaal *et al.*, 2012]。そこで本研究では第一に D2J 系統の聴力レベルを評価・把握するため、8-, 16-および 32-kHz のトーンピップ音刺激による ABR 閾値を測定した。Figure 1 は生後 2 ヶ月齢の 8-, 16-および 32- kHz における B6J および D2J の ABR 反応波形を示した。B6J の反応波形においては、32-kHz では反応波形が減少していたが、すべての測定周波数において I-V 波の反応波形が検出された。一方、D2J マウスはすべての周波数において B6J と比較して V 波の欠失がみられ、また、反応波形の減少が認められた (Fig. 1)。次に、D2J マウスの 8-, 16-および 32-kHz のトーンピップ音刺激による平均 ABR 閾値を 1 ヶ月ごとに、生後 1 ヶ月齢~12 ヶ月齢において測定し、以前我々が報告した B6J のデータ [Miyasaka *et al.* 2013] と比較した (Table 4)。生後 1 ヶ月齢において、D2J マウスの平均 ABR 閾値は B6J マウスと比較してすべての周波数刺激において有意に高く、16-kHz においては高度 (71-90 dB SPL)、32-kHz においては重度 (>91 dB SPL) 難聴を発症していた (Fig. 2, Table 4)。また、DBA/2J の難聴は超音波、高、中および低周波数の順で急速に進行し、16-kHz においては生後

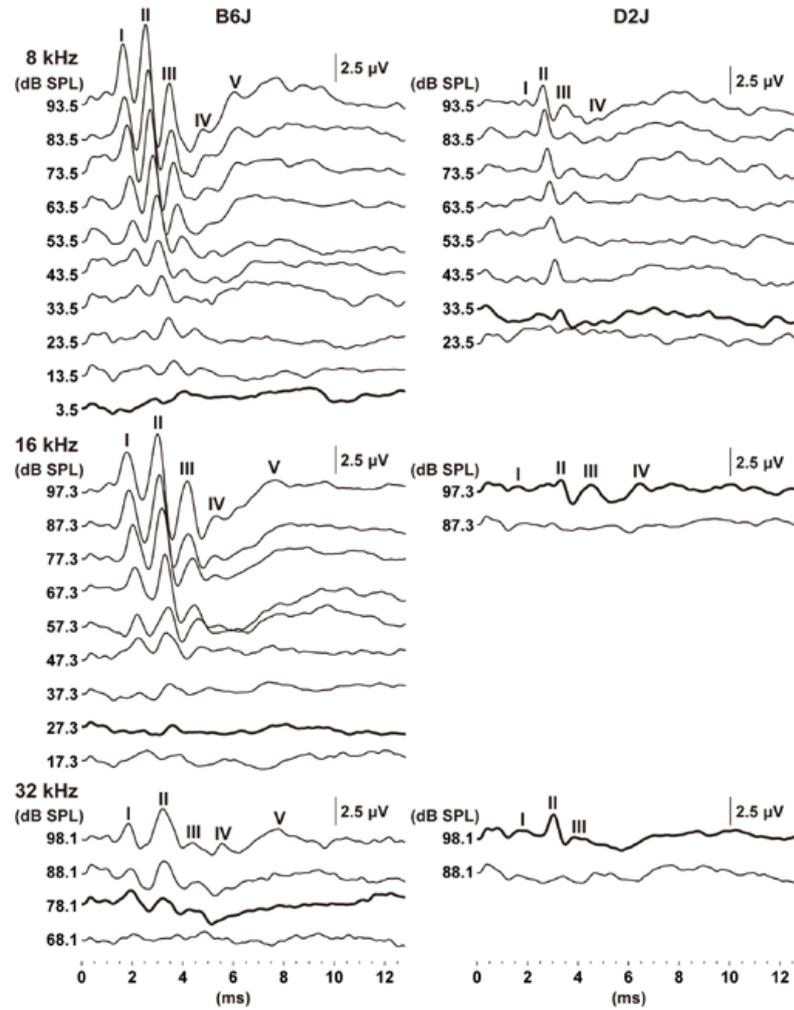


Fig. 1. Representative ABR waveforms at 8-, 16- and 32-kHz stimuli recorded from B6J and D2J mice at 2 months of age. The waveforms represent the ABR in response to the intensities of tone pip stimuli decreasing from 93.5 to 3.5 dB SPL at 8-kHz, from 97.3 to 17.3 dB SPL at 16-kHz and from 98.1 to 68.1 dB SPL at 32-kHz. Bold lines represent the detected thresholds. The locations of peaks I–V are indicated.

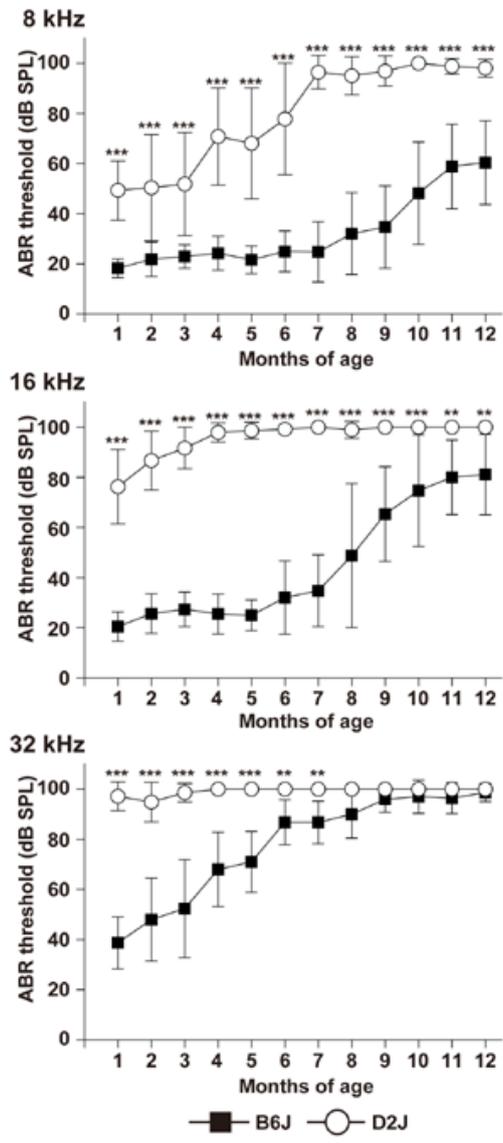


Fig. 2. Early-onset progressive hearing loss in D2J mice. The means (black squares in B6J and white circles in D2J) and SDs (error bars) of ABR threshold measurements for 8-, 16- and 32-kHz stimuli are shown for each mouse strain at 1 to 12 months of age. The number of ears tested is listed in Table 4. $P < 0.01$ and $***P < 0.001$.**

Table 4. Mean ABR thresholds of 8-, 16- and 32-kHz stimuli of D2J, B6J, BDF₁ and (BDF₁ × DBA/2J) N₂ mice at 3 months of age.

Mce	Month of age	<i>n</i>	ABR threshold ± Standard deviation (dB SPL)		
			8 kHz	16 kHz	32 kHz
DBA/2J	1	52	49.3 ± 11.8	76.3 ± 14.8	97.1 ± 5.7
	2	50	50.4 ± 21.2	86.7 ± 11.7	94.8 ± 7.8
	3	43	51.9 ± 20.5	91.6 ± 8.3	98.6 ± 3.7
	4	26	70.8 ± 19.4	97.9 ± 3.8	100.0
	5	18	68.1 ± 22.1	98.6 ± 3.4	100.0
	6	18	77.8 ± 22.3	99.2 ± 1.9	100.0
	7	14	96.4 ± 6.6	100.0	100.0
	8	9	95 ± 7.5	98.9 ± 3.3	100.0
	9	16	96.9 ± 6.0	100.0	100.0
	10	12	100.0	100.0	100.0
	11	12	98.8 ± 3.1	100.0	100.0
	12	10	98.0 ± 3.5	100.0	100.0
C57BL/6J	1	20	18.3 ± 3.7	20.5 ± 5.8	38.8 ± 10.4
	2	30	21.8 ± 6.9	25.7 ± 7.9	48.0 ± 16.5
	3	17	22.9 ± 4.7	27.4 ± 6.9	52.4 ± 19.5
	4	20	24.3 ± 6.7	25.5 ± 7.9	68.0 ± 14.8
	5	21	21.7 ± 5.6	25.0 ± 6.1	71.0 ± 12.1
	6	17	25.0 ± 8.1	32.1 ± 14.6	86.8 ± 9.0
	7	22	22.5 ± 5.1	32.5 ± 9.5	86.1 ± 8.2
	8	12	32.1 ± 16.3	48.8 ± 28.7	90.0 ± 9.5
	9	16	34.7 ± 16.4	65.3 ± 18.9	95.9 ± 5.2
	10	30	48.2 ± 20.4	74.7 ± 22.2	97.0 ± 6.6
	11	18	58.9 ± 16.9	80.0 ± 14.9	96.4 ± 6.1
	12	28	60.4 ± 16.7	81.1 ± 16.1	98.6 ± 3.6
BDF ₁	3	14	16.8 ± 10.1	21.4 ± 6.3	91.4 ± 7.4
(BDF ₁ × DBA/2J) N ₂	3	90	31.9 ± 20.5	62.1 ± 25.7	94.0 ± 7.8

3ヶ月齢、8-kHzにおいては生後7ヶ月齢で重度レベルの難聴に達していた (Fig. 2, Table 4)。これら本研究で測定した D2J マウスの ABR 閾値は先行研究と比較して僅かに高いが、聴力退行のパターンは類似していた [Zheng *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2010]。

2. D2J マウスの早発性 AHL の遺伝学的解析

これまでの研究によって D2J マウスの高周波数難聴は第 11 番染色体上の *ahl8* 遺伝子座 [Johnson *et al.*, 2008]、低周波数難聴は第 18 番染色体上の *ahl9* 遺伝子座 [Nagtegaal *et al.*, 2012] の感受性効果により発症することがともに B6J×D2J (B×D) リコンビナント近交系の解析により実証されている。本研究では D2J の早発性 AHL の他の遺伝的効果を検証するため、D2J マウスと B6J の交配によって F₁ マウスおよび N₂ マウスを作製し、B6J および D2J 間の聴力の有意差が大きい生後 3ヶ月齢の 8-, 16-および 32-kHz の刺激音に対する ABR 閾値を測定した。(B6J × D2J) F₁ マウスの 8-および 16-kHz の平均 ABR 閾値は 16.8 ± 10.1 dB SPL および 21.4 ± 6.3 dB SPL の値を示し、その値は B6J マウスの 平均 ABR 閾値 (8-kHz は 22.9 ± 4.7 dB SPL および 16-kHz は 27.4 ± 6.87 dB SPL) との統計学的な有意差は検出されなかった (Fig. 3A および Table 4)。また、(BDF₁ × D2J) N₂ マウスの 8-kHz および 16-kHz の平均 ABR 閾値は 31.9 ± 20.5 および 62.1 ± 25.7 dB SPL で

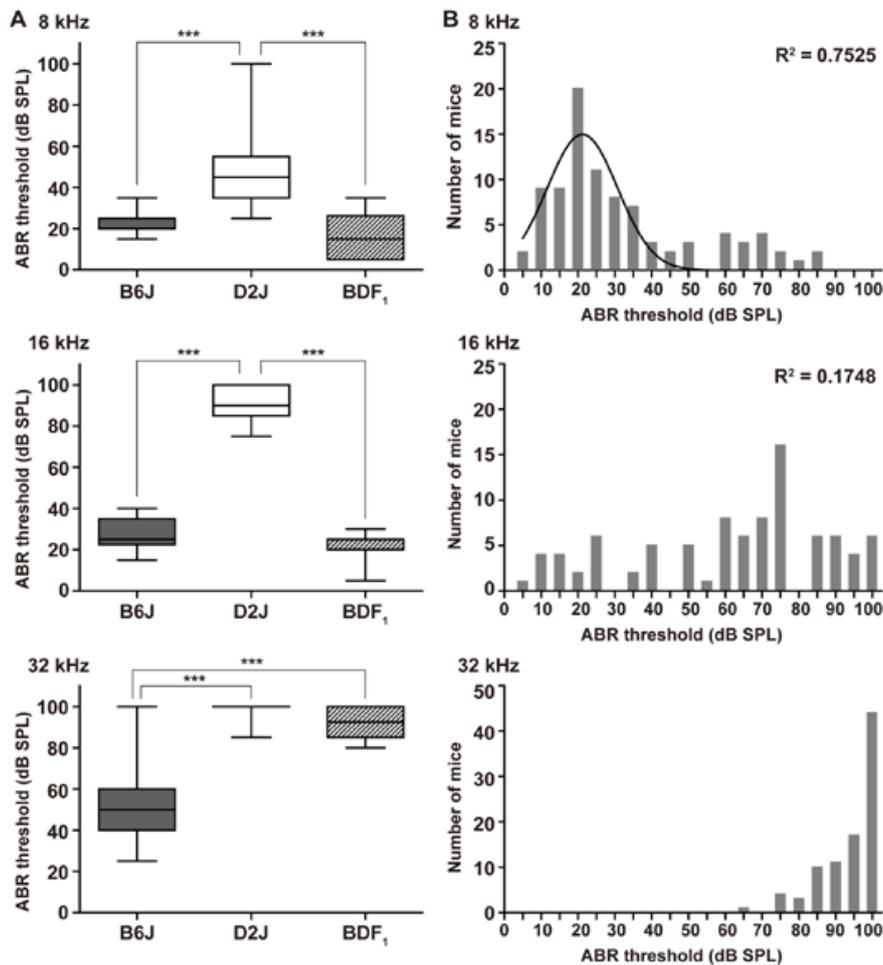


Fig. 3. Distributions of ABR thresholds in B6J, D2J, BDF₁ and (BDF₁ × D2J) N₂ mice.
(A) Distributions of ABR threshold measurements for 8-, 16- and 32-kHz stimuli in B6J, D2J and BDF₁ mice at 3 months of age. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001.
(B) Distributions of ABR thresholds for 8-, 16- and 32-kHz stimuli among the (BDF₁ × D2J) N₂ mice. The best-fit curves for a Gaussian distribution are shown in black. The regression coefficient for the curve is given as R² calculated by the D' Agostino and Pearson tests.

あり、B6J と比較し僅かに高い値を示した (Table 4)。また、(BDF₁ × D2J) N₂ マウスの 8-kHz における ABR 閾値は正規分布を示したが ($R^2 = 0.7525$)、N₂ 集団は低～高レベルの ABR 閾値まで幅広く分布していた (Fig. 3B)。一方、BDF₁ および (BDF₁ × D2J) N₂ の 32-kHz の平均 ABR 閾値においては、 91.4 ± 7.4 および 94.0 ± 7.8 dB SPL であり、D2J マウスの平均 ABR 閾値 (98.6 ± 3.7) と類似していた (Fig. 3A および Table 4)。このように F₁ および N₂ の ABR 閾値の結果は、D2J の難聴は周波数音域によって異なる QTL が関与することを示唆した。

次に、D2J の難聴における感受性遺伝子座を同定するため、N₂ マウスの ABR 閾値が正規分布を示した 8 および 16-kHz の難聴発症においてゲノムワイド QTL マッピングを行った。その結果、強い効果を示す QTL は第 11 番染色体上に 8-kHz において LOD スコア 5.02、および 16-kHz において LOD スコア 8.84 が検出された (Fig. 4A および Table 5)。その遺伝子座 (マーカー *D11Mit103*) は *ahl8* 遺伝子座が存在する領域であり、D2J マウスの難聴は *Fscn2^{ahl8}* ホモアレルが最も強く影響することが本研究においても再検証された。また、8-kHz においては、第 18 番染色体上の *ahl9* 遺伝子座を含み、他の染色体上から統計学的に有意な QTL は検出されなかったが、16-kHz の ABR 閾値を用いた解析によって第 5 番染色体上の 52.7–126.1 Mb 領域に位置する 12 マーカーにおいて統計学的に有意である LOD スコア 2.80–3.91 を示す QTL のピークが検出され (Fig. 4A および Table 5)、

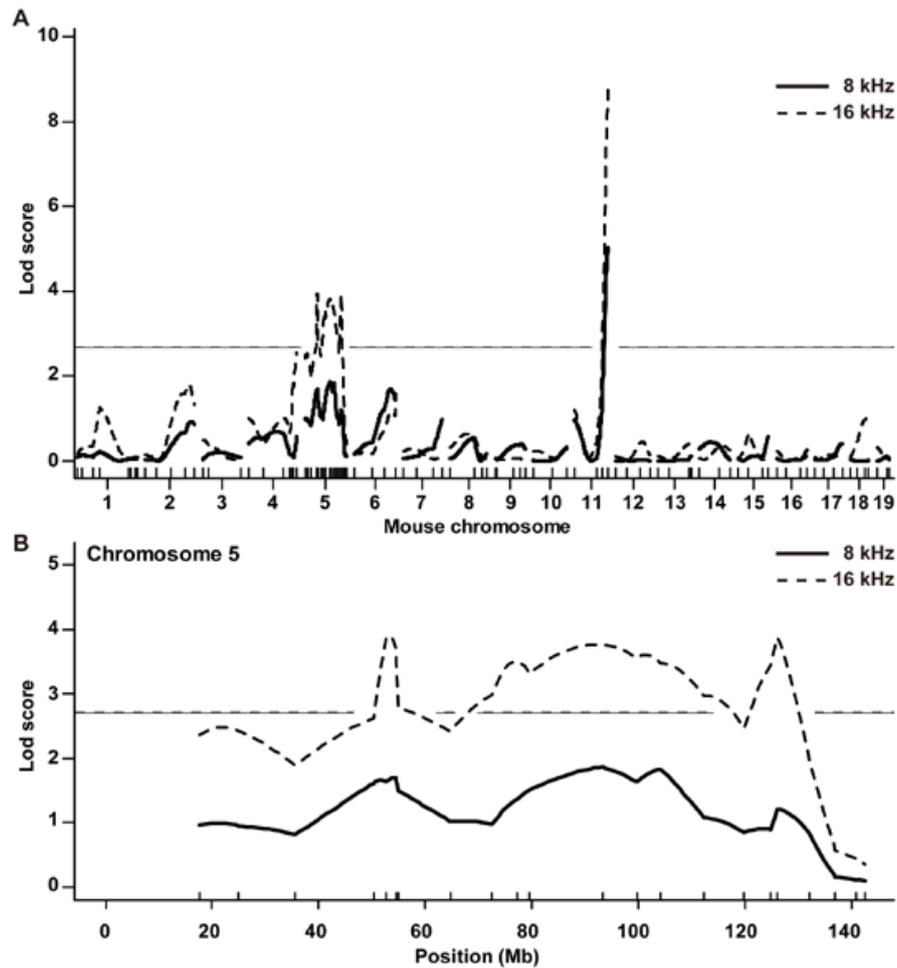


Fig. 4. Genome linkage analysis for early-onset hearing loss in D2J mice. (A) Genome-wide interval mapping for susceptibility genes associated with early-onset hearing loss for 8- (solid curve) and 16 (dotted curve)-kHz stimuli of the (BDF1 × D2J) N2 mice. Chromosome numbers and marker positions (vertical bars) are given below the linkage map. The horizontal lines indicate LOD significant thresholds at 8- (solid, LOD = 2.69) and 16 (dotted, LOD = 2.71) -kHz, respectively. (B) Magnified view of the significant QTLs at chromosome 5.

Table 5. Detected susceptibility QTLs to early-onset AHL in (BDF₁ × D2J) N₂ mice.

Frequency (kHz)	Chromosome	Marker name	Ensembl Position (bp)	Lod score
8	11	<i>D11Mit203</i>	116363361	4.95
	11	<i>D11Mit103</i>	117167319	5.02
16	5	<i>D5Mit233</i>	52697226	3.91
	5	<i>D5Mit300</i>	54486435	3.71
	5	<i>D5Mit255</i>	54954339	2.80
	5	<i>D5Mit336</i>	72488531	3.00
	5	<i>D5Mit113</i>	77255215	3.52
	5	<i>D5Mit309</i>	79502721	3.34
	5	<i>D5Mit7</i>	93297205	3.78
	5	<i>D5Mit155</i>	99690609	3.58
	5	<i>D5Mit10</i>	104239005	3.50
	5	<i>D5Mit24</i>	112317683	2.98
	5	<i>D5Mit95</i>	124829235	3.46
	5	<i>D5Mit214</i>	126090176	3.89
	11	<i>D11Mit203</i>	116363361	8.35
	11	<i>D11Mit103</i>	117167319	8.84

最も高い LOD スコア 3.91 を示す値は第 5 番染色体の *D5Mit233* マーカー近傍の QTL (52.7 Mb; Fig. 4B および Table 5) であり、*D5Mit214* (LOD スコア 3.89; 126.1 Mb) および *D5Mit7* (LOD スコア 3.78; 93.3 Mb) 近傍にも D2J の 16-kHz における難聴発症への関与が予想される候補 QTL 領域が検出された (Fig. 4B, Table 5)。一方、本研究は 32-kHz の ABR 閾値を用いた QTL 連鎖解析についても行ったが、 N_2 個体の ABR 閾値が一様に重度難聴を発症していたことから (Fig. 3B)、32-kHz の ABR 閾値を用いた解析においては統計学的に有意な LOD スコアは検出できなかった (Fig. 5)。

QTL 連鎖解析の結果、第 5 番染色体上の広範囲の領域に渡って QTLs が検出されたが (Fig. 4 および Table 5)、本研究で QTL 連鎖解析に用いたサンプルサイズが少ないこと、および第 5 番染色体上の QTLs が偽陽性である可能性も考えられたことから、*Fscn2^{ahl8}* および第 5 番染色体上の QTLs の効果を検証するため、(BDF₁ × D2J) N_2 マウスの表現型と遺伝子型の関連解析を行った。第一に、*Fscn2^{ahl8}* 近傍マーカーである *D11Mit103* を用いて、16-kHz の N_2 マウスにおける *Fscn2^{ahl8}* 効果の影響を再検証した。その結果、*Fscn2^{ahl8}* が D2J アレルすなわち DD ホモ接合体の遺伝子型を保有する多くの N_2 マウスは、高い ABR 閾値を示し (Fig. 6)、*Fscn2^{ahl8}* 遺伝子座が DB ヘテロ接合体の遺伝子型を示す N_2 マウスにおいても難聴発症する個体も現れたものの、*Fscn2^{ahl8}* 遺伝子座が DD 遺伝子型およ

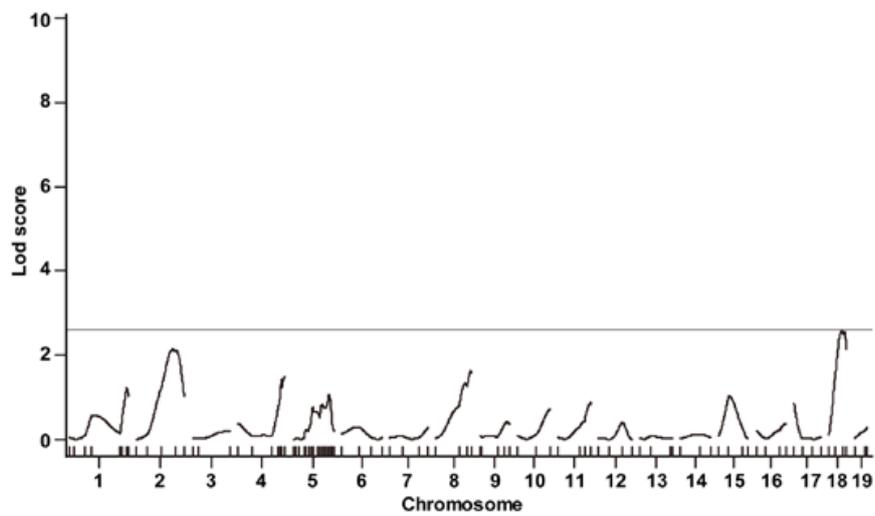


Fig. 5. Genome linkage analysis for early-onset hearing loss in D2J mice. Genome-wide interval mapping for susceptibility genes associated with early-onset hearing loss for 32-kHz stimuli of the (BDF₁ × D2J) N₂ mice. Chromosome numbers and marker positions (vertical bars) are given below the linkage map. The horizontal lines indicate LOD significant thresholds at 32 kHz (LOD = 2.60).

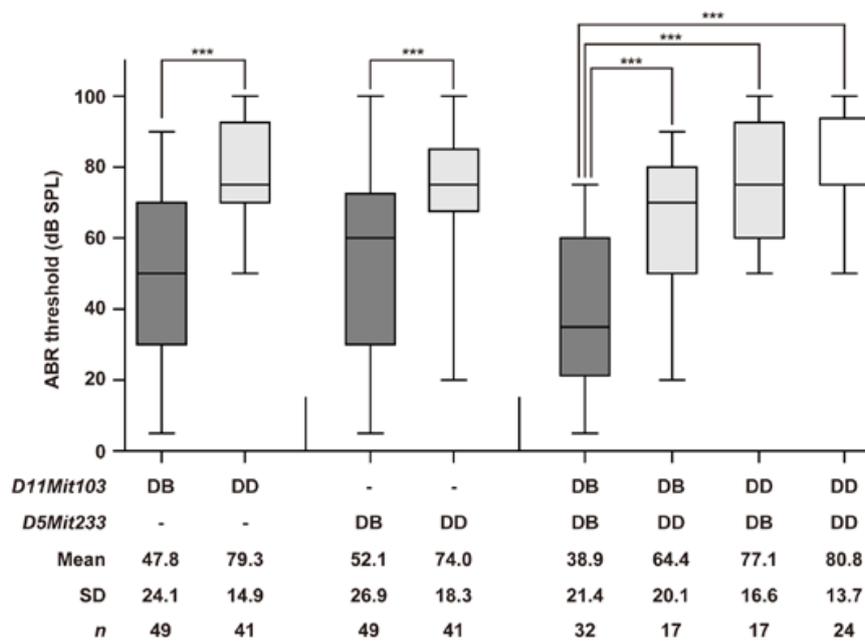


Fig. 6. Effects of the *Fscn2^{sh18}* locus and a susceptibility locus on chromosome 5 on ABR thresholds at 16-kHz in (BDF₁ × D2J) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively.

The *Fscn2^{sh18}* locus and a susceptibility locus on chromosome 5 are genotyped by *D11Mit103* and *D5Mit233*, respectively. ****P* < 0.001.

び DB 遺伝子型において統計学的に有意差が示された (平均値差: 31.5 dB SPL, $P < 0.001$, Fig. 6)。次に、QTL 連鎖解析の結果から、第 5 番染色体上で最も高い LOD スコアのピークを示したマーカーである *D5Mit233* の遺伝子型と ABR 閾値との関連解析を行った (Fig. 6 および Table 5)。*D5Mit233* の遺伝子型が DD 型および DB 型の ABR 閾値の平均値差は 21.9 dB SPL であった。その平均値差は *Fscn2^{ahl8}* の差と比較し減少していたが、統計学的に有意差が認められた (Fig. 6)。また、*D11Mit103* および *D5Mit233* における D2J アレル間の関連解析を行った結果、*D11Mit103* のみが DB ヘテロ接合体の遺伝子型をもつ群は *D11Mit103* および *D5Mit233* の両遺伝子座のアレルが DB ヘテロ接合体の遺伝子型をもつ群において難聴発症が軽減されていた (Fig. 6)。さらに、*D5Mit233* が DD ホモ接合体の遺伝子型の N₂ マウスは、*D11Mit103* の遺伝子型が DB ヘテロ接合体であっても ABR 閾値の平均値が高く、*D11Mit103* および *D5Mit233* の両方が DB ヘテロ接合体の遺伝子型の N₂ マウスと比較し統計学的に有意に高い ABR 閾値を示した (Fig. 6)。従って、*Fscn2^{ahl8}* 遺伝子型が DD ホモ接合体である場合は *D5Mit233* の効果は統計学的その効果は実証されなかったが、*D5Mit233* の DD ホモ接合体アレルが N₂ マウスの 16-kHz の難聴発症において影響を及ぼすことが示唆された (Fig. 6)。加えて、第 5 番染色体上の他の QTLs に関しても、同様に DD ホモ接合体アレルの感受性効果が観察された (Fig. 7)。また、*D11Mit103* および *D5Mit233* の両方

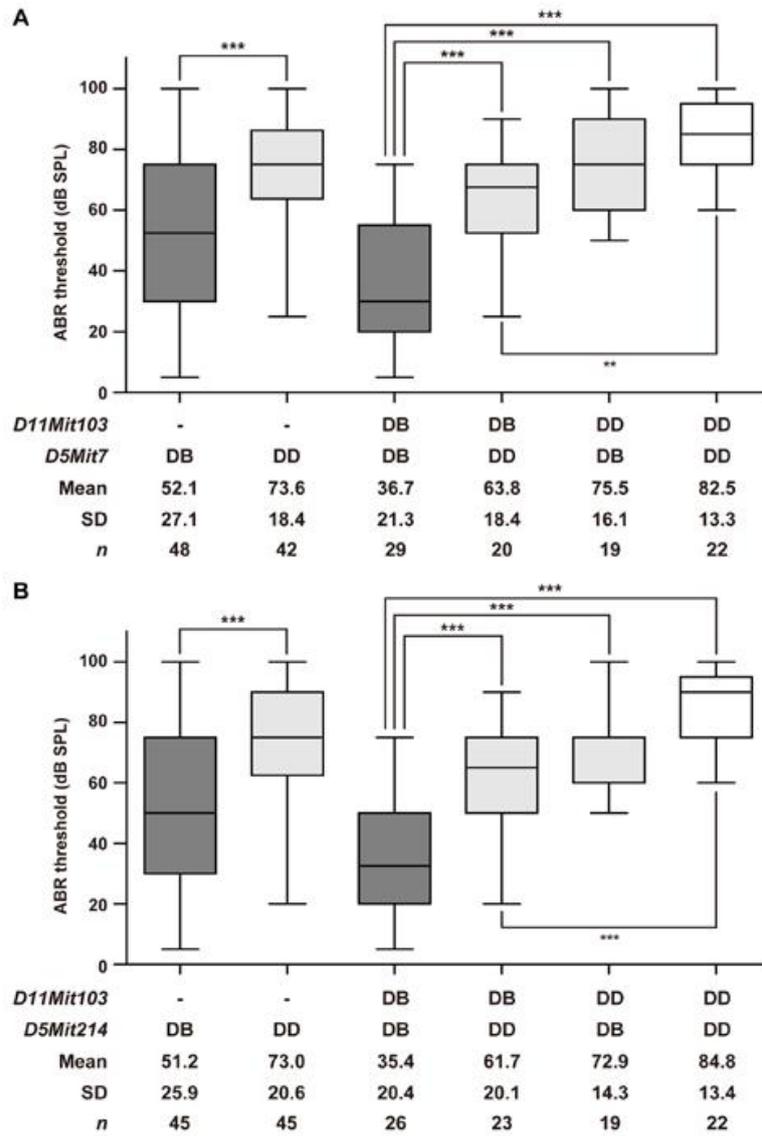


Fig. 7. Effects of the *Fscn2^{ah18}* locus and a susceptibility locus on chromosome 5 on ABR thresholds at 16-kHz in (BDF₁ × D2J) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively.

The *Fscn2^{ah18}* locus and a susceptibility locus on chromosome 5 are genotyped by *D11Mit103*, *D5Mit7* (A), and *D5Mit214* (B), respectively. ***P* < 0. 01 and ****P* < 0.001.

の遺伝子型が DD 型の個体群の ABR 閾値は、単独で *D11Mit103* の遺伝子型が DD 型の N₂ マウスにと比較し最も高い値を示し最も高い LOD スコア 3.91 が検出された (Fig. 6)。

3. D2J マウスの難聴発症に関与する QTL の候補遺伝子の解析

第 5 番染色体上には、難聴に関連する機能を持った遺伝子が多く存在する [The Jackson Laboratory, Hereditary Hearing Impairment in Mice: [http:// hearingimpairment.jax.org/](http://hearingimpairment.jax.org/)]. また、D2J マウスは、内耳有毛細胞の感覚毛の異常を示し、高周波数の聴力を規定する蝸牛基底回転の感覚毛に異常を示すことが知られていることから [Perrin *et al.*, 2013; Shin *et al.*, 2010]、本研究では、第 5 番染色体上に存在し、内耳有毛細胞の感覚毛の発達および維持に関連することが知られている *Ucn*, *Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1*, *Fscn1* および *Actb* の 6 遺伝子 [Vetter *et al.*, 2002; Odeh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013; Horn *et al.*, 2013; Avenarius *et al.*, 2014; Perrin *et al.*, 2010] を候補遺伝子とし、D2J および B6J の塩基配列の決定・比較による遺伝的変異のスクリーニングを実施した。しかし、決定した翻訳領域を含むすべての配列において D2J および B6J マウス系統間における配列の変異は検出されなかった。

次に、これらの遺伝子の発現が発現調節領域であるシス活性エレメントの変

異に起因し変動した可能性を考慮し、生後3週齢のD2JおよびB6Jの蝸牛から単離したRNAを用いてqRT-PCR解析により遺伝子発現差の存在の有無を検証した。また、*Ucn*については両マウスの蝸牛から単離したRNAにおいてRT-PCRの結果からバンドが検出されなかったため、本解析から除外し、*Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1*, *Fscn1* および *Actb* の5遺伝子においてqRT-PCRを実地した。その結果、*Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1* および *Actb* 遺伝子においては、D2JおよびB6J間で統計学的な有意差は示されなかったが、*Grxcr1* が約1.5倍減少し、*P2rx2* 遺伝子においてD2Jマウスの発現がB6Jより約1.7倍増加していることが明らかになった (Fig. 8)。一方、*Fscn2* と同じFascinファミリーのメンバーである *Fscn1* 遺伝子 [Hashimoto *et al.*, 2011] においてはD2Jマウスの発現がB6Jより約2.0倍減少し、統計学的に有意差が検出されたが (Fig. 8A)、QTL連鎖解析によって同定された統計学的に有意なQTL領域に *Fscn1* は存在せず、*Fscn1* 近傍領域のLODスコアは極めて低い値であった (LODスコア0.4–0.5; Fig. 8B)。

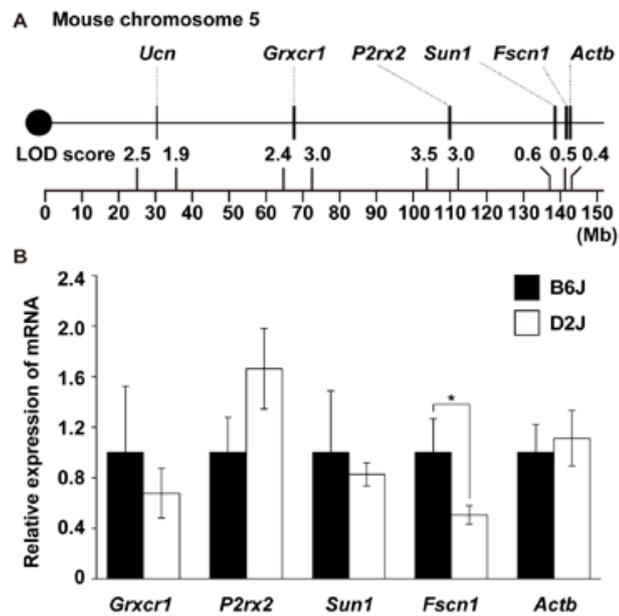


Fig. 8. Expression analysis of five selected candidate genes associated with the degeneration of stereocilia of the inner ear hair cells on chromosome 5. (A) The chromosomal locations of five candidate genes, *Grxcr1*, *P2rx2*, *Sun1*, *Fscn1* and *Actb*, for the susceptibility to early-onset PHL in D2J mice. The LOD scores (16-kHz) of markers in the vicinity of their candidate genes are indicated.

(B) The relative levels of mRNA in the cochlea of B6J (black bars) and D2J (white bars) mice at 3 weeks of age. mRNA expression was detected using real-time quantitative RT-PCR analysis.

*** $P < 0.05$.**

第4項 考察

D2J マウスは早発性 AHL を発症するモデルマウスであり、本研究では、D2J マウスが超音波周波数でより高い ABR 閾値を示し、超音波周波数から中程度周波数にかけて難聴発症が進行することを証明した (Fig. 1, 2 および Table 4)。また、以前に実施された D2J の遺伝学的解析において D2J の早発性 AHL は *Cdh23^{ahl}* および *Fscn2^{ahl8}* が支配していることが報告されており [Johnson *et al.*, 2008]、本研究で実施した (BDF₁ × D2J) N₂ マウスを用いた QTL 連鎖解析においても第 11 番染色体上の *Fscn2^{ahl8}* が 8 および 16-kHz の難聴発症において統計学的に有意に影響することが確認された (Fig. 4, Table 5)。さらに、QTL 連鎖解析により 16-kHz において統計学的に有意に影響する QTLs が第 5 番染色体上から検出された。それら第 5 番染色体上の QTLs は、染色体上に広範囲に認められ、特に *D5Mit233* (52.7 Mb) および *D5Mit214* (126.1 Mb) を頂点とした鋭いカーブ曲線を描くピークと、*D5Mit7* (93.3 Mb) を頂点とした緩やかな交配したカーブを描く QTL ピークの 3 つが主要な QTL として検出された。それら 3 つの QTLs のうち、第 5 番染色体上末端領域 (119.9–137.0 Mb) は、以前に実施された B×D リコンビナント近交系統を用いた遺伝解析の結果においても検出されている [Johnson *et al.*, 2008; Nagtegaal *et al.*, 2012]。本研究で作製した N₂ マウスは第 5 番染色体の QTL

領域の組み換え体が多く得られず、QTLs 間の相互作用解析に対して不十分であったため、検出した QTLs が D2J の難聴に相加的、もしくは非相加的に作用するかを判断することはできなかったが、第 5 番染色体におけるそれぞれの QTL の単独効果が 16-kHz の早期難聴発症において観察され (Fig. 4, 6 および 7)、これら第 5 番染色体上の QTL が D2J マウスの難聴発症に関与する可能性が強く示唆された。

哺乳類の聴覚システムは、複数の周波数成分を含み複合された空気から組織された音を分離し認知する [Mann and Kelley, 2011]。この過程は聴覚感覚上皮レベルから始まり、低、中、高および超音波周波数は、それぞれ哺乳類の蝸牛の頂回転、中回転および基底回転により周波数特異的に受容される [Müller *et al.*, 2005; Mann and Kelley, 2011]。また、マウスを用いた周波数特異的難聴に関与する QTL についての解析も報告されており [Keller *et al.*, 2011, 2012]、D2J マウスは周波数により異なる QTL を有する典型的モデルマウスであることが示された。実際に Nagtegaal ら [Nagtegaal *et al.*, 2012] は D2J マウスの早発性高周波数難聴において *Cdh23^{ahl}* および *Fscn2^{ahl8}* アレルが影響することを示し、D2J マウスの低～中程度周波数 (4 kHz) の聴力のみに影響を与える第 18 番染色体上の *ahl9* 遺伝子座の存在を報告している。本研究では、第 5 番染色体上の QTLs が高周波数 (16-kHz) のみに影響することを示した。さらに、*Fscn2^{ahl8/+}*ヘテロ接合体の BDF₁

と (BDF₁ × D2J) N₂ マウスは生後 3 ヶ月齢で重度な難聴発症することから *Fscn2^{ahl8}* アレルの効果は超音波周波数 (32-kHz) の早発性難聴においては低い可能性を示した (Fig. 3)。超音波周波数 (32-kHz) に効果を及ぼす主要感受性因子の一つは、BDF₁ および (BDF₁ × D2J) N₂ マウスのすべてがホモ接合体で保有する *Cdh23^{ahl}* アレルであると考えられる。しかし、BDF₁ および (BDF₁ × D2J) N₂ マウスは D2J と類似した深刻な難聴を示し、B6J と比較して ABR 閾値が極めて高く (Fig. 3)、このことから、超音波周波数の早発性難聴には *Cdh23^{ahl}* アレルに加え、優性の修飾遺伝子が効果をもつ可能性が推察された。

本研究において同定された第 5 番染色体上の QTLs 領域には、D2J および B6J 間において異なる多くの遺伝子で多くの遺伝的多型の存在が報告されている [Wellcome Trust Sanger Institute, Mouse Genomes Project: <http://www.sanger.ac.uk/resources/mouse/genomes/>]. これらの遺伝子うち、本研究では蝸牛有毛細胞の感覚毛に発現する 6 つの遺伝子 [Vetter *et al.*, 2002; Odeh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2013; Horn *et al.*, 2013; Avenarius *et al.*, 2014; Perrin *et al.*, 2010] に注目して変異スクリーニングおよび発現解析を行った。6 つの遺伝子のうち *Fscn1* は *Fscn2* 遺伝子のパラログ遺伝子であり、*Fscn2* と同様にアクチンフィラメントのクロスリンカーに結合するため、機能的に強力な候補遺伝子である [Hashimoto *et al.*, 2011]。また、*Actb* 遺伝子も機能的に候補遺伝子であった。*Actb-flox Foxg1-cre* マウスは加

齢に伴い感覚毛異常を示し、D2J マウスの表現型と類似した短い感覚毛の表現型を示す [Perrin *et al.*, 2010]。これらの遺伝子においてはコーディング領域に変異は検出されなかったが、*Fscn1* 遺伝子の転写物における発現解析の結果、D2J マウスの蝸牛において統計学的に有意に減少していた (Fig. 8B)。しかし、QTL 関連解析の結果、*Fscn1* 遺伝子近傍領域のマーカールにおける LOD スコアは 0.4–0.5 と極めて低い値が示された (Fig. 8A)。*Fscn1* は内耳有毛細胞の感覚毛束に豊富に局在する蛋白質であることが感覚毛のプロテオーム解析により明らかとなっている [Shin *et al.*, 2013]。従って、本研究で検出された D2J の蝸牛における *Fscn1* の発現減少は、D2J の感覚毛が構造的な欠陥に起因することが推測された。加えて、第 5 番染色体上の他の遺伝子について、遺伝子変異および有意な発現量差を検出することができなかった。

一方、第 5 番染色体上には早発性 AHL を示す NOD/ShiLtJ マウスの難聴と関連し、LOD スコア 5.5 のピークを示した遺伝子座である *ahl2* (*D5Mit309*: 79.5 Mb) がマップされている [Johnson and Zheng, 2002]。(BDF₁ × D2J) N₂ マウスを用いた QTL 連鎖解析により、16-kHz において *D5Mit309* は LOD スコア 3.34 を示し (Table 5)、一つの QTL 領域 (64.6–119.9 Mb) には *D5Mit309* すなわち *ahl2* も含まれていた (Fig. 4B)。従って、この QTL は *ahl2* 遺伝子座と同一の劣性難聴遺伝子であり、D2H および NOD/ShiLtJ マウスが共通した QTL の効果によって難聴を発症

する可能性も考えられた。

ヒトにおいて、マウスの第 5 番染色体とシンテニー領域には数種の難聴に関連する遺伝子座がマップされている [Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org/>]. これらの遺伝子座のうち、本研究で同定された 64.6–119.9 Mb の QTL 領域にはヒトのシンテニー領域において *DFNB40* および *DFNB55* の 2 つの劣性の非症候性遺伝子座が存在し、両遺伝子座が同定された家系の難聴患者は早発性 AHL を発症する [Delmaghani *et al.*, 2003; Irshad *et al.*, 2005]. また、この QTL 領域は優性早発性 AHL 遺伝子座 *DFNA27* ともオーバーラップしていた [Peters *et al.*, 2008]. それら難聴遺伝子座の原因となる変異は明らかになっていないが、D2J の早発性 AHL に関与する QTL の原因となる変異を今後の解析で同定することにより、これらのヒト遺伝子座の変異のクローニングに有用な情報を提供することも考えられた。

第2章 NOD/Shi マウス系統の先天性難聴の遺伝的要因の同定

第1項 緒論

Non-obese diabetic (NOD) マウス系統は自己免疫性の多因子疾患モデルマウスであり、I型糖尿病 [Rothe *et al.*, 2001; Ikegami *et al.*, 2003] およびシェーグレン症候群 [van Blokland and Versnel, 2002; Ding *et al.*, 2006] のモデルとして確立されており、このような疾患の原因は、複数の遺伝的要因および環境危険要因の複雑な相互作用によるものと考えられており [Maier *et al.*, 2005]、解析が進んでいる NOD マウスの I型糖尿病の遺伝的要因は主要な原因遺伝子である主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC) に加え [Todd *et al.*, 1987]、強弱様々な効果を示すマイナーQTL の相加的効果であることが明らかとなっている。また、NOD の垂系統である NOD/ShiLtJ マウス系統は生後 3 ヶ月齢において重度な難聴発症を示し、早発性 age-related hearing loss (AHL) を示す近交系マウスであることが報告されている [Zheng *et al.*, 1999]。さらに、NOD/ShiLtJ 系統にマウス MHC 正常アレル (ハプロタイプ) を導入し、糖尿病を含む自己免疫疾患を発症しない NOD.NON-*H2^{nb1}*/LtJ コンジェニックマウスを用いた解析において、そのコンジェニックマウスが進行性難聴を発症すること

から [Ohlemiller *et al.*, 2008]、NOD/ShiLtJ マウスは、I 型糖尿病および自己免疫疾患とは分離した非症候性群難聴のモデルマウスであると考えられている。さらに、NOD.NON-*H2^{mb1}*/LtJ コンジェニックマウスは難聴の病理学として、生後 2 ヶ月齢で異常な内耳の蝸牛内電位 (EP) を示し、蝸牛の正常 EP を維持する血管条の異常、さらに有毛細胞および神経細胞死が観察されている [Ohlemiller *et al.*, 2008]。一方、NOD/ShiLtJ の早発性 AHL の遺伝的要因として、NOD/ShiLtJ は序章で述べた B6J および D2J マウス同様に *Cdh23^{ahl}* アレルをホモで保有しており [Noben-Trauth *et al.*, 2003]、さらに、第 5 番染色体上における *ahl2* 遺伝子座の効果によって難聴発症が早期化されることが報告されている [Johnson and Zheng, 2002]。

第 1 章において述べたように、本研究で行った D2J マウスの遺伝学的解析の結果、D2J マウスの早発性難聴には第 5 番染色体上に 3 つの QTL が関与することが明らかとなり、そのうちの 64.6~119.9 Mb に同定された QTL は、NOD/ShiLtJ マウスの順遺伝学的解析により同定されている *ahl2* 遺伝子座領域 (79.5 Mb) とオーバーラップしていた。このデータは両系統の難聴発症が第 5 番染色体上の共通した QTL によって支配されていることを示唆している。そこで、本研究では NOD/ShiLtJ 系統の起源である NOD/Shi 系統を用いて聴覚機能の表現型および遺伝学的解析によって *ahl2* 領域の詳細な難聴発症感受性遺伝子座の同定を目的

に研究を実施した。

第2項 材料および方法

1. マウス

NOD/ShiJcl (NOD) および B6J 系統は日本クレア (Tokyo, Japan) から購入し、公益財団法人東京都医学総合研究所の動物施設において飼育維持した。また、MSM/Ms (MSM) マウスは国立遺伝学研究所から東京都医学総合研究所に導入された個体を用いた。すべての動物実験は文部科学省が定めた研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省告示第七十一号）および日本学術会議により定義された動物実験指針のガイドラインに従って定義された財団法人東京都医学総合研究所の実験動物委員会および臨死委員会の承認を受け実施した。

2. 聴力測定

NOD マウスの聴力は ABR 閾値を測定することにより判定した。その方法は第1章第2項に記載した方法に準じて実施し、左右耳から得られた ABR 閾値は1個体のデータとした。

3. 組織学的解析

組織学的解析を実施するため、1, 2, 3 および 4 ヶ月齢の NOD および 1 ヶ月齢

の MSM マウスはドラフト内で 2.5% グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸バッファ
ー (pH 7.4) で灌流後内耳を摘出した。摘出した内耳は 27 ゲージの針を用いてそ
の蝸牛頂回転に小さい穴を空け、2.5% グルタルアルデヒドで再度灌流し、4°C
で一晩固定した。翌日、蝸牛サンプルは血管条、ライスネル膜、蓋膜を除去し
た後、0.1 M リン酸バッファ (pH 7.4) で 15 分間、3 回洗浄し、1% (w/v) 四酸
化オスミウム (Wako, Tokyo, Japan) に 1 時間 4°C で浸透させた。その後、エタノ
ールで段階的に脱灰し、最後に t-ブチルアルコールに変換させた。次に、サンプ
ルは凍結乾燥器 (Hitachi ES-2020, Hitachi High-Tech Fielding Corporation, Tokyo,
Japan) で乾燥し、オスミウムプラズマコーター (NL-OPC80; Nippon Laser and
Electronics Laboratory, Nagoyashi, Japan) によりサンプルを四酸化オスミウムに
よりコーティング後、10 kV の電位で加速させた条件で Hitachi S-4800 走査型電
子顕微鏡を用いて観察した。

4. QTL 連鎖解析

NOD マウスの早発性 AHL に関与する感受性遺伝子座のマッピングのため、
本研究では B6J 系統を用い、(NOD × B6J) F₁ (BNF₁) × NOD 戻し交配個体 (N₂) を
作製した。作製した 179 個体の N₂ マウスの DNA は、Table 6 に示した本研究に
おいて新たに既存の難聴遺伝子のイントロン領域に作製したマイクロサテライ

Table 6. Information of primers for PCR of *Acbd6*, *Slc19a2*, *Lmx1a*, *Igf1*, *Slc17a8*, *Ptprq* and *Msr3*.

Gene symbol	Primer name	Primer sequence (5' - 3')
<i>Acbd6</i>	Acbd6_F	GCAGAAGCAGCTGGGCAGAATGG
<i>Acbd6</i>	Acbd6_R	GGACTTCTGGCCTACAGAGATG
<i>Slc19a2</i>	Slc19a2_F	CCAACTCACCTATGTATGGTCC
<i>Slc19a2</i>	Slc19a2_R	AGTGAAAACATGGTGGGTCCAG
<i>Lmx1a</i>	Lmx1a_F	CACGCACACATATCACATGCAT
<i>Lmx1a</i>	Lmx1a_R	GCTGGTAAAAGGACAAAGACAGG
<i>Igf1</i>	Igf1_F	CAGAAGCATGGGTAAATTCATGG
<i>Igf1</i>	Igf1_R	CCCACACATGTATGCATGTGTA
<i>Slc17a8</i>	Slc17a8_F	ATCATGGGAACCTTTCCTCCTGC
<i>Slc17a8</i>	Slc17a8_R	AAGGCTCCCACGAGTGAGCTAC
<i>Ptprq</i>	Ptprq_F	AAAGATTGTTACCTCCTACGCTC
<i>Ptprq</i>	Ptprq_R	AACCTACTTCCTACCCTAATTC
<i>Msr3</i>	Msr3_F	GTCCTTAGAGTAAGTGAGGATTAC
<i>Msr3</i>	Msr3_R	AAAGCACACAACCTCTGGTGCA

トマーカ、および Table 7 に示した Mit マーカを用いて第 1 章第 2 項に記載した方法に準じて遺伝子型を判定した。また QTL 連鎖解析および統計学的解析についても第 1 章第 2 項に記載した方法に従って実施した。

Table 7. Microsatellite markers used in genetic mapping of the susceptibility locus associated with congenital hearing loss in NOD/Shi mice.

Chromosome	Marker name	Ensembl Position (bp)	Chromosome	Marker name	Ensembl Position (bp)
1	<i>D1Mit294</i>	11741307	9	<i>D9Mit205</i>	37298324
1	<i>D1Mit373</i>	26478481	9	<i>D9Mit4</i>	52123178
1	<i>D1Mit478</i>	51924866	9	<i>D9Mit21</i>	57684209
1	<i>D1Mit134</i>	80267876	9	<i>D9Mit113</i>	85796734
1	<i>D1Mit48</i>	88568240	9	<i>D9Mit51</i>	106412277
1	<i>D1Mit135</i>	105309586	9	<i>D9Mit120</i>	118937878
1	<i>D1Mit288</i>	149342472	10	<i>D10Mit1009</i>	5807258
1	<i>D1Mit206</i>	173004198	10	<i>D10Mit206</i>	14105840
1	<i>D1Mit459</i>	187647303	10	<i>D10Mit189</i>	18383585
2	<i>D2Mit1</i>	3886089	10	<i>D10Mit223</i>	68212192
2	<i>D2Mit32</i>	25346284	10	<i>D10Mit259</i>	72676559
2	<i>D2Mit433</i>	57297111	10	<i>D10Mit42</i>	82655104
2	<i>D2Nds1</i>	93591138	10	<i>D10Mit180</i>	118150611
2	<i>D2Mit42</i>	104610298	11	<i>D11Mit79</i>	19745817
2	<i>D2Mit346</i>	179031854	11	<i>D11Mit188</i>	45332932
3	<i>D3Mit60</i>	6808535	11	<i>D11Mit164</i>	56973201
3	<i>D3Mit92</i>	26182244	11	<i>D11Mit279</i>	71700989
3	<i>D3Mit184</i>	53207002	11	<i>D11Mit124</i>	99190655
3	<i>D3Mit7</i>	60209895	11	<i>D11Mit103</i>	117167319
3	<i>D3Mit101</i>	96641414	12	<i>D12Nds11</i>	17546446
3	<i>D3Mit89</i>	156837105	12	<i>D12Mit83</i>	26235177
4	<i>D4Mit101</i>	9702613	12	<i>D12Mit2</i>	41646392
4	<i>D4Mit2</i>	25683240	12	<i>D12Mit158</i>	82619016
4	<i>D4Mit108</i>	38372089	12	<i>D12Mit141</i>	110503125
4	<i>D4Mit139</i>	55250930	13	<i>D13Mit205</i>	6077760
4	<i>D4Mit17</i>	63365294	13	<i>D13Mit17</i>	21293266
4	<i>D4Mit52</i>	114800671	13	<i>D13Mit91</i>	46822852
4	<i>D4Mit339</i>	134367426	13	<i>D13Mit13</i>	56481436
4	<i>D4Mit42</i>	151569994	13	<i>D13Mit191</i>	84905880
5	<i>D5Mit331</i>	4246959	13	<i>D13Mit293</i>	112745437
5	<i>D5Mit48</i>	8797672	14	<i>D14Mit110</i>	8159438
5	<i>D5Mit348</i>	24919119	14	<i>D14Mit11</i>	12089820
5	<i>D5Mit352</i>	35614967	14	<i>D14Mit141</i>	46759537
5	<i>D5Mit81</i>	50331325	14	<i>D14Mit193</i>	71521620
5	<i>D5Mit233</i>	52697226	15	<i>D15Mit174</i>	3444907
5	<i>D5Mit300</i>	54486435	15	<i>D15Mit179</i>	13489923
5	<i>D5Mit255</i>	54954339	15	<i>D15Mit60</i>	44264658
5	<i>D5Mit197</i>	64649088	15	<i>D15Mit261</i>	80236267
5	<i>D5Mit113</i>	77255215	15	<i>D15Mit79</i>	103472156
5	<i>D5Mit309</i>	79502721	16	<i>D16Mit182</i>	5682496
5	<i>D5Mit205</i>	93132927	16	<i>D16Mit108</i>	6248008
5	<i>D5Mit7</i>	93297205	16	<i>D16Mit4</i>	36240487
5	<i>D5Mit275</i>	103997680	16	<i>D16Mit139</i>	65669517
5	<i>D5Mit95</i>	124829235	16	<i>D16Mit19</i>	78811756
5	<i>D5Mit214</i>	126090176	17	<i>D17Mit164</i>	3924615
5	<i>D5Mit189</i>	126730335	17	<i>D17Mit246</i>	8459684
5	<i>D5Mit97</i>	137003596	17	<i>D17Mit46</i>	25365940
5	<i>D5Mit31</i>	138556974	17	<i>D17Mit31</i>	34744039
5	<i>D5Mit101</i>	141714580	17	<i>D17Mit89</i>	63639035
5	<i>D5Mit122</i>	150116320	17	<i>D17Mit142</i>	78965900
6	<i>D6Mit86</i>	4464884	17	<i>D17Mit154</i>	91585552
6	<i>D6Mit268</i>	34734663	18	<i>D18Mit111</i>	21513305
6	<i>D6Mit74</i>	48726556	18	<i>D18Mit177</i>	40982507
6	<i>D6Mit19</i>	77554468	18	<i>D18Mit184</i>	66819243
6	<i>D6Mit55</i>	114282098	18	<i>D18Mit4</i>	84126264
6	<i>D6Mit220</i>	134184701	19	<i>D19Mit59</i>	5321112
6	<i>D6Mit200</i>	145935340	19	<i>D19Mit128</i>	17250645
7	<i>D7Mit340</i>	4627246	19	<i>D19Mit60</i>	20562164
7	<i>D7Mit267</i>	29546946	19	<i>D19Mit30</i>	26810053
7	<i>D7Mit91</i>	58499072	19	<i>D19Mit10</i>	47152792
7	<i>D7Mit30</i>	81485676			
7	<i>D7Mit328</i>	110302821			
7	<i>D7Mit281</i>	112212330			
8	<i>D8Mit155</i>	4976602			
8	<i>D8Mit172</i>	17804003			
8	<i>D8Mit94</i>	31341658			
8	<i>D8Mit8</i>	64737134			
8	<i>D8Mit50</i>	89351668			
8	<i>D8Mit156</i>	128895504			

第 3 項 結果

1. NOD マウスの聴力評価と内耳の表現型解析

本研究において測定した NOD マウスの ABR 閾値の結果は、以前報告された NOD/ShiLtJ のデータ [Zheng *et al.*, 1999; Johnson and Zheng, 2002] とは異なっていた。Figure 9 は生後 1 ヶ月齢の B6J および NOD マウスにおける 4-, 8-, 16-および 32-kHz の音刺激による ABR 反応波形を示した。その結果、低～中程度周波数である 4-および 8-kHz において B6J マウスの波形が I～V 波まで検出されたのに対し、NOD マウスにおいて検出された波形は I～III 波のみであった。また、B6J においては 4-kHz において 60 dB SPL、8-kHz において 30 dB SPL の音刺激を認識していたのに対し、NOD マウスは 90 dB SPL で ABR の反応波形が消失していた (Fig. 9)。さらに高周波～超音波周波数である 16-および 32-kHz においては、100 dB SPL の音刺激に対しても ABR 波形は検出されず、この音域において NOD マウスは重度難聴を発症していることが明らかとなった (Fig. 9)。次に、NOD マウスの ABR 平均閾値を 1 ヶ月ごと生後 1 ヶ月齢～6 ヶ月齢において 4-, 8-, 16-および 32-kHz の音刺激に対する ABR 閾値を測定し、B6J マウスの閾値 (Table 4; Miyasaka *et al.*, 2013) と比較した (Fig. 10 および Table 8)。その結果、生後 1 ヶ月齢において B6J マウスの 4-, 8-, 16-および 32-kHz における ABR 閾値は 39.3

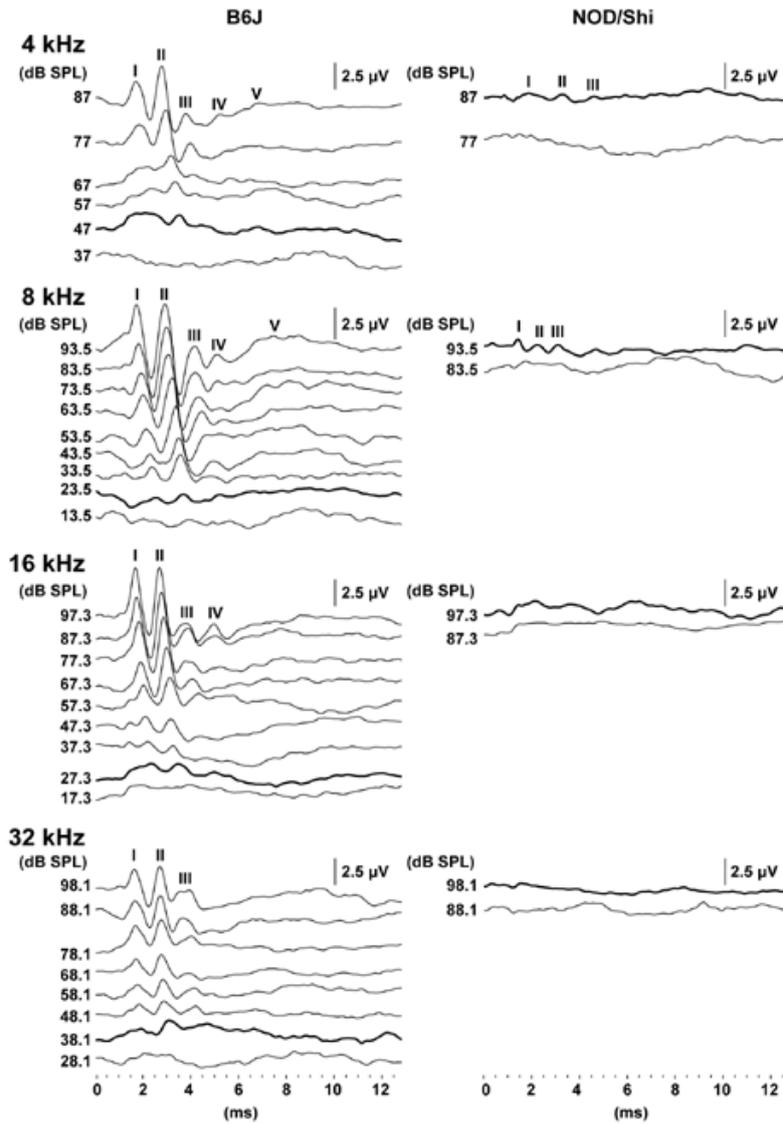


Fig. 9. Representative ABR waveforms at 4-, 8-, 16- and 32-kHz stimuli recorded from B6J and NOD/Shi mice at 1 months of age. The waveforms represent the ABR in response to the intensities of tone pip stimuli decreasing 87.0 to 37.0 dB SPL at 4-kHz, from 93.5 to 13.5 dB SPL at 8-kHz, from 97.3 to 17.3 dB SPL at 16-kHz and from 98.1 to 28.1 dB SPL at 32-kHz. Bold lines represent the detected thresholds. The locations of peaks I–V are indicated.

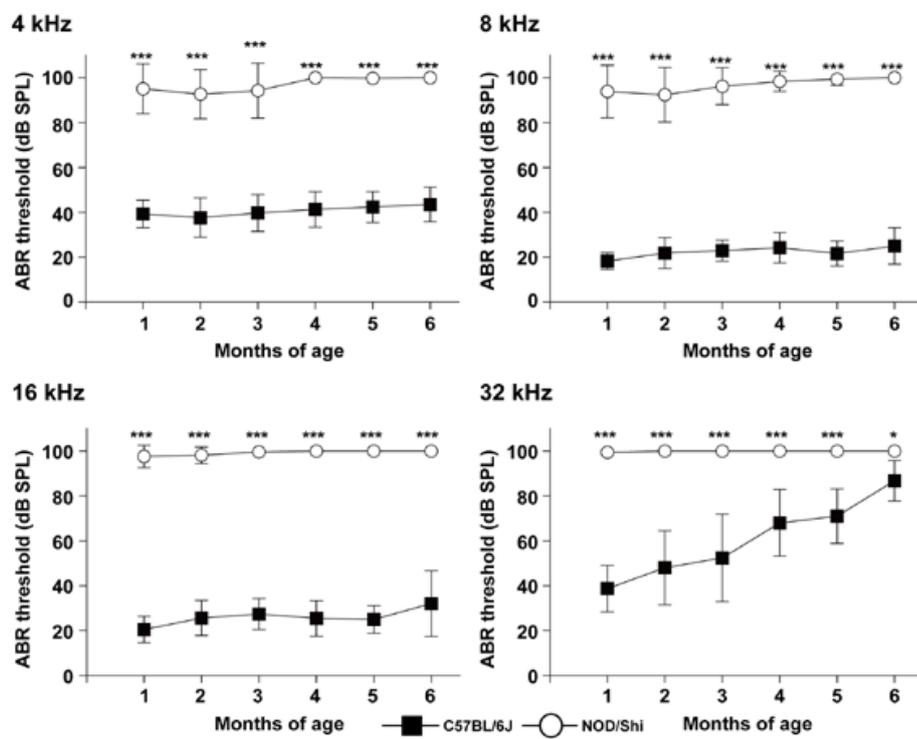


Fig. 10. Congenital profound hearing loss in NOD/Shi mice. The means (black squares in B6J and white circles in NOD/Shi) and SDs (error bars) of ABR threshold measurements for 4-, 8-, 16- and 32-kHz stimuli are shown for each mouse strain at 1 to 6 months of age. The number of ears tested is listed in Table 7. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

Table 8. Mean ABR thresholds of 4-, 8-, 16- and 32-kHz stimuli of NOD/Shi, C57BL/6J, BNF₁ and (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice at 1 months of age.

Mice	Month of age	<i>n</i>	ABR threshold ± Standard deviation (dB SPL)			
			4 kHz	8 kHz	16 kHz	32 kHz
NOD/Shi	1	25	95.0 ± 11.1	93.8 ± 11.8	97.6 ± 5.0	99.4 ± 2.2
	2	21	92.6 ± 10.9	92.4 ± 12.1	98.1 ± 3.7	100.0
	3	13	94.2 ± 12.2	96.2 ± 8.2	99.6 ± 1.4	100.0
	4	12	100 ± 0	98.3 ± 4.4	100.0	100.0
	5	14	99.6 ± 1.3	99.3 ± 2.7	100.0	100.0
	6	8	100 ± 0	100 ± 0	100.0	100.0
C57BL/6J	1	20	39.3 ± 6.13	18.3 ± 3.7	20.5 ± 5.8	38.8 ± 10.4
	2	30	37.7 ± 8.8	21.8 ± 6.9	25.7 ± 7.9	48.0 ± 16.5
	3	17	39.7 ± 8.2	22.9 ± 4.7	27.4 ± 6.9	52.4 ± 19.5
	4	20	41.3 ± 7.9	24.3 ± 6.7	25.5 ± 7.9	68.0 ± 14.8
	5	21	42.4 ± 6.8	21.7 ± 5.6	25.0 ± 6.1	71.0 ± 12.1
	6	17	43.5 ± 7.7	25.0 ± 8.1	32.1 ± 14.6	86.8 ± 9.0
BNF ₁	1	24	43.5 ± 7.1	25.8 ± 6.5	46.5 ± 21.5	89.4 ± 8.1
(BNF ₁ × NOD/Shi) N ₂	1	179	71.5 ± 21.0	64.7 ± 26.0	83.3 ± 20.9	96.7 ± 6.3

dB ± 6.1, 18.3 dB ± 3.7, 20.5 dB ± 5.8 および 38.8 dB ± 10.4 だったのに対し、NOD マウスは 95.0 dB ± 11.09, 93.8 dB ± 11.8, 97.6 dB ± 5.0 および 99.4 dB ± 2.2 と本研究で調査したほとんどの個体がすべての周波数音に対して重度難聴を発症していることが確認された (Fig. 10 および Table 8)。また、NOD マウスの ABR は 32-kHz が 2 ヶ月齢、16-kHz が 4 ヶ月齢、4 および 8 kHz が 6 ヶ月齢ですべての調査個体で得られなくなり (Fig. 10 および Table 8)、これらの結果から NOD マウスは、これまでの報告されている NOD/ShiLtJ マウスの報告とは大きく異なり [Zheng *et al.*, 1999; Johnson and Zheng, 2002]、先天性難聴発症モデルマウスとして位置付けられた。

次に、NOD マウスの先天性難聴の原因を明らかにするため、本研究では多くの感音難聴の原因となる蝸牛の内耳有毛細胞の感覚毛の表現型解析を実施した。1 ヶ月齢において NOD および MSM マウスの蝸牛中回転の内耳有毛細胞の感覚毛の表現型を比較した結果、内有毛細胞 (Inner Hair Cell: IHC) においては、NOD マウスの感覚毛の脱落が観察された (Fig. 11A および B)。また、外有毛細胞 (Outer Hair Cell: OHC) においては、両系統ともに V 字型の形態を示していたが、NOD マウスの OHC の感覚毛は MSM に比べ短く、特に内側の列 (Row 1) の感覚毛の明確な短毛化が確認された (Fig. 11C および D)。また、Figure 11E および F には MSM および NOD の OHC の感覚毛の強拡大図を示したが、NOD の感覚毛

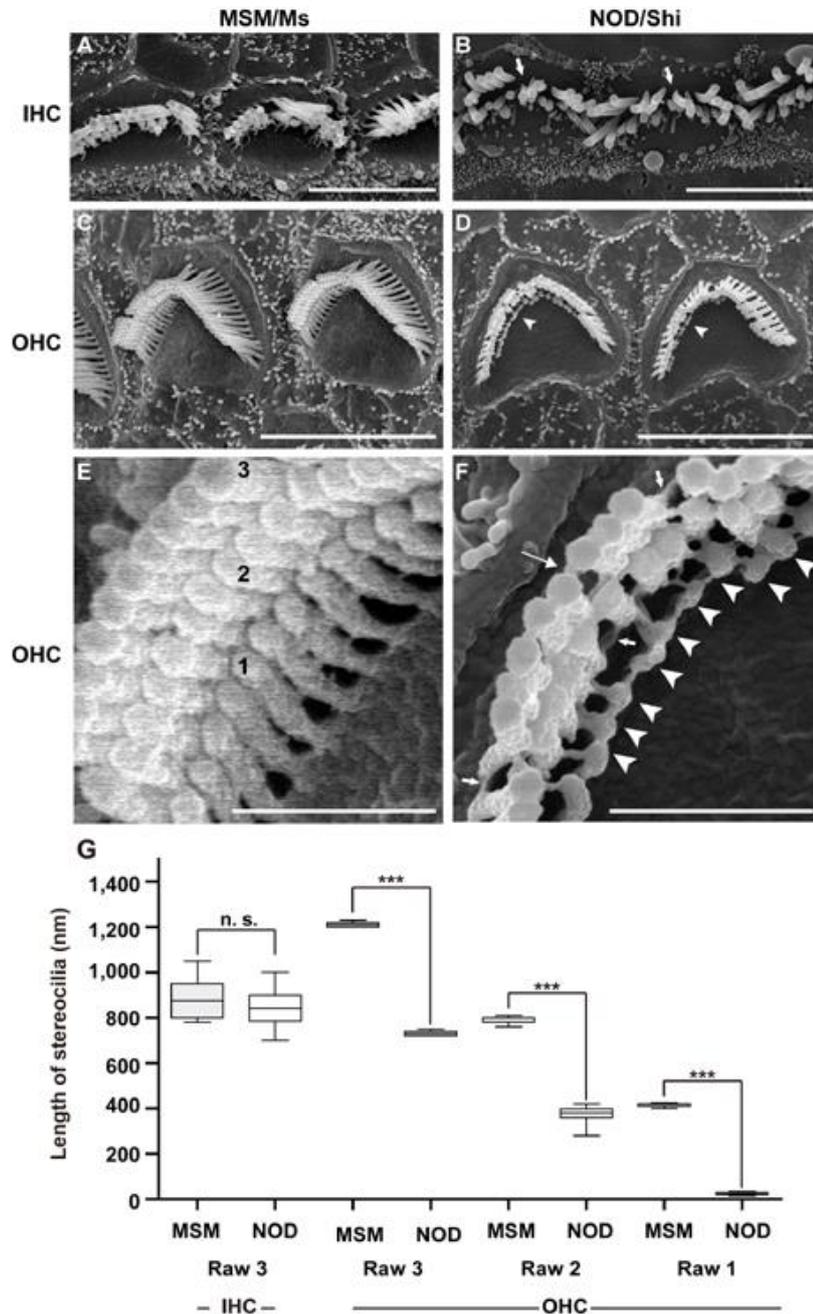


Fig. 11. Stereocilia phenotypes in MSM/Ms (MSM) and NOD/Shi (NOD) mice at 1 month of age. SEM images showing the stereocilia of cochlear hair cells in MSM (A, C and E) and NOD (B, D and F) mice. (A, B) Stereociliary morphology of inner hair cell (IHCs) of the cochlea in NOD and MSM mice. (C, D) Stereociliary morphology of outer hair cell (OHCs) of the cochlea in NOD and MSM mice. Highly magnified images are shown in stereocilia of OHC. Arrows (B) and arrowheads (D) indicate a loss of stereocilia and shorted stereocilia of 1 row. Numbers (1, 2 and 3) in E indicate row of stereocilia. Short and thick arrow (F) indicates a loss of stereocilia. Arrows and arrowheads in F indicate elongated stereociliary links and shorted stereocilia, respectively. Scale bars=5 (A, B, C, D) and 2 μ m (E, F). (G) Comparison of the length of stereocilia (nm) of IHCs and OHCs of the cochlea in NOD and MSM mice. n.s. = no significant, * $P < 0.001$.**

も MSM 同様に外側の感覚毛が長く、内側の感覚毛が短い階段状構造を示したが、感覚毛の列間接着異常が認められ、MSM では確認することが困難な感覚毛列間を繋ぐリンクが NOD の感覚毛においては明確に確認された (Fig. 11F)。また、MSM および NOD マウス間の感覚毛の長さを測定した結果、IHC において測定可能であった外側の列 (Raw 3) の感覚毛において有意な長さの差異は検出されなかったが、OHC の 3 列の感覚毛において NOD マウスの感覚毛が統計学的に有意に短いことが示され、特に Raw 3 においては約 1/20 の長さに短毛化していた。さらに、この月齢の基底回転部の NOD マウスの有毛細胞の感覚毛形態を観察した結果、その異常はより明確であり、感覚毛の脱落 (Fig. 12A) および感覚毛間の融合 (Fig. 12B) が認められた。一方、中回転の有毛細胞における感覚毛異常は加齢に伴い進行し、2 ヶ月齢で OHC における明確な感覚毛の脱落 (Fig. 12C) および 3 ヶ月齢の IHC においては細胞上すべての感覚毛の脱落が確認された (Fig. 12D)。さらに、4 ヶ月齢においては、Figure 12 (E~G) に示した頂回転部における表現型のような多くの IHC および OHC の脱落が確認され、残存した感覚毛においては、融合により Raw 1 の感覚毛はほぼ消失していた。

2. NOD マウスの先天性難聴の遺伝学的解析

NOD/ShiLtJ マウスの早発性 AHL の感受性遺伝子座は第 5 番染色体上の *ahl2*

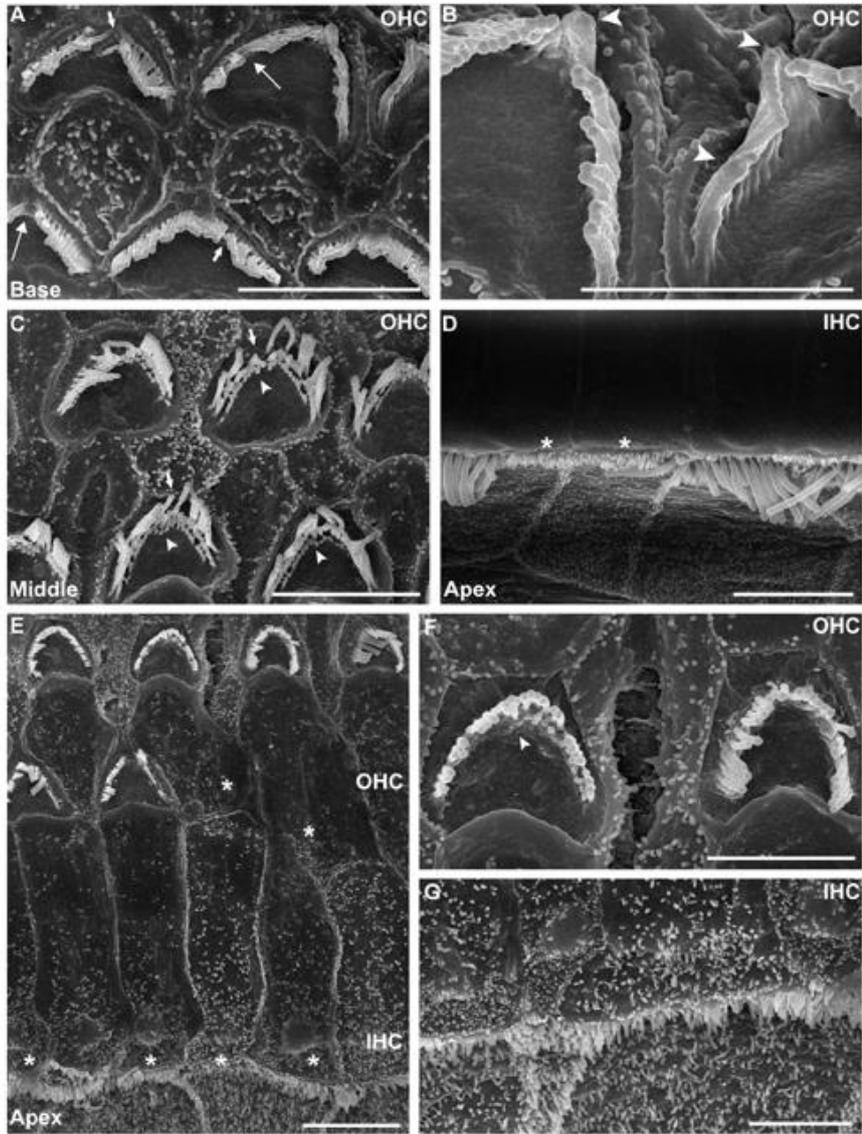


Fig. 12. Stereocilia phenotypes of cochlear hair cells in NOD mice at 1 to 4 month of age. (A, B) Stereociliary morphology of outer hair cell (OHCs) from the basal turn of the cochlea at 1 month of age. A picture of B shows highly magnified image in A. Arrows and arrowheads indicate loose and fused stereocilia, respectively. (C) Stereociliary morphology of OHCs from middle turn of the cochlea at 2 months of age. Arrows and arrowheads indicate loose and shorted stereocilia, respectively. (D) Stereociliary morphology of inner hair cells (IHCs) from apical turn of the cochlea at 3 months of age. Asterisks indicate IHCs with missing bundles. (E-G) Stereociliary morphology of OHCs and IHC from apical turn of the cochlea at 4 months of age. The pictures of F and G show highly magnified images in E. Asterisks indicate IHCs and OHCs with missing bundles. Arrowhead indicates fused stereocilia. Scale bars=5 (A, C-G) and 2 μ m (B).

遺伝子座であることが報告されている [Johnson and Zheng, 2002]。本研究の聴力測定で明らかとなった NOD マウスの先天性難聴における感受性遺伝子座を検証するため、NOD マウスに B6J を交配することにより、F₁ マウス (BNF₁)、および BNF₁ マウスに NOD マウスを戻し交配した (BNF₁ × NOD) N₂ マウスを作製し、生後 1 ヶ月齢で 4-, 8-, 16-および 32-kHz の ABR 閾値を測定した。生後 1 ヶ月齢の F₁ マウスの ABR 閾値の測定を行った結果、4-, 8-, 16-および 32-kHz において 43.5 dB ± 7.1, 25.8 dB ± 6.5, 46.5 dB ± 21.5 および 89.4 dB ± 8.1 の平均聴力閾値を示し、F₁ マウスは 4-, 8-および 16-kHz において B6J マウスと類似した聴力閾値を示したが、16-kHz においては B6J と NOD の両系統と有意差が認められ、さらに、32 kHz においては NOD と類似した聴力閾値を示した (Fig. 13)。次に、生後 1 ヶ月齢の N₂ マウスを用いて ABR 閾値の測定を行った結果、4-kHz において二項分布に近い分布、8-kHz においては低～高レベルの ABR 閾値に渡って分布を示し、16-kHz においては正常聴力個体が存在するものの、52.0%の個体が重度難聴を発症しており、さらに、32-kHz においては 80.4%の個体が重度難聴を発症していた (Fig. 14)。この結果から、NOD マウスの難聴発症は、周波数ごとに効果の強さが異なる QTL が周波数特異的に存在し、さらに 16-および 32-kHz の難聴発症には優性効果をもつ QTL が関与することが強く示唆された。

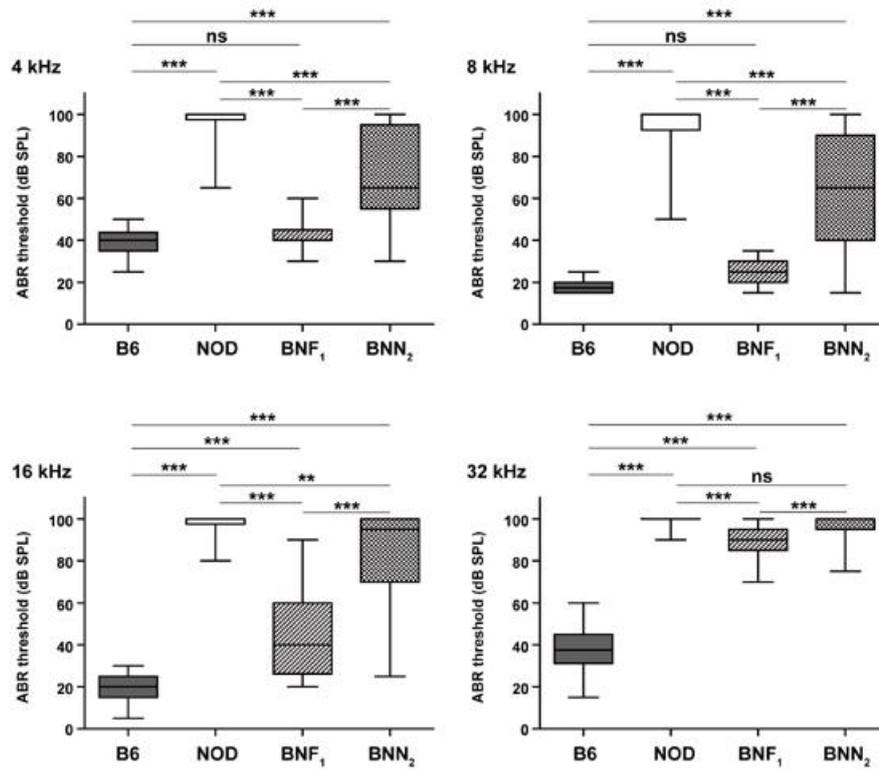


Fig. 13. Distributions of ABR thresholds for 4-, 8-, 16- and 32-kHz stimuli in B6J, NOD/Shi, BNF₁ and (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice at 1 months of age. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001.

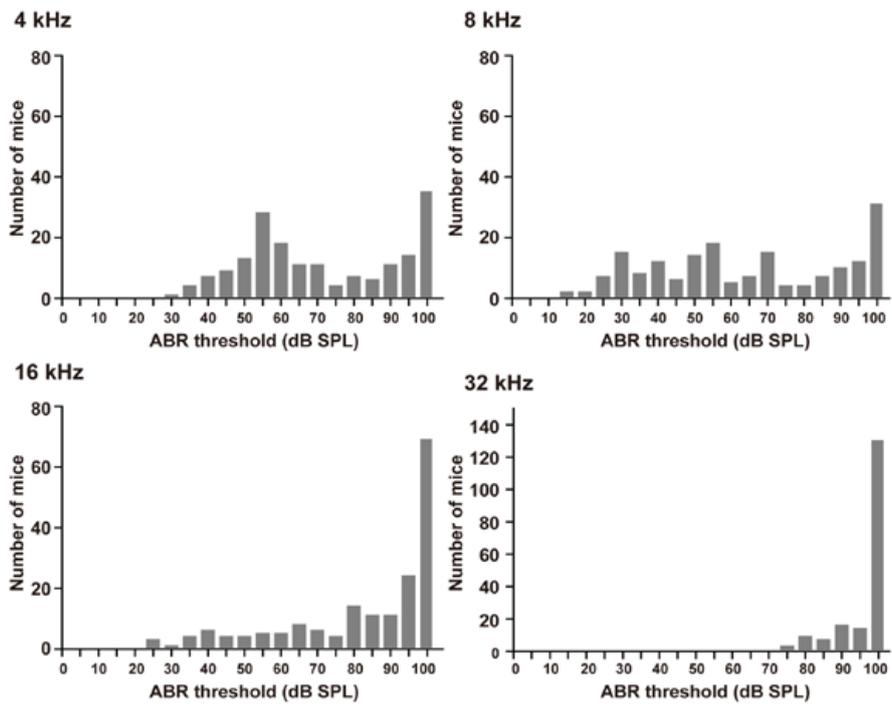


Fig. 14. Distributions of ABR thresholds for 4-, 8-, 16- and 32-kHz stimuli among the (BDF₁ × D2J) N₂ mice at 1 months of age.

次に、NOD の先天性難聴における感受性遺伝子座を同定するため、ほとんどの N₂ マウスが重度難聴発症を示した 32-kHz を除き、4-, 8-および 16-kHz において N₂ マウスの遺伝子型および表現型 (ABR 閾値) を用いたゲノムワイド QTL マッピングを行った。その結果、統計学的に有意な 2.68~2.72 の LOD スコアが 4-kHz において第 5, 9 および 10 番染色体上、8-kHz において第 1, 5 および 6 番染色体上、さらに 16-kHz においては第 1, 5, 6 および 7 番染色体上に、各周波数において共通、または異なる QTL が検出され (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)、NOD の先天性難聴発症には複数の QTL が影響することが示唆された。特に、第 5 番染色体上においては、4-, 8-および 16-kHz で最大の LOD スコア 3.40, 5.08 および 4.83 の強い効果を示す QTL が検出され、4-, 8-および 16-kHz において共通する QTL が、第 5 番染色体上の 4.2~35.6 および 35.6~64.6 Mb に検出された (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)。また、第 5 番染色体の *ahl2* 遺伝子座が存在する 79.5 Mb においては、8-kHz で統計学的に有意な LOD スコア 4.03 の値が検出された。しかし、4.2~35.6 および 35.6~64.6 Mb の領域では 5.08 および 4.83 の LOD スコアが示すように、より効果の強い QTL の存在を示唆する LOD スコアが検出され、NOD の主要な難聴発症は *ahl2* 遺伝子座のみの効果では説明できず、その難聴発症の原因は第 5 番染色体上の複数の QTL と他の染色体上に存在する QTL の相加的効果によることが予想された (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)。

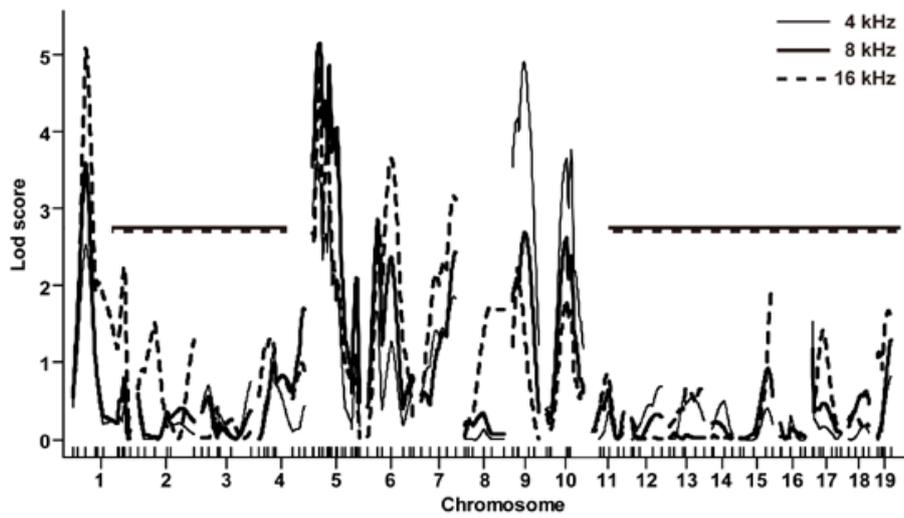


Fig. 15. Genome linkage analysis for congenital hearing loss in NOD/Shi mice. Genome-wide interval mapping for susceptibility genes associated with congenital hearing loss for 4 (solid curve), 8- (bold curve) and 16- (dotted curve) kHz stimuli of the $(BNF_1 \times NOD/Shi) N_2$ mice. Chromosome numbers and marker positions (vertical bars) are given below the linkage map.

The horizontal lines indicate LOD significant thresholds at 4 (solid, LOD = 2.72), 8 (bold, LOD = 2.72) and 16 (dotted, LOD = 2.68) kHz, respectively.

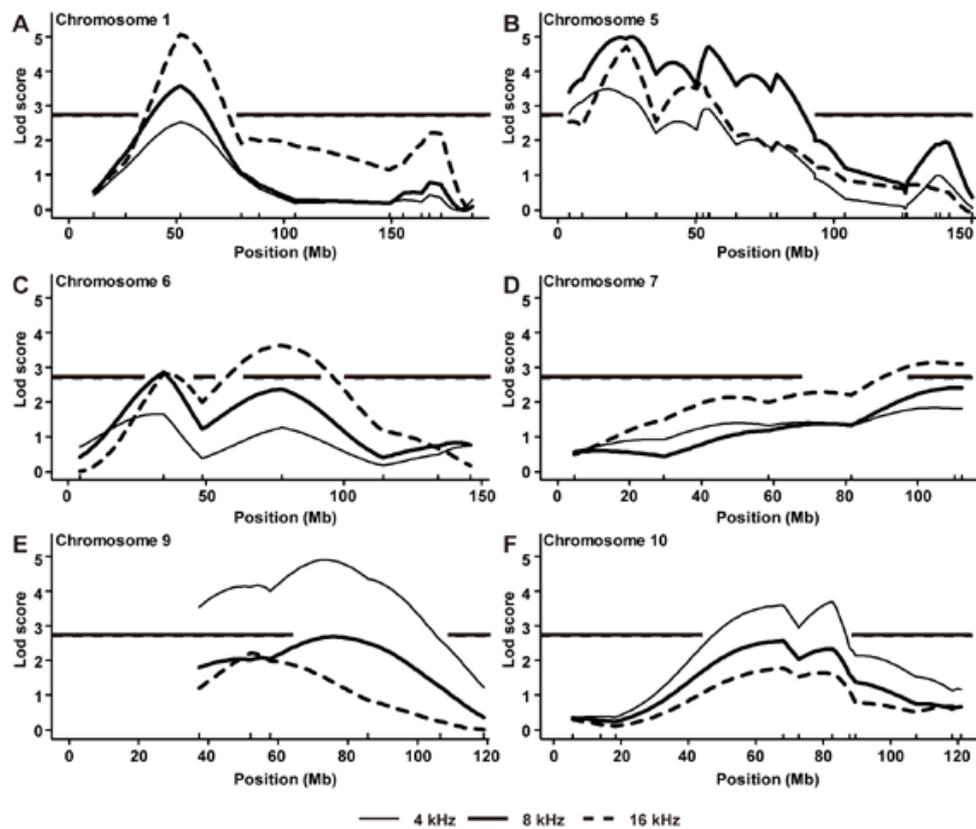


Fig. 16. Magnified view of the significant QTLs at chromosome 1 (A), 5 (B), 6 (C), 7 (D), 9 (E) and 10 (F) in Fig. 13. Interval mapping for susceptibility genes associated with congenital hearing loss for 4 (solid curve) -, 8- (bold curve) and 16- (dotted curve) kHz stimuli of the (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The horizontal lines indicate LOD significant thresholds at 4 (solid, LOD = 2.72), 8 (bold, LOD = 2.72) and 16 (dotted, LOD = 2.68) kHz, respectively.

Table 9. Detected susceptibility QTLs to congenital hearing loss in (NOD/Shi × C57BL/6J) × NOD/Shi backcross mice

Frequency (kHz)	Chromosome	Marker name	Ensembl Position (bp)	Lod score
4	5	<i>D5Mit331</i>	4246959	2.91
	5	<i>D5Mit48</i>	8797672	3.24
	5	<i>D5Mit348</i>	24919119	3.40
	5	<i>D5Mit233</i>	52697226	3.00
	5	<i>D5Mit300</i>	54486435	3.03
	5	<i>D5Mit255</i>	54954339	3.03
	9	<i>D9Mit205</i>	37298324	3.54
	9	<i>D9Mit4</i>	52123178	4.12
	9	<i>D9Mit21</i>	57684209	3.99
	9	<i>D9Mit113</i>	85796734	4.35
	10	<i>D10Mit223</i>	68212192	3.65
	10	<i>D10Mit259</i>	72676559	3.00
	10	<i>D10Mit42</i>	82655104	3.76
	8	1	<i>D1Mit478</i>	51924866
5		<i>D5Mit331</i>	4246959	3.53
5		<i>D5Mit48</i>	8797672	3.89
5		<i>D5Mit348</i>	24919119	5.08
5		<i>D5Mit352</i>	35614967	4.05
5		<i>D5Mit81</i>	50331325	3.72
5		<i>D5Mit233</i>	52697226	4.48
5		<i>D5Mit300</i>	54486435	4.83
5		<i>D5Mit255</i>	54954339	4.83
5		<i>D5Mit197</i>	64649088	3.72
5		<i>D5Mit113</i>	77255215	3.56
5		<i>D5Mit309</i>	79502721	4.03
6		<i>D6Mit268</i>	34734663	2.85
16		1	<i>D1Mit478</i>	51924866
	5	<i>D5Mit348</i>	24919119	4.83
	5	<i>D5Mit81</i>	50331325	3.62
	5	<i>D5Mit233</i>	52697226	3.80
	5	<i>D5Mit300</i>	54486435	3.41
	5	<i>D5Mit255</i>	54954339	3.40
	6	<i>D6Mit268</i>	34734663	2.82
	6	<i>D6Mit19</i>	77554468	3.63
	7	<i>D7Mit328</i>	110302821	3.10
7	<i>D7Mit281</i>	112212330	3.10	

一方、第5番染色体の他に検出された QTL に関しては、第1番染色体上において8-および16-kHzで51.9 Mbの領域、第6番染色体上において8-および16-kHzで34.7 Mbの領域、16-kHzで77.6 Mbの領域、第7番染色体上において16-kHzで110.3~112.2 Mbの領域、第9番染色体上において4-kHzで52.1 Mbの領域、4-および8-kHzに85.8 Mbの領域、加えて、第9番染色体上においては4-kHzで68.2 Mb および 82.7 Mb の領域に統計学的に有意な LOD スコアが検出された (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)。また、第9番染色体を除いた染色体においては4-, 8-および16-kHzのQTLの曲線が類似していたが、低~高周波数領域間でLODスコアの大きさ、および強い効果を示すQTL領域に差異が示された (Fig. 16)。特に、第1, 6および7番染色体上のQTLは高周波数(16-kHz)において強い効果を示す傾向にあり、第9および10番染色体のQTLは低周波数(4-kHz)において強い効果を示した (Fig. 16)。

次に、本研究で検出された QTL が偽陽性であることも考えられたことから、各染色体の QTL の効果を検証するため、統計学的に有意な LOD スコアが検出された QTL について、(BNF₁ × NOD) N₂ マウスの聴力表現型と遺伝子型の関連解析を行った。最も NOD の難聴発症に最も強い効果が認められた第5番染色体上の QTL において、NN 遺伝子型 (NOD ホモ接合体) および NB 遺伝子型 (NOD および B6J ヘテロ接合体) の N₂ マウスの ABR 閾値における QTL の関連解析を

実施した結果、4-kHzにおいて、4.2, 8.8, 24.9, 52.7, 54.5 および 55.0 Mb 上に位置する 6 マーカーである *D5Mit331*, *D5Mit48*, *D5Mit348*, *D5Mit233*, *D5Mit300* および *D5Mit255* について関連解析を実施した結果、すべてのマーカーの NN 遺伝子型および NB 遺伝子型の N₂ マウスの ABR 閾値には統計学的に有意差が認められた (平均差: 11.0, 11.8, 12.1, 11.5 および 11.5 dB SPL, すべて $P < 0.001$, Fig. 17)。また、第 5 番染色体の 8-kHz において、4.2, 8.8, 24.9, 35.6, 50.3, 52.7, 54.5, 55.0, 64.6, 77.2 および 79.5 Mb 上に位置する 11 マーカーである *D5Mit331*, *D5Mit48*, *D5Mit348*, *D5Mit352*, *D5Mit81*, *D5Mit233*, *D5Mit300*, *D5Mit255*, *D5Mit197*, *D5Mit113* および *D5Mit309* の関連解析の結果においても NN 遺伝子型および NB 遺伝子型の N₂ マウス間の ABR 閾値において統計学的に有意差を認められ (平均差: 15.0, 16.0, 18.1, 16.3, 15.7, 17.2, 17.8, 17.8, 15.6, 15.3 および 16.4 dB SPL, すべて $P < 0.001$, Fig. 18)、同様に 16-kHz においても 24.9, 50.3, 52.7, 54.5 および 55.0 Mb 上に位置する 5 マーカーである *D5Mit348*, *D5Mit81*, *D5Mit233*, *D5Mit300* および *D5Mit255* の NN 遺伝子型および NB 遺伝子型の N₂ マウス間の ABR 閾値においてすべて統計学的有意差が検出された (平均差: 14.3, 12.5, 12.8, 12.1 および 12.1 dB SPL, すべて $P < 0.001$, Fig. 19)。

加えて、第 1, 6, 7, 9 および 10 番染色体の上の高 LOD スコアの領域に位置するマーカーについても同様の関連解析を実施した結果、すべてのマーカーにお

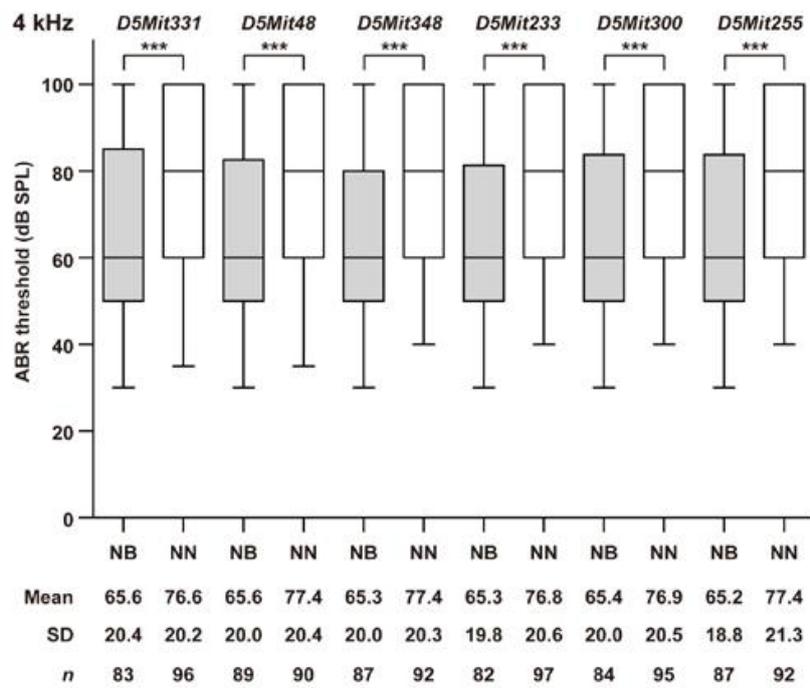


Fig. 17. Effects of susceptibility locus on chromosome 5 on ABR thresholds at 4-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility loci on chromosome 5 are genotyped by *D5Mit331*, *D5Mit48*, *D5Mit348*, *D5Mit233*, *D5Mit300* and *D5Mit255*, respectively.

****P* < 0.001.

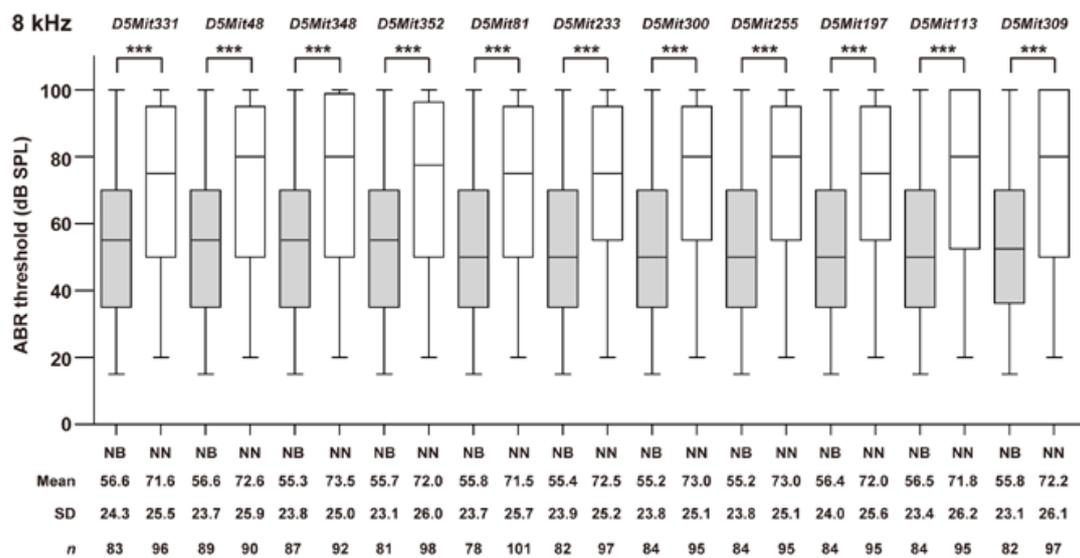


Fig. 18. Effects of susceptibility locus on chromosome 5 on ABR thresholds at 8-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility loci on chromosome 5 are genotyped by *D5Mit331*, *D5Mit48*, *D5Mit348*, *D5Mit352*, *D5Mit81*, *D5Mit233*, *D5Mit300*, *D5Mit255*, *D5Mit197*, *D5Mit113* and *D5Mit309*, respectively. **P* < 0.001.**

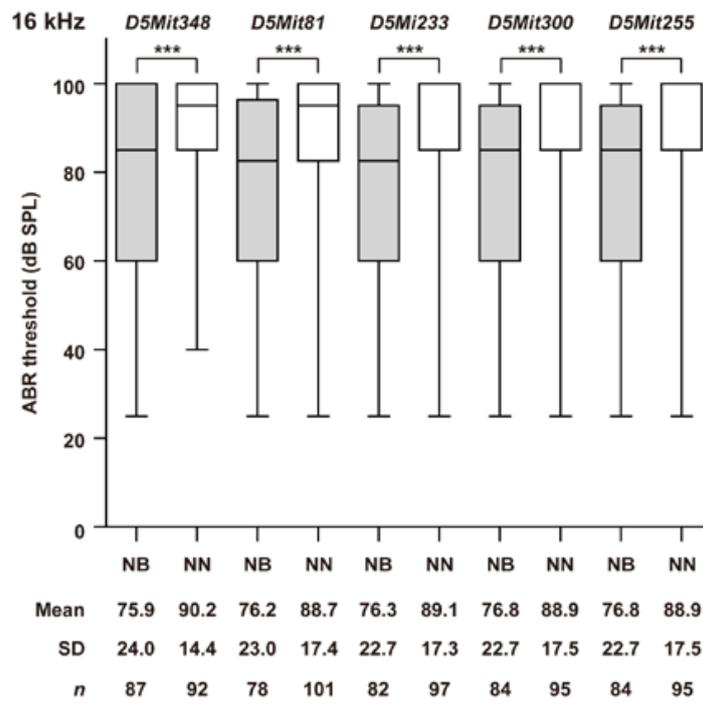


Fig. 19. Effects of susceptibility locus on chromosome 5 on ABR thresholds at 16-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility loci on chromosome 5 are genotyped by *D5Mit348*, *D5Mit81*, *D5Mit233*, *D5Mit300* and *D5Mit255*, respectively. ****P* < 0.001.

いても NN 遺伝子型および NB 遺伝子型間の N₂ マウスの ABR 閾値は NB 遺伝子型の個体群に比べ、NN 遺伝子型の個体群の ABR 平均閾値が統計学的に有意な差が検出された (Fig. 20~Fig. 24)。

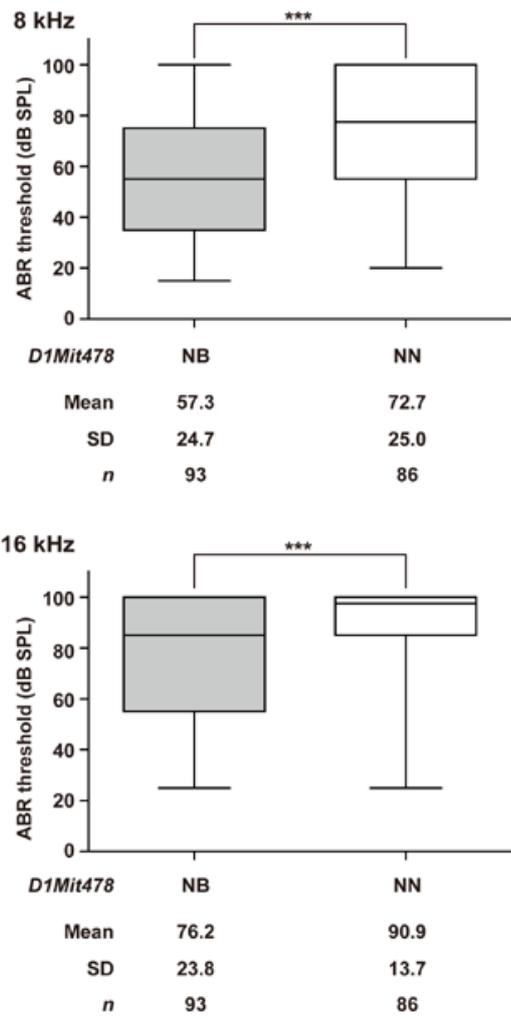


Fig. 20. Effects of susceptibility locus on chromosome 1 on ABR thresholds at 8- and 16-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility locus on chromosome 1 is genotyped by *D1Mit478*. ****P* < 0.001.

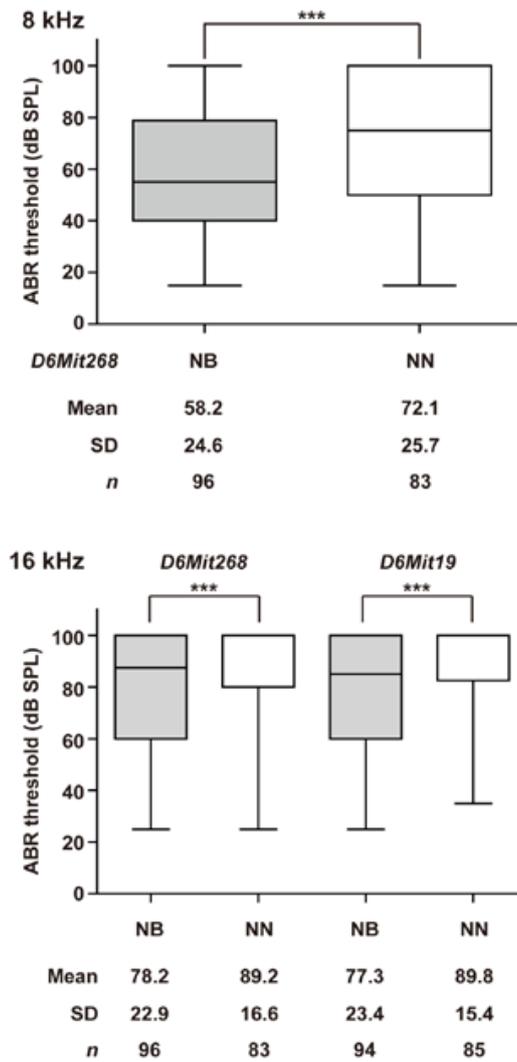


Fig. 21. Effects of susceptibility locus on chromosome 6 on ABR thresholds at 8- and 16-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility loci on chromosome 6 are genotyped by *D6Mit268* and *D6Mit19*, respectively. *P < 0.001.**

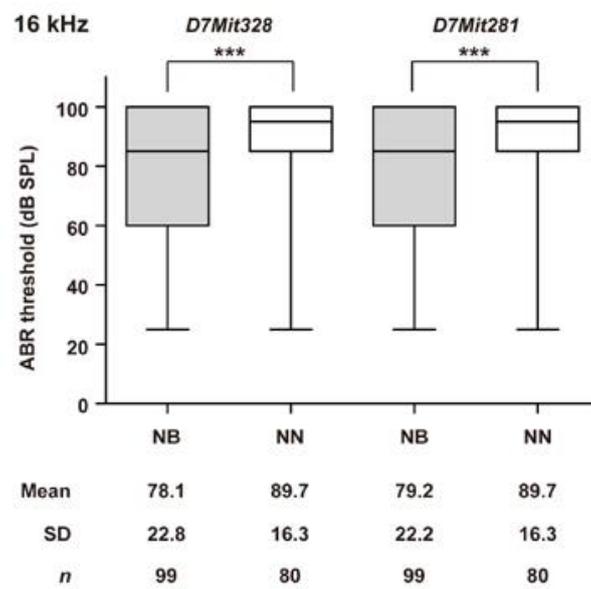


Fig. 22. Effects of susceptibility locus on chromosome 7 on ABR thresholds at 16-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility loci on chromosome 7 are genotyped by *D7Mit328* and *D7Mit281*, respectively. ****P* < 0.001.

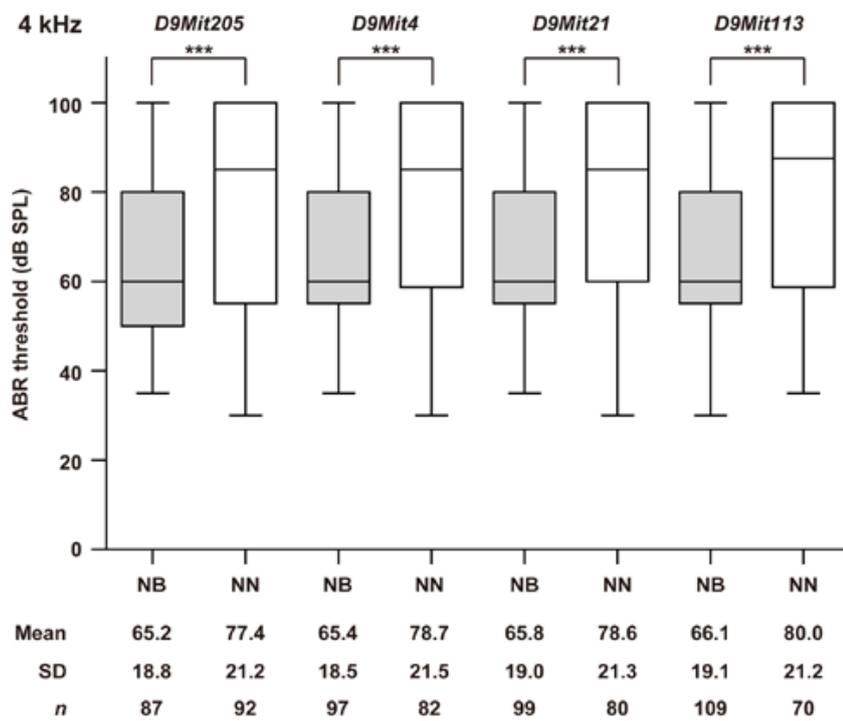


Fig. 23. Effects of susceptibility locus on chromosome 9 on ABR thresholds at 4-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility loci on chromosome 9 are genotyped by *D9Mit205*, *D9Mit4*, *D9Mit21* and *D9Mit113*, respectively. ****P* < 0.001.

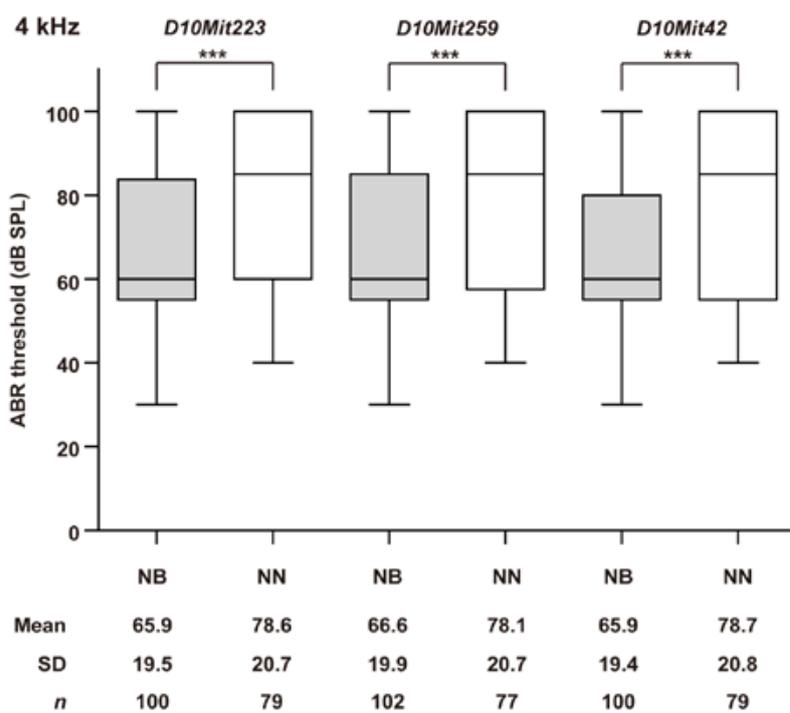


Fig. 24. Effects of susceptibility locus on chromosome 10 on ABR thresholds at 4-kHz in (BNF₁ × NOD/Shi) N₂ mice. The lines within boxes and error bars indicate the median and max/min thresholds, respectively. The susceptibility loci on chromosome 10 are genotyped by *D10Mit223*, *D10Mit259* and *D10Mit42*, respectively. ****P* < 0.001.

第4項 考察

本研究において行った NOD/Shi マウスの ABR 閾値の測定結果から、NOD/Shi マウスは測定したすべての音域の音刺激に対し 1 ヶ月齢で重度難聴を発症することが明らかとなり (Fig. 9 および Fig. 10)、NOD マウスは先天性難聴モデルマウスとして位置付けられた。一方、Zheng *et al.* [1999]、および Johnson and Zheng [2002] は、本研究同様に NOD/ShiLtJ マウスの ABR 閾値を測定し、報告しているが、NOD/ShiLtJ マウスが生後 3 ヶ月齢で早発性 AHL を示すことから、このマウス系統を早発性難聴モデルとして位置付けている。このような NOD/Shi および NOD/ShiLtJ マウス間における聴力差が検出された原因は、NOD/Shi マウスおよび NOD/ShiLtJ が垂系統の関係であり、遺伝的に異なっていることが推測された。NOD/Shi 系統マウスはアウトブレッド系統 Jcl:ICR (Japan CLEA, Inc.; Institute for Cancer Research) から樹立された白内障を発症した Cataract Shionogi (CTS) 系統由来であり、その個体群から塩野義製薬 (株) の牧野博士が糖尿病を自然発症するマウスを発見し、1974 年に F₂₀ 世代のインスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus with insulinitis: IDDM) を自然発症する系統として樹立され [Makino *et al.* 1980]、その後世代を重ね NOD/Shi 系統として商品化された。一方、NOD/Shi 系統は 1984 年、京都の服部博士のコロニーがボストンにある The Joslin Diabetes Center に輸入され、The Jackson Laboratory の E Leiter

博士に NOD/Shi マウスのペアが譲渡され、後に NOD/ShiLtJ 系統として樹立された [<http://jaxmice.jax.org/strain/001976.html>]。このことから、両系統間における聴力の表現型差異および難聴感受性遺伝子座の差異は、NOD/ShiLtJ 系統が近交化される過程において、難聴抵抗性に関連するアレルがホモ化した可能性、または他系統の交配により NOD/Shi 系統の先天性難聴に関与する変異が NOD/ShiLtJ のゲノムから排除された可能性が考えられた。

また、本研究において実施した QTL 連鎖解析によって NOD の難聴発症における感受性効果は Johnson and Zheng [2002] が報告したように第 5 番染色体上に *ahl2* 領域 (79.5 Mb) にも検出されたが、本研究で同定したピーク LOD スコアはそのセントロメア側の 2 領域、すなわち 4.2~35.6 および 35.6~64.6 Mb の領域に検出された (Fig. 16 および Table 9)。本研究および Johnson and Zheng [2002] が行った QTL 解析は、ともに NOD 系統および B6J 系統間の同様の交配系を用いているにもかかわらず、このように異なる領域に QTL が検出された原因としては、本研究は表現型解析に基づき NOD/Shi 系統を先天性難聴系統と位置づけ、QTL 連鎖解析の表現型データは NOD/Shi マウスが重度難聴を発症していた生後 1 ヶ月齢の N₂ マウスの ABR 閾値を用いており、一方で Johnson and Zheng [2002] の解析においては、生後 6 ヶ月齢の ABR 閾値を解析に用いている。従って、両解析では ABR 閾値を測定した月齢が異なり、本研究が先天性難聴発症に関与す

る QTL を、Johnson and Zheng [2002] は加齢性難聴発症に関与する QTL をそれぞれ同定したのと考えられる。本研究においても近傍領域の LOD スコアが統計学的に有意であったことからその可能性を完全に否定することはできないものの (Fig. 16B および Table 7)、*ahl2* 遺伝子座は NOD マウスの加齢性難聴に関与する QTL であり、先天性難聴発症に関与するマウス第 5 番染色体の感受性 QTL はセントロメア領域に存在するものと考えられた。また、NOD および B6J マウスはともに加齢性難聴に関与する *Cdh23^{ahl}* アレルを有する [Noben-Trauth *et al.*, 2003]。 *Cdh23^{ahl}* アレルのマウス難聴発症に対する効果は極めて強いことが報告されており [Johnson *et al.*, 2000, 2002 and 2008; Noben-Trauth and Johnson, 2009]、本研究および Johnson and Zheng [2002] とともに NOD-B6J の交配系を用いて遺伝解析を実施していることから *Cdh23^{ahl}* アレルの感受性効果がノイズとなり、QTL 領域のずれにつながった可能性も推測され、アレルの効果を除去した遺伝解析が今後必要になると考えられた。

一方、*Cdh23* 遺伝子は NOD マウスの感覚毛の形態異常の原因の一つであると予想されており [Noben-Trauth *et al.*, 2003; Siemens *et al.*, 2004; Müller, 2008]、NOD マウスで観察された感覚毛の列間の接着異常 (Fig. 11 および Fig. 12) は *Cdh23^{ahl}* アレルの影響であることも予想された。*Cdh23* がコードする CDH23 蛋白質は、内耳有毛細胞の感覚毛の列間において先端部のイオンチャンネルゲー

トをつなぐ Tip-link に発現し、音のシグナル伝達に重要な役割を果たしている [Siemens *et al.*, 2004; Müller, 2008]。このことから、NOD マウスの感覚毛の列間の接着異常は、感覚毛の列間をつなぐ Tip-link の張力が緩み、伸長した状態となったことも考えられた。

本研究における QTL 連鎖解析の結果から、NOD マウスの先天性難聴に関与する QTL が第 1 番染色体上の 51.9 Mb、第 5 番染色体上の 4.2~64.6 Mb、第 6 番染色体上の 34.7 Mb および 77.6 Mb、第 7 番染色体上の 110.3~112.2 Mb、第 9 番染色体上の 52.1~85.8Mb、および第 10 番染色体上の 68.2 Mb および 82.7 Mb の領域に各染色体上に存在することが示唆された (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)。これらそれぞれの領域には第 1 番染色体の QTL 領域を除き、数種の候補遺伝子、すなわち難聴発症責任遺伝子が存在していた [http://hearingimpairment.jax.org/master_table1.html]。第 5 番染色体の 4.2~64.6 Mb 近傍領域には hepatocyte growth factor (*Hgf*: 16.6 Mb), solute carrier family 25 (*Slc25a5*: 21.8 Mb), otoferlin (*Otof*: 30.4 Mb), urocortin (*Ucn*: 31.1 Mb), MpV17 mitochondrial inner membrane protein (*Mpv17*: 31.1 Mb), fibroblast growth factor receptor 3 (*Fgfr3*: 33.7 Mb), otopetrin 1 (*Otop1*: 38.3 Mb), recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (*Rbpj*: 53.6 Mb), cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 9 (*Chrna9*: 65.9 Mb) および glutaredoxin, cysteine rich 1 (*Grxcr1*: 68.1 Mb) の計 10 種

の難聴関連遺伝子が存在した。第6番染色体上の34.7 Mb および77.6 Mb 近傍領域には microRNA 96 (*Mirn96*: 30.2 Mb), ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A4 (*Atp6v0a4*: 38.0 Mb), および ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 5 (*St3gal5*: 72.1 Mb) 3種の難聴関連遺伝子が存在し、また、第7番染色体上の110.3~112.2 Mb からテロメア領域までには myosin VIIA (*Myo7A*: 98.1 Mb), tubby candidate gene (*Tub*:109.0 Mb), otoancorin (*otoa*: 121.1 Mb), fibroblast growth factor receptor 2 (*Fgfr2*: 130.2 Mb), H6 homeobox 2 (*Hmx2*: 131.5 Mb), H6 homeobox 3 (*Hmx3*: 131.5 Mb), EPS8-like 2 (*Eps8l2*: 141.3 Mb), potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1 (*Kcnq*: 143.1 Mb) および fibroblast growth factor 3 (*Fgf3*: 144.8 Mb) 10種の難聴関連遺伝子が存在した。第9番染色体においても52.1~85.8Mb 近傍領域には radixin (*Rdx*: 52.0 Mb), ELMO/CED-12 domain containing 1 (*Elmod1*: 53.9 Mb), Bardet-Biedl syndrome 4 (*Bbs4*: 59.3 Mb), myosin VI (*Myo6*: 80.2 Mb) および T-box18 (*Tbx18*: 87.7 Mb) 5種の難聴関連遺伝子が存在し、さらに、第10番染色体上の68.2 Mb および82.7 Mb 近傍領域には prosaposin (*Psap*: 60.27 Mb), cadherin 23 (*Cdh23*: 60.3 Mb), adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit (*Ap3d1*: 80.7 Mb) および GIPC PDZ domain containing family, member 3 (*Gipc3*: 81.3 Mb) 4種の難聴関連遺伝子が存在していた。本研究が行った QTL 連鎖解析の結果から、NOD マウスの先天性難聴は複数の染色体上から QTL が検出され

(Fig. 15, 16 および Table 9)、多数の遺伝因子が影響することが示唆されている。また、これらのほとんどの遺伝子内およびその近傍領域において NOD-B6J 間のゲノム多型が存在することが明らかとなっている [http://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer/rel-1410]。従って、これら既存の難聴関連遺伝子の翻訳領域に生じた NOD 特異的突然変異によるそれらがコードする蛋白質の構造変化、または発現調節領域に生じた変異に起因する発現変動によってこれらの遺伝子の優性効果、遺伝子間相加的効果およびエピスタシスの崩壊などが生じ、NOD マウスは先天性難聴を発症する可能性が考えられた。

また、本研究において走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて NOD マウスにおける内耳蝸牛有毛細胞の形態観察を行った結果、生後 1 ヶ月齢において内有毛細胞 (inner hair cell: IHC) および外有毛細胞 (outer hair cell: OHC) の感覚毛の脱落が観察され、さらに、OHC において内側の列の感覚毛の短毛化、感覚毛の列間の接着異常が認められた (Fig. 11B, D, F)。また、野生型の MSM および NOD マウス間の感覚毛長を測定した結果、NOD マウスの OHC の 3 列の感覚毛における統計学的に有意な短毛化が示され (Fig. 11G)、NOD マウスの先天性難聴発症の主要な原因は内耳蝸牛有毛細胞の感覚毛の短毛化であることが強く示唆された。内耳蝸牛有毛細胞は外気を介して伝達される機械的・物理的な音刺激を電氣的刺激に変換し、神経に伝える機能を担う音を聞く上で最も重要な細胞であ

り [Fettiplace and Hackney, 2006; Vollrath *et al.*, 2007]、特に、音のシグナル変換機能の役割を果たしているのが内耳有毛細胞の表面に局在する感覚毛の役割は聴覚に極めて重要な役割をもつ [Powers *et al.*, 2012]。実際に、短毛、細小、伸長、分岐、融合および球状化などの感覚毛異常が認められるミュータントマウスは重度および完全難聴を発症することが報告されている [Amiel and Karen, 2009]。本研究の結果から、NOD マウスにおいて感覚毛の短毛化、脱落、融合などの異常が観察されたことから、前述した候補遺伝子のうち、内耳蝸牛有毛細胞の感覚毛に発現する遺伝子が難聴発症の責任遺伝子である可能性が予想される。例えば、本研究において NOD マウスの難聴に対する強い効果をもつ QTL 領域の一つである第 5 番染色体の 64.6~77.2 Mb (LOD スコア : 3.56~3.72) においては *Grxcr1* 遺伝子が存在する [Odeh *et al.*, 2010]。 *Grxcr1* 遺伝子はグルタレドキシシン蛋白質に類似した領域と C 末端にシステインリッチ領域を含んで構成され、 *pirouette (pi)* マウス [Odeh *et al.*, 2010] およびヒト非症候性劣性難聴 *DFNB25* の責任遺伝子であることが明らかとなっている [Odeh *et al.*, 2010; Schraders *et al.*, 2010]。 *Grxcr1* のミュータントである *pi* マウスは、内耳有毛細胞の欠陥から、典型的に回転運動や首振り運動および難聴を示すこと [Wooley and Dickie, 1945; Karolyi *et al.*, 2003]、有毛細胞において、GRXCR1 蛋白質は蝸牛および前庭有毛細胞の感覚毛に沿って局在することが報告されている [Odeh *et al.*, 2010]。その

Grxcr1 に変異をもつミュータントマウスは感覚毛が短毛化しており、*Grxcr1* は感覚毛の正常な伸長、および感覚毛のアクチンフィラメントの構築を制御するのに必要不可欠であると考えられており [Karolyi *et al.*, 2003]、NOD マウスの感覚毛短毛化の原因遺伝子の一つの候補となりうる。また、第 9 番染色体上に検出された QTL 近傍に存在する *Rdx* 遺伝子のミュータントマウスも感覚毛が短毛化することも報告されており [Kitajiri *et al.*, 2004]、この遺伝子も NOD の先天性難聴発症に関連が予想される。従ってこれらの遺伝子をはじめとする本研究において同定した QTL 近傍領域の NOD 特異的ゲノム多型の同定および遺伝子発現変動解析を実施することが NOD マウスの感覚毛短毛化に起因する先天性難聴の原因を明らかにする手がかりとなることが考えられた。

総合討論

1. DBA/2J マウスの早発性・進行性難聴の遺伝的要因の同定

D2J は、マウスにおいて最初に近交化された DBA 系統の亜型であり [Morse, 1978]、様々な疾患のモデルマウスであるが [Fuller and Sjursen, 1967; Neumann and Collins, 1991; Cunningham *et al.*, 1992; Belknap *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2013; Porcu *et al.*, 2014]、早発性難聴のモデルであることも知られており、生後 7 ヶ月齢までに重度難聴を発症する [Zheng *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2008]。その早発性および進行性難聴の遺伝的原因としては、cadherin 23 遺伝子の *Cdh23^{ahl}* および fascin 2 遺伝子の *Fscn2^{ahl8}* の効果が報告されており [Noben-Trauth *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2010]、さらに、低周波数領域 (4-kHz) 特異的な *ahl9* 遺伝子座の効果も報告されている [Nagtegaal *et al.*, 2012]。本研究では中周波数 (8-kHz)、高周波数 (16-kHz) および超音波周波数 (32-kHz) 領域の音刺激の受容および難聴発症に関与する遺伝的要因を特定するため、順遺伝学的解析を行った。

本研究においては D2J の難聴に対して感受性効果を持つ遺伝的要因を特定するため、17 頭の B6J、43 頭の D2J、14 頭の (D2J × B6J) F₁ およびその F₁ に D2J を交配した 90 個体の戻し交配分離個体を作製し、8-, 16-および 32-kHz の音刺激に

対する ABR 閾値の測定および、マウス全染色体上に設置した 103 種のマーカー (Table 1) の遺伝子型の判定による QTL 連鎖解析を行った。(D2J × B6J) F₁ マウスの ABR 閾値を測定した結果、その閾値は 8-および 16-kHz において B6J と、32-kHz において D2J と類似していた (Fig. 3 および Table 4)。また、戻し交配個体において 8-および 16-kHz の ABR 閾値は正規分布に近く、32-kHz においては、すべての個体が高度および重度難聴を発症していた (Fig. 3)。この結果から、D2J の 8-および 16-kHz における早発性難聴は QTL によって支配されており、さらに 32-kHz においては優性の QTL の効果が示唆された。次に QTL 連鎖解析を実施した結果、D2J の難聴発症にはこれまで報告されているように第 11 番染色体上の *Fscn2^{ahl8}* 領域 [Johnson *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2010] に LOD スコア 5.02 および 8.84 と強い感受性効果が検出されたが (Fig. 4 および Table 5)、16-kHz の聴力においては、第 5 番染色体上の 50.3~54.5, 64.6~119.9 および 119.9~137 Mb の 3 領域に統計学的に有意な 2.80~3.91 の LOD スコアが検出され (Fig. 4 および Table 5)、高周波特異的な聴力に作用する新規 QTL(s) の存在が示唆された。また、32-kHz の聴力においては *Fscn2^{ahl8}* の効果は検出されず (Fig. 5)、超音波周波数においては *Cdh23^{ahl}* に加えて優性効果をもつ QTL(s) の効果が予想された。これらの解析から、D2J マウスの早発性難聴は、その遺伝的背景に存在する周波数特異的な聴力機能に作用する遺伝子群、およびそれら遺伝子における系統特異

的な変異によって支配されていることが示唆された。

2. NOD/Shi マウス系統の先天性難聴の遺伝要因の同定

NOD 系統はヒト I 型糖尿病モデルマウスとして知られているが [Rothe *et al.*, 2001; Ikegami *et al.*, 2003]、早発性重度難聴発症のモデルであり、生後 3 ヶ月齢で聴力はほぼ欠損する [Zheng *et al.*, 1999; Johnson and Zheng, 2002]。また、その主要な遺伝的要因としては、*Cdh23^{ahl}* および第 5 番染色体上の 79.5 Mb の領域の *ahl2* 遺伝子座が報告されているが [Johnson and Zheng, 2002]、*ahl2* 遺伝子座の責任遺伝子の実体は明らかとなっていない。特に、本研究で実施した D2J マウスの遺伝学的解析によって同定された第 5 番染色体上の難聴感受性 QTLs のうち、一つの遺伝子座は *ahl2* 遺伝子座とオーバーラップしていた。このデータは両系統の難聴発症が第 5 番染色体上の共通した QTL によって支配されていることを示唆している。そこで、本研究では NOD 系統を用いて聴覚機能の表現型および遺伝学的解析によって *ahl2* 領域の詳細な位置決定を目的に研究を実施した。

第一に、本研究では 4-, 8-, 16-および 32-kHz において 25 頭の NOD の ABR 閾値を測定し、その聴力を検討した。4-, 8-, 16-および 32-kHz の生後 1 ヶ月齢の NOD の聴力を野生型の B6J 系統と比較した結果、B6J は 39.3 dB ± 6.1, 18.3 dB ± 3.7, 20.5 dB ± 5.8 および 38.8 dB ± 10.4 の平均聴力閾値を示したが、NOD は 95.0

dB \pm 11.09, 93.8 dB \pm 11.8, 97.6 dB \pm 5.0 および 99.4 dB \pm 2.2 と閾値は最大値 (100 dB) 近傍であり、すべての周波数領域においてほぼ完全に聴力が欠損していた (Fig. 10 および Table 8)。また、この結果から、NOD マウスは重度な難聴を先天的に発症することが明らかとなった。

次に、NOD の先天性難聴の遺伝解析を実施するため、24 頭の (NOD \times B6J) F₁ 個体およびその F₁ に NOD を交配した 179 個体の戻し交配分離個体を作製した。生後 1 ヶ月齢の F₁ マウスの聴力測定を行った結果、F₁ マウスは 4-および 8-kHz において B6J と類似した聴力閾値を示したが、16-kHz においては B6J と NOD の両系統と有意差が認められ、さらに、32-kHz においては NOD と類似した聴力閾値を示した (Fig. 13 および Table 8)。また、N₂ 個体を用いて聴力測定を行った結果、4-kHz において二項分布に近い分布、8-kHz においては低～高レベルの ABR 閾値に渡って分布を示し、16-kHz においては正常聴力個体が存在するものの 52.0 % の個体が重度難聴を発症しており、さらに、32-kHz においては 80.4 % の個体が NOD に重度難聴を発症していた (Fig. 14)。これらの結果から、NOD マウスの難聴発症は、周波数ごとに効果の大きさが異なる QTL が周波数特異的に存在し、さらに 16-および 32-kHz の難聴発症には優性効果をもつ QTL が関与することが強く示唆された。次に、N₂ を用いて全染色体上に 136 種のマーカーの遺伝子型を SSLP 法により判定し、ほとんどの N₂ マウスが重度難聴を発症し

た 32-kHz を除き、QTL 連鎖解析を行った。その結果、4-kHz において第 5, 9 および 10 番染色体、8-kHz において第 1, 5 および 6 番染色体、さらに 16-kHz においては第 1, 5, 6 および 7 番染色体に統計学的に有意な LOD スコアが検出された (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)。特に、第 5 番染色体上の 4.2~35.6 および 35.6~64.6 Mb の領域にはすべての周波数において LOD スコア 3.40, 5.08 および 4.83 の効果の強い QTL が認められ (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)、既存の *ahl2* 遺伝子座が存在する領域においては、8-kHz で LOD スコア 4.03 の値が検出された (Fig. 15, Fig. 16 および Table 9)。しかし、4.2~35.6 および 35.6~64.6 Mb の領域ではそれぞれ 5.08 および 4.83 とより効果の強い QTL の存在を示唆する LOD スコアが検出され (Fig. 16 および Table 9)、NOD の主要な難聴発症は *ahl2* 遺伝子座のみの効果では説明できず、その難聴発症の原因は第 5 番染色体上の複数の QTL と他の染色体上に存在する QTL の相加的効果であることが予想された。一方、D2J マウスおよび NOD マウスの遺伝解析によって同定された第 5 番染色体上の 50.3~64.6 Mb 領域の QTL はオーバーラップしており (Fig. 4, Fig. 16, Table 5 および Table 9)、両系統に共通する早期難聴発症に関与するアレルが存在することも予想された。D2J の難聴は音のシグナル変換に重要な内耳有毛細胞の感覚毛の一部が短毛化することが原因であることが報告されており [Perrin *et al.*, 2013]、本研究で NOD の内耳蝸牛組織の形態を走査型電子顕微鏡 (Scanning

Electron Microscope: SEM) を用いて観察した結果、NOD の内耳蝸牛有毛細胞における感覚毛がD2J同様に短毛化していることが示され (Fig. 11およびFig. 12)、両系統間に共通する QTL の変異アレルが感覚毛短毛化に影響を及ぼす可能性も考えられた。

以上に示したように、これらの 2 系統は感覚毛異常を示すヒトの早発性および先天性の多因子難聴モデルとなりうる可能性がある。従って、本研究において同定した両系統の難聴発症関与 QTL のデータに基づき発症責任遺伝子が同定されることは、ヒトの遺伝子診断のために重要な情報提供となる。また、両マウス系統が蝸牛有毛細胞の感覚毛の短毛化により難聴を発症することから、感覚毛の主成分であるアクチンフィラメント [Amiel and Karen, 2009] を標的とした薬剤の治療効果の検証など抗難聴薬および難聴治療薬の開発に貢献するモデル動物として有用性であると考えられ、将来的にこのようなマウスモデルの利用により抗難聴薬が開発されることも期待される。さらに、近年、厚生労働省の認可が不要な機能性食品の疾患に対する予防および治療も注目されており、両マウス系統がこれらのモデルとして利用されることによって生物産業学分野における貢献も期待できる。それゆえ、本研究で解析した両マウス系統の表現型および遺伝学的解析データは、難聴によるヒトの QOL への悪影響を軽減するための様々な研究開発において大きく貢献できるものと考えられた。

参考文献

1. Amiel, A.D. and Karen, B.A. 2009. Hearing Loss: Mechanisms Revealed by Genetics and Cell Biology. *Annu. Rev. Genet.* 43: 411-437.
2. Anderson, M.G., Smith, R.S., Hawes, N.L., Zabaleta, A., Chang, B., Wiggs, J.L. and John, S.W. 2002. Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat. Genet.* 30: 81-85.
3. Avenarius, M.R., Saylor, K.W., Lundeberg, M.R., Wilmarth, P.A., Shin, J.B., Spinelli, K.J., Pagana, J.M., Andrade, L., Kachar, B., Choi, D., David, L.L. and Barr-Gillespie, P.G. 2014. Correlation of actin crosslinker and capper expression levels with stereocilia growth phases. *Mol. Cell. Proteomics* 13: 606-620.
4. Belknap, J.K., Crabbe, J.C., Riggan, J. and O'Toole, L.A. 1993. Voluntary consumption of morphine in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112: 352-358.
5. Belknap, J.K., Crabbe, J.C. and Young, E.R. 1993. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112: 503-510.
6. Broman, K.W. and Sen, S. 2009. A Guide to QTL Mapping with R/qlt, Springer, New York.
7. Casellas, J. 2011. Inbred mouse strains and genetic stability: a review. *Animal* 5:

- 1-7.
8. Cunningham, C.L., Malott, D.H., Dickinson, S.D. and Risinger, F.O. 1992. Haloperidol does not alter expression of ethanol-induced conditioned place preference. *Behav. Brain. Res.* 50: 1-5.
9. Delmaghani, S., Aghaie, A., Compain-Nouaille, S., Ataie, A., Lemainque, A., Zeinali, S., Lathrop, M., Weil, D. and Petit, C. 2003. DFNB40, a recessive form of sensorineural hearing loss, maps to chromosome 22q11.21-12.1. *Eur. J. Hum. Genet.* 11: 816-818.
10. Dickson, S.P., Wang, K., Krantz, I., Hakonarson, H. and Goldstein, D.B. 2010. Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol.* 8: e1000294.
11. Ding, C., MacVeigh, M., Pidgeon, M., da Costa, S.R., Wu, K., Hamm-Alvarez, S.F. and Schechter, J.E. 2006. Unique ultrastructure of exorbital lacrimal glands in male NOD and BALB/c mice. *Curr. Eye Res.* 31:13-22.
12. Fettiplace, R. and Hackney, C.M. 2006. The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 19-29.
13. Fransen, E., Lemkens, N., Van, Laer, L. and Van, Camp, G. 2003. Age-related hearing impairment (ARHI): environmental risk factors and genetic prospects. *Exp. Gerontol.* 38: 353-359.

14. Friedman, R.A., Van, Laer, L., Huentelman, M.J., Sheth, S.S., Van, Eyken, E., Corneveaux, J.J., Tembe, W.D., Halperin, R.F., Thorburn, A.Q., Thys, S., Bonneux, S., Fransen, E., Huyghe, J., Pyykkö, I., Cremers, C.W., Kremer, H., Dhooge, I., Stephens, D., Orzan, E., Pfister, M., Bille, M., Parving, A., Sorri, M., Van, de Heyning, P.H., Makmura, L., Ohmen, J.D., Linthicum, F.H. Jr., Fayad, J.N., Pearson, J.V., Craig, D.W., Stephan, D.A., and Van, Camp, G. 2009. GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Hum. Mol. Genet.* 18: 785-796.
15. Fuller, J.L. and Sjursen, F.H. Jr. 1967. Audiogenic seizures in eleven mouse strains. *J. Hered.* 58: 135-140.
16. Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Brown, K.A., Antonio, M., Beisel, K.W., Steel, K.P. and Brown, S.D. 1995. A type VII myosin encoded by the mouse deafness gene shaker-1. *Nature.* 374: 62-64.
17. Giroto, G., Vuckovic, D., Buniello, A., Lorente-Cánovas, B., Lewis, M., Gasparini, P. and Steel, K.P. 2014. Expression and replication studies to identify new candidate genes involved in normal hearing function. *PLoS ONE* 9: e85352.
18. Hashimoto, Y., Kim, D.J. and Adams, J.C. 2011. The roles of fascin in health and disease. *J. Pathol.* 224: 289-300.
19. Henry, K.R. and Chole, R.A. 1980. Genotypic differences in behavioral,

- physiological and anatomical expressions of age-related hearing loss in the laboratory mouse. *Audiology* 19: 369-383.
20. Horn, H.F., Brownstein, Z., Lenz, D.R., Shivatzki, S., Dror, A.A., Dagan-Rosenfeld, O., Friedman, L.M., Roux, K.J., Kozlov, S., Jeang, K.T., Frydman, M., Burke, B., Stewart, C.L. and Avraham, K.B. 2013. The LINC complex is essential for hearing. *J. Clin. Invest.* 123: 740-750.
21. Ikeda, A., Zheng, Q.Y., Rosenstiel, P., Maddatu, T., Zuberi, A.R., Roopenian D.C., North, M.A., Naggert, J.K., Johnson, K.R. and Nishina, P.M. 1999. Genetic modification of hearing in tubby mice: evidence for the existence of a major gene (*moth1*) which protects tubby mice from hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1761-1767.
22. Ikegami, H., Fujisawa, T., Makino, S. and Ogihara, T. 2003. Congenic mapping and candidate sequencing of susceptibility genes for Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 196-204.
23. Irshad, S., Santos, R.L., Muhammad, D., Lee, K., McArthur, N., Haque, S., Ahmad, W. and Leal, S.M. 2005. Localization of a novel autosomal recessive non-syndromic hearing impairment locus *DFNB55* to chromosome 4q12-q13.2. *Clin. Genet.* 68: 262-267.

24. Jenkins, N.A., Copeland, N.G, Taylor, B.A. and Lee, B.K. 1981. Dilute (d) coat colour mutation of DBA/2J mice is associated with the site of integration of an ecotropic MuLV genome. *Nature* 293: 370-374.
25. Johnson, K.R., Zheng, Q.Y. and Erway, L.C. 2000. A major gene affecting age-related hearing loss is common to at least ten inbred strains of mice. *Genomics* 70: 171-180.
26. Johnson, K.R. and Zheng, Q.Y. 2002. *Ahl2*, a second locus affecting age-related hearing loss in mice. *Genomics* 80: 461-464.
27. Johnson, K.R., Longo-Guess, C., Gagnon, L.H., Yu, H. and Zheng, Q.Y. 2008. A locus on distal chromosome 11 (*ahl8*) and its interaction with *Cdh23^{ahl}* underlie the early onset, age-related hearing loss of DBA/2J mice. *Genomics* 92: 219-225.
28. Karolyi, I.J., Probst, F.J., Beyer, L., Odeh, H., Dootz, G., Cha, K.B., Martin, D.M., Avraham, K.B., Kohrman, D., Dolan, D.F., Raphael, Y. and Camper, S.A. 2003. *Myo15* function is distinct from *Myo6*, *Myo7a* and pirouette genes in development of cochlear stereocilia. *Hum. Mol. Genet.* 12: 2797-2805.
29. Keane, T.M., Goodstadt, L., Danecek, P., White, M.A., Wong, K., Yalcin, B., Heger, A., Agam, A., Slater, G., Goodson, M., Furlotte, N.A., Eskin, E., Nellåker, C., Whitley, H., Cleak, J., Janowitz, D., Hernandez-Pliego, P., Edwards, A., Belgard,

- T.G., Oliver, P.L., McIntyre, R.E., Bhomra, A., Nicod, J., Gan, X., Yuan, W., van der Weyden, L., Steward, C.A., Bala, S., Stalker, J., Mott, R., Durbin, R., Jackson, I.J., Czechanski, A., Guerra-Assunção, J.A., Donahue, L.R., Reinholdt, L.G., Payseur, B.A., Ponting, C.P., Birney, E., Flint, J. and Adams, D.J. 2011. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 477: 289-294.
30. Keller, J.M., Neely, H.R., Latoche, J.R. and Noben-Trauth, K. 2011. High-frequency sensorineural hearing loss and its underlying genetics (*Hfh11* and *Hfh12*) in NIH Swiss mice. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 12: 617-631.
31. Keller, J.M. and Noben-Trauth, K. 2012. Genome-wide linkage analyses identify *Hfh11* and *Hfh13* with frequency-specific effects on the hearing spectrum of NIH Swiss mice. *B.M.C. Genet.* 13: 32.
32. Kikkawa, Y., Seki, Y., Okumura, K., Ohshiba, Y., Miyasaka, Y., Suzuki, S., Ozaki, M., Matsuoka, K., Noguchi, Y. and Yonekawa, H. 2012. Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp. Anim.* 61: 85-98.
33. Kitajiri, S., Fukumoto, K., Hata, M., Sasaki, H., Katsuno, T., Nakagawa, T., Ito, J., Tsukita, S. and Tsukita, S. 2004. Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *J. Cell. Biol.* 166: 559-570.
34. Maier, L.M., Smyth, D.J., Vella, A., Payne, F., Cooper, J.D., Pask, R., Lowe, C.,

- Hulme, J., Smink, L.J., Fraser, H., Moule, C., Hunter, K.M., Chamberlain, G., Walker, N., Nutland, S., Undlien, D.E., Rønningen, K.S., Guja, C., Ionescu-Tîrgoviste, C., Savage, D.A., Strachan, D.P., Peterson, L.B., Todd, J.A., Wicker, L.S. and Twells, R.C. 2005. Construction and analysis of tag single nucleotide polymorphism maps for six human-mouse orthologous candidate genes in type 1 diabetes. *B.M.C. Genet.* 6: 9.
35. Makino, S., Kunimoto, K., Muraoka, Y., Mizushima, Y., Katagiri, K. and Tochino, Y. 1980. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29: 1-13.
36. Mann, Z.F. and Kelley, M.W. 2011. Development of tonotopy in the auditory periphery. *Hear. Res.* 276: 2-15.
37. Mills, J.H. and Going, J.A. 1982. Review of environmental factors affecting hearing. *Environ. Health Perspect.* 44: 119-127.
38. Miyasaka, Y., Suzuki, S., Ohshiba, Y., Watanabe, K., Sagara, Y., Yasuda, S.P., Matsuoka, K., Shitara, H., Yonekawa, H., Kominami, R. and Kikkawa, Y. 2013. Compound heterozygosity of the functionally null *Cdh23^{v-ngt}* and hypomorphic *Cdh23^{ahl}* alleles leads to early-onset progressive hearing loss in mice. *Exp. Anim.* 62: 333-346.
39. Moore, K.J., Swing, D.A., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. 1994. The murine

- dilute suppressor gene encodes a cell autonomous suppressor. *Genetics* 138: 491-497.
40. Morse, H.C. 1978. Origins of Inbred Mice. pp. 3-27. *In: Introduction* (Morse, H.C. ed.), Academic Press, New York.
41. Morton, C.C. and Nance, W.E. 2006. Newborn hearing screening--a silent revolution. *N. Engl. J. Med.* 354: 2151-2164.
42. Müller, M., von Hünerbein, K., Hoidis, S. and Smolders, J.W. 2005. A physiological place-frequency map of the cochlea in the CBA/J mouse. *Hear. Res.* 202: 63-73.
43. Müller, U. 2008. Cadherins and mechanotransduction by hair cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: 557-566.
44. Nagtegaal, A.P., Spijker, S., Crins, T.T., Neuro-Bsik, Mouse, Phenomics, Consortium. and Borst, J.G. 2012. A novel QTL underlying early-onset, low-frequency hearing loss in BXD recombinant inbred strains. *Genes Brain Behav.* 11: 911-920.
45. Neumann, P.E. and Collins, R.L. 1991. Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 5408-5412.
46. Noben-Trauth, K., Zheng, Q.Y. and Johnson, K.R. 2003. Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss.

- Nat. Genet.* 35: 21-23.
47. Noben-Trauth, K. and Johnson, K.R. Brain Res. 2009. Inheritance patterns of progressive hearing loss in laboratory strains of mice. *Brain Res.* 1277: 42-51.
48. Odeh, H., Hunker, K.L., Belyantseva, I.A., Azaiez, H., Avenarius, M.R., Zheng, L., Peters, L.M., Gagnon, L.H., Hagiwara, N., Skynner, M.J., Brilliant, M.H., Allen, N.D., Riazuddin, S., Johnson, K.R., Raphael, Y., Najmabadi, H., Friedman, T.B., Bartles, J.R., Smith, R.J. and Kohrman, D.C. 2010. Mutations in *Grxcr1* are the basis for inner ear dysfunction in the pirouette mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 86: 148-160.
49. Ohlemiller, K.K., Rice, M.E. and Gagnon, P.M. 2008. Strial microvascular pathology and age-associated endocochlear potential decline in NOD congenic mice. *Hear. Res.* 244: 85-97.
50. Perrin, B.J., Sonnemann, K.J. and Ervasti, J.M. 2010. β -actin and γ -actin are each dispensable for auditory hair cell development but required for Stereocilia maintenance. *PLoS Genet.* 6: e1001158.
51. Perrin, B.J., Strandjord, D.M., Narayanan, P., Henderson, D.M., Johnson, K.R. and Ervasti, J.M. 2013. β -Actin and fascin-2 cooperate to maintain stereocilia length. *J. Neurosci.* 33: 8114-8121.

52. Peters, L.M., Fridell, R.A., Boger, E.T., San, Agustin, T.B., Madeo, A.C., Griffith, A.J., Friedman, T.B. and Morell, R.J. 2008. A locus for autosomal dominant progressive non-syndromic hearing loss, *DFNA27*, is on chromosome 4q12-13.1. *Clin. Genet.* 73: 367-372.
53. Porcu, P., Locci, A., Santoru, F., Berretti, R., Morrow A.L. and Concas, A. 2014. Failure of acute ethanol administration to alter cerebrocortical and hippocampal allopregnanolone levels in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 38: 948-958.
54. Powers, R.J., Roy, S., Atilgan, E., Brownell, W.E., Sun, S.X., Gillespie, P.G. Spector, A.A. 2011. Stereocilia membrane deformation: implications for the gating spring and mechanotransduction channel. *Biophys. J.* 102: 201-210.
55. Rothe, H., Ito, Y. and Kolb, H. 2001. Disease resistant, NOD-related strains reveal checkpoints of immunoregulation in the pancreas. *J. Mol. Med. (Berl)* 79: 190-197.
56. Schraders, M., Lee, K., Oostrik, J., Huygen, P.L., Ali, G., Hoefsloot, L.H., Veltman, J.A., Cremers, F.P., Basit, S., Ansar, M., Cremers, C.W., Kunst, H.P., Ahmad, W., Admiraal, R.J., Leal, S.M. and Kremer, H. 2010. Homozygosity mapping reveals mutations of *GRXCR1* as a cause of autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 86: 138-147.

57. Shin, J.B., Longo-Guess, C.M., Gagnon, L.H., Saylor, K.W., Dumont, R.A., Spinelli, K.J., Pagana, J.M., Wilmarth, P.A., David, L.L, Gillespie, P.G. and Johnson, K.R. 2010. The R109H variant of fascin-2, a developmentally regulated actin crosslinker in hair-cell stereocilia, underlies early-onset hearing loss of DBA/2J mice. *J. Neurosci.* 30: 9683-9694.
58. Shin, J.B., Krey, J.F., Hassan, A., Metlagel, Z., Tauscher, A.N., Pagana, J.M., Sherman, N.E., Jeffery, E.D., Spinelli, K.J., Zhao, H., Wilmarth, P.A., Choi, D., David, L.L., Auer, M. and Barr-Gillespie, P.G. 2013. Molecular architecture of the chick vestibular hair bundle. *Nat. Neurosci.* 16: 365-374.
59. Siemens, J., Lillo, C., Dumont, R.A., Reynolds, A., Williams, D.S., Gillespie, P.G. and Müller, U. 2004. Cadherin 23 is a component of the tip link in hair-cell stereocilia. *Nature* 428:950-955.
60. Takada, T., Ebata, T., Noguchi, H., Keane, T.M., Adams, D.J., Narita, T., Shin-I, T., Fujisawa, H., Toyoda, A., Abe, K., Obata, Y., Sakaki, Y., Moriwaki, K., Fujiyama, A., Kohara, Y. and Shiroishi, T. 2013. The ancestor of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. *Genome Res.* 23: 1329-1338.
61. Todd, I., Pujol-Borrell, R., Belfiore, A. and Bottazzo, G.F. 1987. Thyrocyte HLA

- class II expression and regulation in relation to thyroid autoimmunity. *Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh)* 281: 27-34.
62. van, Blokland, S.C. and Versnel, M.A. 2002. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: characteristics of different mouse models for autoimmune exocrinopathy. *Clin. Immunol.* 103:111-124.
63. Van, Laer, L., Huyghe, J.R., Hannula, S., Van, Eyken, E., Stephan, D.A., Mäki-Torkko, E., Aikio, P., Fransen, E., Lysholm-Bernacchi, A., Sorri, M., Huentelman, M.J. and Van, Camp, G. 2010. A genome-wide association study for age-related hearing impairment in the Saami. *Eur. J. Hum. Genet.* 18: 685-693.
64. Vetter, D.E., Li, C., Zhao, L., Contarino, A., Liberman, M.C., Smith, G.W., Marchuk, Y., Koob, G.F., Heinemann, S.F., Vale, W. and Lee, K.F. 2002. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat. Genet.* 31: 363-369.
65. Vollrath, M.A., Kwan, K.Y. and Corey, D.P. 2007. The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 30: 339-365.
66. Williams, P.A., Howell, G.R., Barbay, J.M., Braine, C.E., Sousa, G.L., John, S.W. and Morgan, J.E. 2013. Retinal ganglion cell dendritic atrophy in DBA/2J glaucoma. *PLoS One* 8: e72282.

67. Wooley, G.W. and Dickie, M.M. 1945. Pirouetting mice. *J. Hered.* 36: 281–284.
68. Yan, D., Zhu, Y., Walsh, T., Xie, D., Yuan, H., Sirmaci, A., Fujikawa, T., Wong, A.C., Loh, T.L., Du, L., Grati, M., Vljakovic, S.M., Blanton, S., Ryan, A.F., Chen, Z.Y., Thorne, P.R., Kachar, B., Tekin, M., Zhao, H.B., Housley, G.D., King, M.C. and Liu, X.Z. 2013. Mutation of the ATP-gated P2X₂ receptor leads to progressive hearing loss and increased susceptibility to noise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 2228-2233.
69. Yokoyama, J.S., Lam, E.T., Ruhe, A.L., Erdman, C.A., Robertson, K.R., Webb, A.A., Williams, D.C., Chang, M.L., Hytönen, M.K., Lohi, H., Hamilton, S.P. and Neff, M.W. 2012. Variation in genes related to cochlear biology is strongly associated with adult-onset deafness in border collies. *PLoS Genet.* 8: e1002898.
70. Zheng, Q.Y., Johnson, K.R. and Erway, L.C. 1999. Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear. Res.* 130: 94-107.

謝辞

本論文を作成するあたり、多大なるご指導ならびにご助言を賜りました本研究の指導教授である東京農業大学大学院生物産業学研究科・教授・横濱道成博士（農学博士）に厚く御礼申し上げます。

本研究のすべての遂行、論文執筆など、終始多大なる実験および研究指導ならびに援助を頂いた元東京農業大学大学院生物産業学研究科・准教授、現公益財団法人東京都医学総合研究所・プロジェクトリーダー・吉川欣亮博士（畜産学）に深く感謝の意を表します。同時に、実験遂行と論文執筆に対して多くのご助言を頂きました東京農業大学生物産業学部・助教・和田健太博士（生物産業学）に御礼申し上げます。

また、DBA/2J マウスの研究の立上げ、実験指導ならびに聴力測定、遺伝学的解析にご協力頂いた東京農業大学生物生産学科・平成 21 年度卒業生であります石川昌志氏（農学士）、東京農業大学大学院生物産業学研究科・平成 22 年度卒業生であります植田卓也氏（生物産業学修士）に感謝の意を表します。さらに、実験指導ならびに聴力測定にご協力頂いた東京農業大学大学院生物産業学研究科・平成 22 年度卒業生および現千葉県がんセンター・研究員・奥村和弘博士（生物産業学）、聴力測定および組織学的解析にご協力頂いた新潟大学大学院医歯薬

総合研究科・平成 23 年度卒業生であります大芝泰弘氏（医学修士）、聴力測定にご協力頂いた公益財団法人東京都医学総合研究所および新潟大学大学院医歯薬総合研究科・宮坂勇輝氏（医学修士）、DBA/2J マウスを分与して頂いた公益財団法人東京都医学総合研究所・多屋長治博士（医学博士）、本論文作成にご協力頂いた公益財団法人東京都医学総合研究所・松岡邦枝博士（理学博士）、実験にご協力頂いた東京農業大学生物生産学科・平成 23 年度卒業生であります寒澤英理香氏（農学士）に感謝の意を表します。

さらに、NOD/Shi マウスの遺伝学的解析の実験に多大なご協力を頂いた公益財団法人東京都医学総合研究所・研修生および筑波大学大学院生命環境科学研究科・小原央氏（農学士）、遺伝学的実験指導ならびにご助言頂いた公益財団法人東京都医学総合研究所・安田俊平博士（地球環境科学）、遺伝学的解析にご協力頂いた 東京農業大学大学院生物生産学研究科・長谷川清香氏（農学士）に感謝の意を表します。

最後に、本研究は日本学術振興会の科学研究費である特別研究員奨励費（課題番号: 25・5376）、基盤 B（課題番号: 20300147 および 23300160）の支援の基で行いました。ここに感謝の意を表します。

要約

難聴はヒト集団で最も発症頻度が高い感覚器疾患であり、50～70%の患者が遺伝的要因により発症する。本研究は、多因子疾患である早発性・進行性難聴を標的とし、順遺伝学的解析によって2系統の近交系マウスの難聴発症の遺伝要因の特定を目的に研究を実施した。第一に、早発性難聴モデルであるDBA/2Jマウスの遺伝学的解析を行った結果、第5番染色体上の50.3～54.5, 64.6～119.9および119.9～137 Mbの3領域に統計学的に有意な2.80～3.91のLODスコアに裏打ちされたDBA/2Jマウスの難聴発症に関与する新規のQuantitative Trait Loci (QTLs) が同定された。次に、先天性難聴発症モデルであるNOD/Shiマウスの遺伝学的解析を行った結果、第1, 5, 6, 7, 9および10番染色体上に統計学的に有意な2.68～2.72のLODスコアが検出され、NOD/Shiマウスの難聴はこれらのQTLsの相加的効果により発症する可能性が示された。また、第5番染色体上の4.2～35.6および35.6～64.6 Mbの領域には、低～高周波数領域(4-, 8-および16-kHz)に共通する統計学的に有意なLODスコア3.40～4.83を示すQTLsが検出され、さらに、このうちの50.3～64.6 Mb領域のQTLはDBA/2JおよびNOD/Shiマウスに共通したQTLであることも予想された。DBA/2JおよびNOD/Shiマウスは共に内耳蝸牛有毛細胞の感覚毛が短毛化し、類似した表現型を示したことから、

この QTL に存在する変異アレルが両系統間の感覚毛短毛化に影響をおよぼす可能性も考えられた。

Summary

Genetic study on polygenic hearing loss used mouse models

Sari Suzuki

Department of Bioproduction, Graduate School of Bioindustry,

Tokyo University of Agriculture

Hearing loss is the most common sensory disease in the human population and severely affects the quality of life. Although the causes of hearing loss are manifold, involving both genetic and environmental factors, half of hearing loss cases is considered to have a genetic origin. Although many mutations in single gene responsible for hearing loss have been recently identified in humans, the responsible mutations and genes for hearing loss develop by effects of multi-genes were still unknown. In the identification of the polygenetic factors associated with acquired hearing loss, inbred strains of mice offer important advantages as bioresources because of the controlled handling environment, ability to maintain genetic stability, well-characterized genetic polymorphisms and hearing abilities among the strains. To

identify the polygenic factors (Quantitative Trait Loci: QTLs), the author performed forward genetic studies in two inbred mouse strains, DBA/2J and NOD/Shi, which develop profound early-onset hearing loss.

The DBA/2J strain is a model for early-onset, progressive hearing loss in humans, as confirmed in the present study. DBA/2J mice showed hearing loss to low-frequency sounds from ultrasonic-frequency sounds and profound hearing loss at all frequencies before 7 months of age. It is known that the early-onset hearing loss of DBA/2J mice is caused by affects in the *ahl* (*Cdh23^{ahl}*) and *ahl8* (*Fscn2^{ahl8}*) alleles of the cadherin 23 and fascin 2 genes, respectively. Although the strong contributions of the *Fscn2^{ahl8}* allele were detected in hearing loss at 8- and 16-kHz stimuli with LOD scores of 5.02 at 8 kHz and 8.84 at 16 kHz, hearing loss effects were also demonstrated for three new QTLs for the intervals of 50.3–54.5, 64.6–119.9 and 119.9–137.0 Mb, respectively, on chromosome 5 with the significant LOD scores of 2.80–3.91 for specific high-frequency hearing loss at 16 kHz by quantitative trait loci linkage mapping using a (DBA/2J × C57BL/6J) F₁ × DBA/2J backcross mice. Moreover, the author showed that the contribution of *Fscn2^{ahl8}* to early-onset hearing loss at 32-kHz stimuli is extremely low and raised the possibility of effects from the *Cdh23^{ahl}* allele and another dominant quantitative trait locus (loci) for hearing loss at this

ultrasonic-frequency. Therefore, our results suggested frequency-specific QTLs control early-onset hearing in DBA/2J mice.

The NOD/Shi mouse congenitally develops profound hearing loss due to stereocilia defects in the cochlear hair cells. It is known that hearing loss of NOD/Shi mice is caused by affects in the *Cdh23^{ahl}* and *ahl2* locus. The *ahl2* locus was previously mapped to chromosome 5 by linkage analysis of (NOD/ShiLtJ × C57BL/6J) × NOD/Shi LtJ backcross mice. Although the author recently mapped QTLs on chromosome 5, including the *ahl2* locus, using the same genetic cross, the author found susceptible QTLs in other regions on the mouse chromosome. First, the author assessed the hearing abilities of (NOD/Shi × C57BL/6J) F₁ and [(NOD/Shi × C57BL/6J) F₁ × NOD/Shi] backcross mice by measuring the thresholds of ABR to 4-, 8-, 16-, and 32-kHz stimuli. Although the ABR thresholds of the F₁ mice at 4 weeks of age were more similar to those of the C57BL/6J mice than to those of the NOD/Shi mice at 4-, 8-, and 16-kHz, the thresholds for 8- and 16-kHz stimuli were significantly different to those in both parent strains. By contrast, ABR thresholds of the F₁ mice were similar to those of the NOD/Shi mice at 32-kHz. Moreover, the ABR thresholds of the backcross mice at 4-, 8-, 16- and 32-kHz were 21.8%, 90.1%, 25.7% and 23.5% indicating significant differences between the C57BL/6J and NOD/Shi mice. These results suggest that hearing loss in the

NOD/Shi mice is influenced by multiple QTLs that are frequency specific. The author detected novel QTLs on chromosomes 1, 5, 6, 7, 9 and 10 with the significant LOD scores of 2.62–2.72 for each frequency by QTL linkage analysis. In particular, the author detected QTLs with LOD scores of 2.91–5.08 in 4.2–35.6 and 35.6–64.6 Mb on chromosome 5 of the NOD mice, which were strongly associated with congenital hearing loss.