

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06818

研究課題名(和文) 内耳外有毛細胞の形成と維持に関わる遺伝子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of functional genes in outer hair cells using an inducible depletion mouse model

研究代表者

松岡 邦枝 (MATSUOKA, Kunie)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：40291158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：「聞こえ」の調節を司る内耳外有毛細胞(OHC)を誘導的に破壊可能なマウスを用いて、OHCの機能に関与する遺伝子を探索した結果、難聴の原因遺伝子として知られている遺伝子群に加えて、聴覚での役割が明らかになっていない遺伝子を見出した。OHC破壊マウス内耳蝸牛で特に顕著な発現減少を示すOcmの欠損マウスを樹立した結果、OHCの形態異常と細胞数の減少を引き起こし、早期に進行性難聴を発症することが判明した。本研究で見出したOHCに発現する遺伝子の機能を明らかにすることでOHCにおける分子メカニズムが解明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In cochlea, outer hair cells (OHCs) play an essential role in the amplification of sound-induced vibrations. We generated a mouse model that lacks OHCs by administration of diphtheria toxin. We performed differential expression analysis of cochlea-derived mRNAs isolated from the OHC-depleted and control mice using by RNA-seq and microarray methods. We found that the expression of several genes was remarkably decreased in cochlea of OHC-depleted mice. The downregulated genes included causative genes for hearing impairment, such as Myo15, Strc, Pou4f3, Kcnq4, and Slc26a5. Moreover, we identified that the expression of Ocm, Chrna10, Ppp1r17, and Slc6a11, which was also significantly decreased in cochlea of the OHC-depleted mice. Immunohistochemical analysis showed that those genes were exactly expressed in OHCs. Thus, our study provided expression data of several genes that may have potential functional roles in OHCs.

研究分野：実験動物学

キーワード：難聴 疾患モデル 内耳外有毛細胞 RNA-seq CRISPR/Cas9システム

## 1. 研究開始当初の背景

聴覚機能の中核を担うのは、音刺激を電気刺激に変換して脳に伝える役割をしている 2 種の内耳有毛細胞 (内毛細胞 ; IHC および外毛細胞 ; OHC) である。我々が鋭敏な聴力を得られるのは、OHC の精密な増幅機構によるものであり、OHC は伸縮運動によって微弱な音刺激を増大させ、逆に過大に強い音刺激の場合には抑制的に音を伝達するという極めて重大な役割を担っている。

蝸牛における OHC の増幅機構は我々の聴覚において極めて重要な役割を果たしており、OHC の機能異常は難聴の発症に直結する。一般的に OHC の方が IHC よりも弱く、先に障害を受けることが多い。細菌やウイルスの感染、騒音への曝露、アミノグリコシド系の抗生剤の投与によっても OHC は損傷される。OHC は一度失われると再生せず、また加齢とともにその数は減少する。高齢者に難聴患者が多いのはそのためであるが、加齢性難聴の根本的な治療法はなく、補聴器の使用により聴力を補わざるを得ないのが現状である。加齢性難聴は人類に最も多い慢性疾患の一つであり、OHC の機能を明らかにすることは、難聴の予防や治療法の開発の基礎となる。そこで我々は、OHC の機能を解明するためのツールとして、標的細胞ノックアウト法 (TRECK 法) (Nat. Biotech. 19, 746-750, 2001) により任意の時期に OHC を誘導的に破壊可能なマウスモデル (OHC-TRECK マウス) を開発した。このマウスはジフテリア毒素 (DT) 受容体を OHC 特異的に強制発現するトランスジェニックマウスであり、DT を投与することで IHC に損傷を与えずに、OHC のみを特異的に破壊することが可能である (図 1)。

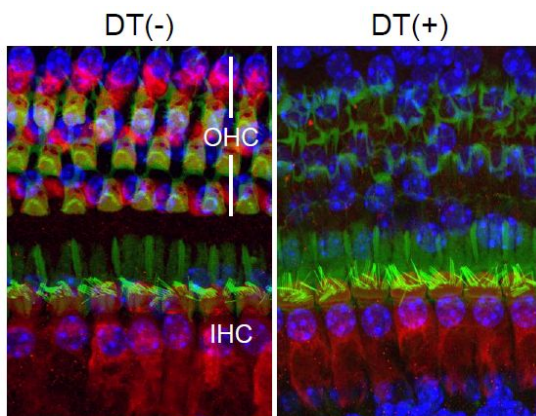


図1 DT投与前および投与後のOHC-TRECK マウス内耳有毛細胞の免疫染色像。細胞体はミオシンVI (赤) で感覚毛はファロイジン (緑) で染色した。

## 2. 研究の目的

OHC は「聞こえ」の調節に重要であるが、その分子メカニズムの完全な理解には至っていない。そこで本研究では、OHC において

重要な役割を担う遺伝子を探索することを目的として、OHC 破壊マウスと非破壊マウスの内耳蝸牛における遺伝子発現を網羅的に比較した。OHC 破壊マウスで発現量の減少する遺伝子を、OHC の機能に関与する遺伝子として抽出した。さらに、著しい発現減少を示す遺伝子については、ノックアウトマウスを樹立し、詳細な表現型解析を行って、OHC における機能を推定した。

## 3. 研究の方法

(1) OHC 破壊マウスおよび非破壊マウスの内耳蝸牛における発現遺伝子の比較

4 週齢の野生型 (WT) マウスおよび OHC-TRECK マウスに 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の DT を投与して 7 日後、および 5 週齢の DT 非投与の WT および OHC-TRECK マウスの内耳蝸牛より RNA を調整した。マイクロアレイは、Agilent Whole Mouse Genome Ver. 2.0 (4 x 44k type) を用いて発現解析を行った。RNA-seq は文部科学省科学研究費助成事業「新学術領域研究『学術研究支援基盤形成』」先進ゲノム支援の協力を受け、Illumina HiSeq2500 を用いて、100 bp のペアエンドシーケンスで行った。OHC 破壊マウスで顕著な発現減少の認められた遺伝子については、qRT-PCR を行って発現量を検証した。さらに、OHC の破壊により発現量の減少した遺伝子について GO 解析を行った。

(2) 内耳蝸牛の免疫組織化学解析

内耳蝸牛を 4% PFA 中で摘出、固定後、各種特異抗体およびファロイジンを用いて whole mount 標本の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(3) CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトマウスの樹立

OHC 破壊マウスで著しい発現減少が認められた *Oncomodulin* (*Ocm*) および *Ppp1r17* のノックアウト (KO) マウスは CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を行い、C57BL6/J を背景として樹立した。翻訳開始点直後の 20 mer をターゲットとして sgRNA を作製し、Cas9 RNA あるいは Cas9 タンパク質と同時に C57BL/6J マウス受精卵前核にマイクロインジェクションし、偽妊娠 ICR 雌マウスに移植して産仔を得た。変異の確認は、SURVEYOR Mutation Detection System および sequence 解析により行った。

(4) マウスの聴力測定

マウスの聴力は、4、8、16、32 kHz のトーンピップ音に対する聴性脳幹反応 (ABR) の測定により聴力閾値を判定した。また、OHC の伸縮運動の指標となる歪成分耳音響放射 (DPOAE) を測定した。

#### 4. 研究成果

(1)OHC 破壊マウスの内耳蝸牛で発現が減少する遺伝子の同定

OHC 破壊マウスの蝸牛において RNA-seq およびマイクロアレイ解析で共通して顕著に発現量が減少している遺伝子として *Myo15*, *Strc*, *Pou4f3*, *Kcnq4*, *Slc26a5* (prestin)等難聴の原因遺伝子として同定されている遺伝子群に加えて、聴覚における機能が明らかになっていない *Ocm*, *Chrna10*, *Ppp1r17*, *Slc6a11* が検出された。

(2)OHC 破壊マウスで著しい発現減少が認められた遺伝子の発現解析

OHC 破壊マウスでの発現減少が顕著であった遺伝子について qRT-PCR により検証した結果、難聴関連遺伝子 *Slc26a5*, *Strc*, *Myo15*, *Cdh23* および *Ocm*, *Chrna10*, *Ppp1r17*, *Slc6a11* の蝸牛における発現減少が実証された。一方、IHC 特異的発現遺伝子 *Vglut3* および支持細胞特異的発現遺伝子 *Sox2* に発現量の変動は認められなかった (図2)。

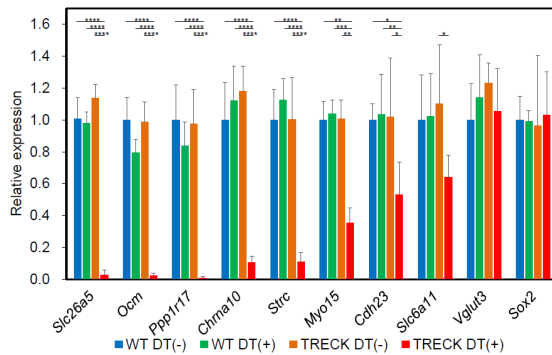


図2 qRT-PCRによるOHC破壊/非破壊マウス蝸牛における発現量の比較

さらに、OHC 破壊マウスでの発現減少が顕著であった遺伝子に関して、特異抗体を用いて内耳蝸牛 whole mount 標本の免疫染色を行った結果、OCM は OHC の核および細胞質に、PPP1R17、CHRNA10 および SLC6A11 は主に OHC のクチクラプレートに発現していることが明らかとなった (図3)。

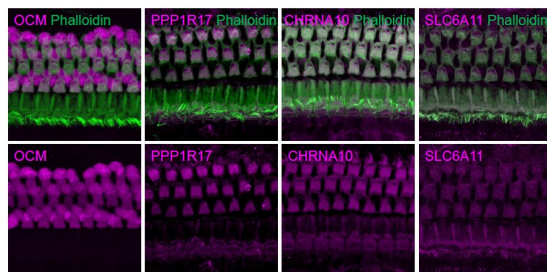


図3 OHC発現遺伝子の免疫組織染色  
内耳蝸牛のwhole mount標本を各特異抗体で染色した(マゼンタ)。感覚毛はファロイジンで可視化した(緑)。

(3) OHC 破壊マウスの内耳蝸牛で発現が減少する遺伝子の GO 解析

WT DT(-) vs WT DT(+) および WT DT(-) vs OHC-TRECK DT(-) で fold change  $\leq \pm 2$ 、OHC-TRECK DT(+) vs WT DT(+) で fold change  $\leq -2$  を示す 55 の変動遺伝子について GO 解析を行った結果、“transmembrane transporter activity”、“transmembrane transport”等膜輸送に関する GO term (青) および “sensory perception of sound”、“inner ear development”、“stereocilium bundle”等聴覚に関連する GO term (赤) が多く得られた (表1)。

表1 OHC破壊マウス蝸牛で発現減少した遺伝子のGO term

GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count in Selection	Count in Total
GO:0022857 GO:0005386 GO:0015646	transmembrane transporter activity	5.00E-05	9	930
GO:0056085	transmembrane transport	1.23E-04	9	1046
GO:0052151 GO:0005478	transporter activity	3.06E-04	9	1181
GO:0022891	substrate-specific transmembrane transporter activity	1.48E-04	8	834
GO:0007423 GO:0007605	sensory organ development	2.32E-04	6	466
GO:0007605	sensory perception of sound	2.53E-06	5	115
GO:0050954	sensory perception of mechanical stimulus	3.96E-06	5	126
GO:0048839	inner ear development	1.90E-05	5	174
GO:0043583	ear development	3.80E-05	5	201
GO:0050982	detection of mechanical stimulus	2.57E-07	4	29
GO:0009581	detection of external stimulus	1.23E-05	4	75
GO:0009582	detection of abiotic stimulus	1.17E-05	4	74
GO:0042472	inner ear morphogenesis	3.55E-05	4	98
GO:0042471	ear morphogenesis	7.34E-05	4	118
GO:0009612	response to mechanical stimulus	1.90E-04	4	151
GO:0050910 GO:0009592 GO:0055128	detection of mechanical stimulus involved in sensory perception of sound	2.84E-06	3	15
GO:0050974	detection of mechanical stimulus involved in sensory perception	1.09E-05	3	23
GO:0032421	stereocilium bundle	1.80E-05	3	27
GO:0015297 GO:0015300	antiporter activity	1.39E-04	3	53
GO:0032426	stereocilium bundle tip	9.76E-05	2	8
GO:0005452	inorganic anion exchanger activity	2.29E-04	2	12
GO:0060117	auditory receptor cell development	3.15E-04	2	14

(4)OHC 破壊マウスで発現量が激減する遺伝子の KO マウスの樹立と表現型解析

OHC 破壊マウス蝸牛で著しい発現減少を示した *Ocm* および *Ppp1r17* の KO マウスを CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を行って樹立し、それぞれ表現型解析を行った。

#### *Ocm*-KO マウス

*Ocm*-KO マウス蝸牛において、ラセン神経節・ラセン靱帯および血管条には組織学的異常は認められなかったが、コルチ器の外トンネルが著しく狭小化していた。免疫組織学的解析の結果、*Ocm*-KO マウスの内耳コルチ器において OHC は正常マウスと同様に 3 列に整列し、その形態に異常は認められず、OHC の機能に重要な伸縮運動に寄与する SLC26A5 (prestin) の発現も正常であった。オープンフィールドテストでは、*Ocm*-KO マウスの平衡機能に関連した調査項目はすべて正常であった。3 ヶ月齢で DPOAE を測定した結果、*Ocm*-KO マウスでは DPOAE が全く認められず、伸縮運動能が

消失していることが判明した。ABR 法による聴力を経時的に測定した結果、*Ocm*-KO マウスは、生後 1 ヶ月で 16 kHz 以上の周波数の音刺激に対して中度の聴力障害が認められ、2 ヶ月齢では 4 ~ 32 kHz で中度 ~ 高度の難聴、4 ヶ月齢では重度難聴となった。*Ocm*<sup>+/+</sup> マウスは、3 ヶ月齢まで 4 ~ 16 kHz の音刺激に対する聴力は正常であるが、32 kHz の聴力閾値は野生型マウスと *Ocm*-KO マウスの中間値を示した。すなわち、*Ocm* の欠失によって高周波から加齢性に聴覚障害が引き起こされることが明らかとなった。走査型電子顕微鏡 (SEM) により OHC 上の感覚毛の解析を行った結果、*Ocm*-KO マウスでは感覚毛の脱落や短毛化等著しい形態異常が認められた (図 4)。

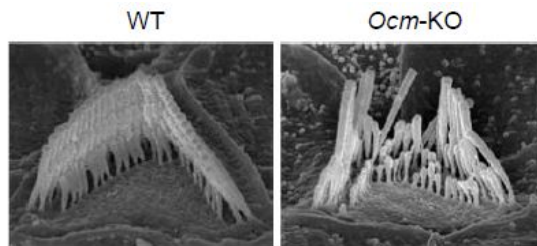


図4 OHC上の感覚毛のSEM像

さらに、経時的に OHC および IHC の細胞数を計測した結果、加齢に伴って OHC 数が減少することが明らかとなった (図 5)。以上の結果から、*Ocm* は OHC の形成や維持に重要な役割をもつことが強く示唆された。

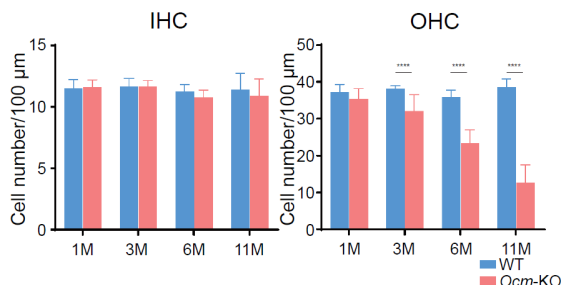


図5 *Ocm*-KOマウスでは加齢に伴いOHC数が減少する

#### *Ppp1r17*-KO マウス

特異抗体を用いた免疫組織染色の結果、PPP1R17 タンパク質は生後 8 日では IHC においても OHC と同様の強度でクチクラプレー

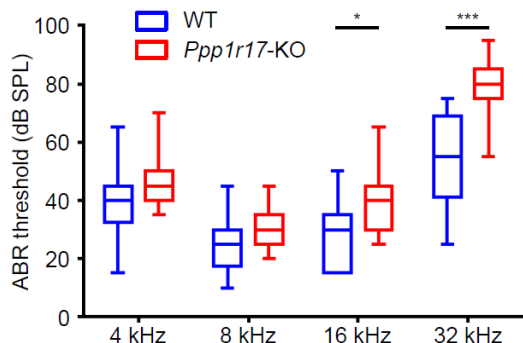


図6 3ヵ月齢のWTおよび*Ppp1r17*-KOマウスの聴力閾値

トに発現が認められるが、加齢とともに OHC における発現が増強することが明らかになった。ABR 法により聴力閾値を測定した結果、*Ppp1r17*-KO マウスは 3 ヶ月齢で、4 ~ 8 kHz の音刺激では聴力差は認められないが、16 ~ 32 kHz の高周波領域で有意に聴力が低下していた (図 6)。

#### (5)総括

OHC-TRECK マウスはただ 1 度 DT を投与することでほぼ全ての OHC を除去することができる、極めて強力なツールである。本研究で行った OHC 破壊マウスと非破壊マウスの内耳蝸牛の遺伝子発現の網羅的比較により、OHC で重要な役割を担う遺伝子を抽出することができた。OHC 破壊マウスで発現減少する遺伝子群の GO 解析から、これらの遺伝子の多くは OHC が機械刺激を電気刺激への変換に重要な膜輸送あるいは OHC の形成や維持に関与していると推定される。

特に発現減少の顕著であった *Ocm* および *Ppp1r17* については KO マウスを樹立し、表現型解析を行った。両 KO マウスともに聴力の低下が認められ、聴覚機能に関わっていることが示唆された。特に *Ocm*-KO マウスは、感覚毛の脱落や短毛化、OHC 数の減少等が認められることから、OHC の維持に極めて重要な機能をもつことが強く示唆された。

本研究で見出した OHC に発現する遺伝子の機能を明らかにすることで OHC における分子メカニズムが解明されることが期待される。

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 1 件)

Seki Y, Miyasaka Y, Suzuki S, Wada K, Yasuda SP, Matsuoka K, Ohshiba Y, Endo K, Ishii R, Shitara H, Kitajiri, SI, Nakagata N, Takebayashi H, Kikkawa Y. A novel splice site mutation of myosin VI in mice leads to stereociliary fusion caused by disruption of actin networks in the apical region of inner ear hair cells. PLoS One, 12(8):e0183477, 2017, 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0183477

##### [学会発表](計 7 件)

松岡 邦枝、安田 俊平、和田 健太、宮坂 勇輝、設楽 浩志、多屋 長治、吉川 欣亮、誘導型破壊マウスを用いた内耳外有毛細胞における機能遺伝子の同定、第 65 回日本実験動物学会総会、2018  
松岡 邦枝、宮坂 勇輝、和田 健太、安田 俊平、設楽 浩志、多屋 長治、吉川 欣亮、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質 Oncomodulin は内耳外有毛細胞の維持に機能する、第 64 回日本実験動物学会総会、2017  
鈴木 沙理、宮坂 勇輝、関 優太、安田 俊平、松岡 邦枝、設楽 浩志、吉川 欣亮、

カドヘリン 23 の c.753 遺伝子型が異なる C57BL6/J マウス間の加齢に伴う聴力表現型の比較、第 64 回日本実験動物学会総会、2017

吉川 欣亮、安田 俊平、設楽 浩志、松岡 邦枝、遺伝子改変マウスを用いて聴覚細胞で機能する遺伝子を探る、第 64 回日本実験動物学会総会、2017

松岡 邦枝、宮坂 勇輝、和田 健太、安田 俊平、設楽 浩志、山口 碧、多屋 長治、吉川 欣亮、外有毛細胞特異的遺伝子 Oncomodulin ノックアウトマウスにおける聴覚障害、第 63 回日本実験動物学会総会、2016

松岡 邦枝、安田 俊平、宮坂 勇輝、和田 健太、設楽 浩志、山口 碧、多屋 長治、吉川 欣亮、内耳外有毛細胞 選択的破壊マウスを用いた特異遺伝子の探索、第 62 回日本実験動物学会総会、2015

宮坂 勇輝、安田 俊平、関 優太、松岡 邦枝、日比野 浩、木南 凌、吉川 欣亮、マウス成熟内耳における *Lrrc30* の高発現と加齢性難聴抑制効果の関連を探る！、第 62 回日本実験動物学会総会、2015

〔その他〕

ホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/mammal/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松岡 邦枝 (MATSUOKA, Kunie)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：40291158

### (2) 連携研究者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20280787

設楽 浩志 (SHITARA, Hiroshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・主席基盤技術研究職員

研究者番号：90321885

和田 健太 (WADA, Kenta)

東京農業大学・生物産業学部・准教授

研究者番号：20508113

### (3) 研究協力者

宮坂 勇輝 (MIYASAKA, Yuki)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30778098