

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 宮坂 勇輝
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 692 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Compound heterozygosity of the functionally null Cdh23v-*ngt* and hypomorphic Cdh23*ahl* alleles leads to early-onset progressive hearing loss in mice.
(マウスにおけるカドヘリン 23 の機能欠損 Cdh23v-*ngt* アレルとハイポモルフ Cdh23*ahl* アレルのヘテロ接合体は早発性・加齢性難聴を発症する)
論文審査委員 主査 教授 堀井 新
副査 教授 日比野 浩
副査 教授 小松 雅明

博士論文の要旨

[目的]

カドヘリン 23 遺伝子 (CDH23) は代表的なヒト難聴発症原因遺伝子である。CDH23 変異をもつ難聴患者の表現型の重篤度は変異の種類により異なり、概括的には、欠損変異ホモの遺伝子型の患者が難聴、網膜色素変性症および平衡異常を併発する Usher 症候群を、ハイポモルフ変異ホモの遺伝子型の患者が非症候群性難聴を発症すると定義づけられている。一方、マウス Cdh23 においても数多くの変異体が樹立されており、それらマウス変異体間にもヒト難聴患者と類似した遺伝子型・表現型相関が認められる。そこで本研究では欠損変異ホモ、ハイポモルフ変異ホモおよび欠損/ハイポモルフ複合ヘテロの遺伝子型のマウス変異体の聴覚表現型を調査することによって CDH23 変異に起因するヒトの病態発症を把握することを目的とした。

[材料および方法]

①Cdh23 変異モデルマウス

本研究で用いたマウスの Cdh23 の遺伝子型は、Cdh23 の欠損変異アレル (v-*ngt*: p. Gly49ValfsX3) およびハイポモルフ変異アレル (*ahl*: c. 753G>A) の 2 種であり、解析にはそれぞれのホモ個体および両者の複合ヘテロ接合体も用いた。

②遺伝子・蛋白質発現比較解析

Cdh23 遺伝子の発現解析は、各遺伝子型のマウス蝸牛由来の RNA を用いた RT-PCR により行った。また、CDH23 蛋白質の発現解析は、蝸牛の蛍光ホールマウント免疫染色法により実施した。

③表現型解析

Cdh23 変異マウスの平衡感覚機能は、オープンフィールド試験によりマウスの行動パターンを計測することにより調査した。また、聴覚の表現型は聴性脳幹反応 (ABR) の測定および走査性電子顕微鏡を用いた

蝸牛有毛細胞感覚毛の形態観察により評価した。

[結果および考察]

①マウス Cdh23 変異アレル間の遺伝子・蛋白質発現比較解析

本研究では、最初にそれぞれの Cdh23 変異マウスの遺伝子発現を調査した。ahl ハイポモルフ変異アレルは Cdh23 の第7エクソンのスプライシングドナー部位近傍に存在し、その変異により第7エクソンを欠損した転写産物を高頻度に転写されることが報告されている。その ahl ホモ個体の発現量を定量した結果、Cdh23 の発現量は野生型の約 72.1%に減少していた。一方、v-ugt ホモ個体の Cdh23 の発現量は野生型の 31.5%であり、v-ugt/ahl ヘテロ個体の発現量は 52.5%であった。次に、申請者らは CDH23 蛋白質の発現解析を実施した。その結果、v-ugt ホモ個体では発現欠損が確認され、ahl ホモおよび v-ugt/ahl ヘテロ個体においては内耳有毛細胞の感覚毛 (stereocilia) 間の感覚糸 (tip link) での局在を示唆するシグナルが検出された。その発現量は両者ともに未成熟の有毛細胞で高く、加齢に伴い減少する傾向が認められたが、v-ugt/ahl ヘテロ個体でより明確に減少していた。これらの結果から本研究で解析に用いたマウスの Cdh23/CDH23 の発現量はそれぞれ異なることが示された。

②Cdh23 欠損変異ホモ、ハイポモルフ変異ホモおよび欠損/ハイポモルフ複合ヘテロマウスの平衡感覚および聴覚表現型解析

本研究で解析に用いたマウスの遺伝子・蛋白質発現量の差異が明らかになったことから、その発現量差の表現型への影響を調査した。第一に申請者は v-ugt ホモ個体が重篤な平衡異常を発症することから、ahl ホモおよび v-ugt/ahl ヘテロ個体の平衡感覚機能を調査した。その結果、両者の行動パターンは野生型とほぼ同様であり、加齢による変化も認められなかった。次に、聴覚表現型を ABR 測定により評価した結果、ahl ホモ個体は加齢性難聴を、v-ugt ホモ個体は先天性重度難聴を発症することが再確認された。また、v-ugt/ahl ヘテロ個体においては個体差が存在するものの、特に 16 kHz 以上の高周波音の受容に早期に障害をもつ個体が多く出現し、ahl ホモ個体群との有意な聴力差が認められた。さらに、両者間では 4 および 8 kHz の低中周波音の聴力においても加齢に伴い徐々に有意な差が検出された。これらの結果から、申請者らは v-ugt/ahl 複合ヘテロ個体の聴覚表現型を高周波領域先行型の早発性・加齢性難聴として分類した。

CDH23 は有毛細胞の感覚毛間の tip link に局在し、v-ugt ホモ個体は先天性の感覚毛崩壊を示すことから、申請者らは ahl ホモおよび v-ugt/ahl ヘテロ個体の蝸牛有毛細胞の感覚毛形態を観察した。生後 1 ヶ月齢において ahl ホモおよび v-ugt/ahl ヘテロ個体の感覚毛は正常に形成されているように判断された。しかし、v-ugt/ahl ヘテロ個体においては早期に障害が認められた高周波音を受容する蝸牛基底回転部の一部の有毛細胞において、感覚毛の欠損および異常形態が検出された。その形態異常は進行し、加齢に伴い低中周波音を受容する蝸牛中回転および頂回転部の感覚毛、特に外有毛細胞の多くの感覚毛で脱落および融合が検出された。その表現型は加齢に伴いより重篤化し、生後 10 ヶ月齢では内有毛細胞も含め、ほぼすべての有毛細胞感覚毛が崩壊していた。一方、ahl ホモ個体において明確な感覚毛異常は生後 15 ヶ月齢まで検出されなかった。このような表現型差異は、遺伝子発現量と関連することが予想される。特に、v-ugt/ahl ヘテロ個体において感覚毛間の接着異常を示す表現型が多くの有毛細胞で観察されたことから、Cdh23 変異体の重篤度は CDH23 の tip link における発現量と相関することが示唆された。

[結語]

CDH23 は難聴患者において高頻度で変異が検出される遺伝子の一つである。その変異のバリエーション

は多様であり、変異部位や変異アレルの組み合わせによって表現型は異なる。本研究はマウスモデルを用いて一部のヒト変異を模倣した結果であり、CDH23 変異をもつ難聴患者の病態の把握および発症機序解明において有用な知見を示した。

審査結果の要旨

Cadherin 23 (Cdh23) の突然変異体 waltzer niigata (Cdh23v-*ngt*) マウスは、内耳有毛細胞の感覚毛 (stereocilia) の形成不全による先天性難聴および行動異常を発症する。一方、多くの近交系マウスが保有するハイポモルフ Cdh23ah1 アレルは、マウス加齢性難聴の発症に関与する。本研究では、機能欠損 Cdh23v-*ngt* アレルとハイポモルフ Cdh23ah1 アレルの複合ヘテロ個体 (Cdh23v-*ngt*/ah1) を作製し、聴覚・平衡感覚の表現型解析を実施した。その結果、Cdh23v-*ngt*/ah1 ヘテロ個体は聴覚のみに異常が認められ、Cdh23ah1/ah1 ホモ個体と比べて早発性の聴力低下を示した。また、この異常は感覚毛崩壊に起因することが明らかとなった。CDH23 は感覚毛間をつなぐ tip link に局在し、Cdh23v-*ngt*/ah1 ヘテロ個体では CDH23 の発現量が Cdh23ah1/ah1 ホモ個体と比べて減少したため、早発性・加齢性難聴を発症したと推定された。従って、Cdh23 変異体の重篤度は tip link における CDH23 の発現量と相関することが示唆された。本研究は CDH23 変異をもつ患者の難聴発症機序に関する有用な知見を示し、十分学位論文としての価値を持つと判断した。