

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11181

研究課題名(和文)急性感音難聴の分子病態と治療の動態的解析-次世代シーケンズでの統合遺伝子解析-

研究課題名(英文)Dynamic changes of the transcriptome in the cochlea with acute sensorineural hearing loss

研究代表者

前田 幸英 (Maeda, Yukihide)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：00423327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：当研究では、急性音響障害を呈するマウスの蝸牛組織で、次世代シーケンサー(RNA-seq)、DNAマイクロアレイ、リアルタイムRT-PCRによる遺伝子発現解析を行い、難聴発症12時間の時点では、炎症・免疫機能に関係する遺伝子群が変動すると明らかにした。発現変動遺伝子には免疫に関連するサイトカインやそのレセプターが多く含まれ、Ccl12、Ccl2、Ccl4、Ccl7、Cxcl1、Cxcl10、Ptgs2(発現増加遺伝子)やCcr7、Cxcr2、Kng1、Ltb、Tnfsf14(減少遺伝子)といったものを同定した。また難聴発症時にステロイドを投与すると炎症・免疫関連遺伝子群が変動すると確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性感音難聴は、耳鼻咽喉科の日常臨床で比較的頻繁にみられ、かつ難治性の病態である。その治療では発症早期にステロイドが用いられることが多いが、その病態や作用機序の多くは不明である。当研究では、強大音響に暴露することにより難聴を発症したマウスの内耳で、全ゲノムを対象とした遺伝子発現解析を行った。その結果、難聴発症早期の内耳では炎症・免疫機能に関係する遺伝子群が多く変動することがわかった。当研究の成果は急性感音難聴の適切な治療法を開発する上で役立つ。

研究成果の概要(英文)：In this study gene expressions were comprehensively analyzed in mice cochleae following intense noise exposure by means of next generation sequencing (RNA-seq), DNA microarray, and realtime RT-PCR. The intense noise exposure caused sensorineural hearing loss in mice. It was clarified that a number of inflammation- and immunity- related genes was differentially expressed in the cochlea at 12h following acoustic trauma as compared to the control cochlea without acoustic trauma. The differentially expressed genes in the noise-exposed cochlea included dozens of immunity-related cytokines and their receptors, such as Ccl12, Ccl2, Ccl4, Ccl7, Cxcl1, Cxcl10, Ptgs2 (upregulated genes) and Ccr7, Cxcr2, Kng1, Ltb, Tnfsf14 (downregulated genes). Intraperitoneal dexamethasone was administered immediately after the noise exposure and further modulated expressions of the inflammation- ad immunity-related genes in the cochlea at 12 hours following acoustic trauma, but not at 24 hours and 48 hours.

研究分野：医歯薬学

キーワード：蝸牛 急性音響性障害 次世代シーケンサー RNA-seq DNAマイクロアレイ リアルタイムRT-PCR  
免疫機能 炎症機能

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1) 急性感音難聴の病態・治療メカニズム

急性感音難聴は、耳鼻咽喉科の日常臨床で比較的頻繁にみられる病態である。その治療では、発症早期のステロイド投与などによって、内耳障害の不可逆化を防ぐ治療が行われる。しかしながら、その病態・治療の分子メカニズムの多くは不明である。また、これらの分子メカニズムは難聴発症時にダイナミックに変化していると考えられるが、その全体像を検討した報告はない。

#### 2) 近年の遺伝子発現解析法と当研究

近年、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析 (RNA-seq) によるヒト・マウスの全ゲノムを対象とした遺伝子発現解析が可能となった。また、DNA マイクロアレイでも、全ゲノムを対象とした遺伝子発現解析が可能である。これらの二つの遺伝子発現解析法を組み合わせることにより、取得可能な遺伝子発現データ量が飛躍的に向上する。当研究では RNA-seq と DNA マイクロアレイを併用して、急性感音難聴発症と治療の過程における蝸牛での分子病態を動的に検討する。またリアルタイム RT-PCR は各遺伝子ごとの解析であるが、もっとも定量性に優れた遺伝子発現データが得られる。そこで当研究では、RNA-seq と DNA マイクロアレイにより、まず解析対象とする遺伝子群を絞りこんだ後に、リアルタイム RT-PCR による検討を行った。

### 2. 研究の目的

急性音響性障害により急性感音難聴を発症し、ステロイドを全身投与されたマウスの蝸牛で、どのような機能に関わる遺伝子群が変動しているか、発症後の時間経過を追って明らかにする。急性感音難聴の内耳病態と治療における分子メカニズムを、網羅的かつ動的に解明する。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウスでの急性感音難聴 (急性音響性障害) の惹起と、ステロイド投与

6週齢雌 C57BL/6 マウスを 120dB SPL のオクターブバンドノイズ (8.0-16.0kHz) に 2 時間暴露して難聴を惹起した。騒音暴露後の聴力の変化を、8-9 匹のマウスについて、クリック音刺激による聴性脳幹反応検査で検討した。また、騒音暴露直後にデキサメタゾン (10mg/kg) または生理食塩水を腹腔内投与した。

次の操作をおこなったマウスを各群 6 匹作成し、蝸牛組織を剖出した: 騒音暴露後 12 時間のマウス (Noise 群、薬剤投与なし)、騒音暴露も薬剤投与もないコントロール (Baseline 群)、騒音暴露とデキサメタゾン投与後 12 時間 (Dex12h 群)、騒音暴露と生理食塩水投与後 12 時間 (Control12h 群)、騒音暴露とデキサメタゾン投与後 24 時間 (Dex24h 群)、騒音暴露と生理食塩水投与後 24 時間 (Control24h 群)、騒音暴露とデキサメタゾン投与後 48 時間 (Dex48h 群)、騒音暴露と生理食塩水投与後 48 時間 (Control48h 群)。

#### 2) 蝸牛組織からの RNA 抽出

前述の各群のマウス蝸牛組織から miRNeasy カラム (Qiagen 社) 用いて、Total RNA を抽出した。RNA の質と量は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) と Nanodrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて評価した。RNA の分解度を表す RIN 値 (RNA integrity number) が 7 以上の Total RNA が、蝸牛組織一つあたり 1.5-2.5 $\mu$ g 程度精製できた。

#### 3) 次世代シーケンサー (RNA-seq) 解析

Total RNA から oligo dT magnetic beads を用いて poly(A) RNA を収集し、SureSelect Strand-Specific RNA library preparation kit (Agilent Technologies) を用いてシーケンシングライブラリーを合成した。イルミナ社 HiSeq シーケンサーにより、50bp シングルエンドにてシーケンシングをおこなった。平均 2700 万リードのデータが得られた。各転写産物のリード数を TMM 法で正規化して、発現量を定量した。

#### 4) DNA マイクロアレイ

Total RNA から oligo dT プライマーをもちいて cDNA ライブラリーを合成し、Low Input Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies) をもちいて Cy3-RNA プローブを合成した。プローブを DNA マイクロアレイ (SurePrint G3 Mouse Microarray ver 2, Agilent Technologies) とハイブリダイズさせた。各転写産物の蛍光シグナル強度を正規化して、発現量を定量化した。

#### 5) 遺伝子機能のデータベース解析

RNA-seq と DNA マイクロアレイのそれぞれで、Noise 群と Control 群、Dex12h 群と Control12h 群、Dex24h 群と Control24h 群、Dex48h 群と Control48h 群の間で発現量が 2 倍以上または 1/2 以下になっている遺伝子のリストを作成した。両者の解析法で共通して変動していると判断された遺伝子群のリストを作成し、これらの機能を David Bioinformatics Resources, (<https://david.ncifcrf.gov/>) でデータベース解析した。

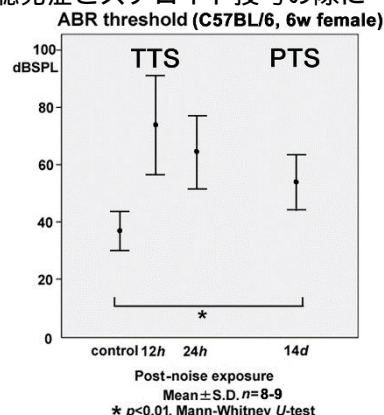
## 6) リアルタイムRT-PCR

RNA-seqとDNAマイクロアレイで、発現量変動が検出された遺伝子群について、サイバーグリーン法をもちいたリアルタイムRT-PCRでの検討をおこなった。炎症・免疫機能に関わる84遺伝子の発現量をmouse inflammation and autoimmunity RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR array (Qiagen)で検討したほか、免疫関連遺伝子である*Ccl12*と*Glycam1*の発現量が、難聴発症とステロイド投与の際にどう変化するか検討した。

## 4. 研究成果

### 1) C57BL/6 マウスでの急性音響性障害の惹起

われわれの実験系では騒音暴露前のマウスの聴力は36.6±6.1 dB SPL (平均値±標準偏差)であった。12時間後には71.1±17.6 dB SPL、24時間後には62.8±12.8 dB SPL、14日後には53.1±9.6 dB SPLとなっており、騒音暴露によって一時的(騒音暴露24時間以内)および永続的(騒音暴露14日後)な難聴が引き起こされていることが確認された(右図: Maeda, et al. Otol Neurotol 2018より引用)。



### 2) RNA-seq と DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析

Noise 群と Baseline 群の RNA サンプルから RNA-seq では 15,958 種類の遺伝子の発現が検出された。そのうち 1192 種類の遺伝子発現は Noise 群で Baseline 群に比べて 2 倍以上(403 遺伝子)あるいは 2/1 以下(789 遺伝子)へ発現変動していた。DNA マイクロアレイでは 16,375 種類の遺伝子の発現を検出した。そのうち 1883 種類の遺伝子発現は Noise 群で Baseline 群に比べて 2 倍以上(861 遺伝子)あるいは 2/1 以下(1022 遺伝子)へ発現変動していた。最終的に、RNA-seq と DNA マイクロアレイの両方で発現量が変動すると判断された遺伝子が 330 種類(発現増加 51 遺伝子、発現減少 279 遺伝子)同定され、これらを発現変動遺伝子とした。

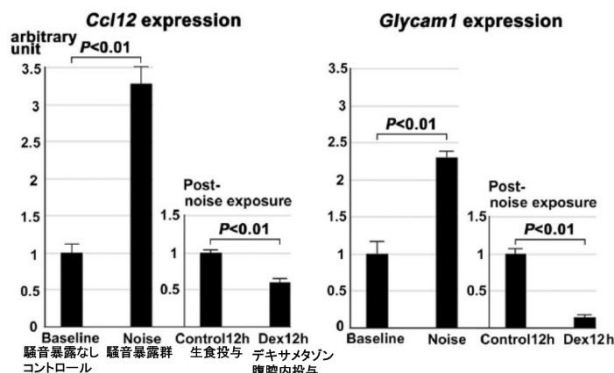
同様に、Dex12h 群と Control12h 群、Dex24h 群と Control24h 群、Dex48h 群と Control48h 群の比較で、デキサメタゾン投与による発現変動遺伝子がそれぞれ 490 種類(発現増加 195 遺伝子、発現減少 295 遺伝子)、262 種類(発現増加 132 遺伝子、発現減少 130 遺伝子)、410 種類(発現増加 37 遺伝子、発現減少 373 遺伝子)同定された。

これらの発現変動遺伝子群が、どのような機能的遺伝子経路(遺伝子パスウェイ)に属するか、データベース解析したところ、Noise 群では Baseline 群にくらべて、'chemokine signaling activity' 'cytokine-cytokine receptor interaction' 'cell adhesion molecules (CAMs) in the immune system' といった、炎症・免疫機能に関係するパスウェイの変動をみとめた。Dex12h 群では Control12h 群にくらべて 'cytokine-cytokine receptor interaction' 'cell adhesion molecules (CAMs) in the immune system' といったパスウェイが変動しており、ステロイド投与による炎症・免疫機能の変動を反映するものと考えられた。Dex24h と Control24h の比較では、これらの免疫・炎症機能の変動は検出されず、Dex48h と Control48h の比較では、'neuroactive ligand-receptor interaction' パスウェイの変動をみとめ、ステロイド投与の効果と、神経情報伝達機能のかかわりが示唆された。

### 3) リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析

上記の結果を踏まえ、Noise 群と Baseline 群の間で、ケモカイン(22 遺伝子)、インターロイキン(12 遺伝子)、その他の免疫機能にかかわるサイトカイン(8 遺伝子)とサイトカイン・ケモカインレセプター(14 遺伝子)などの 84 の炎症・免疫関連遺伝子の発現を比較した。これらのうち 31%(26 遺伝子)は 2 倍以上または 1/2 以下への有意な発現変動をしめした( $n=3$ ,  $P < 0.05$ )。変動遺伝子のうち 16 種類はケモカインをコードする遺伝子であった。RNA-seq、DNA マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR の三者で一致する発現変動遺伝子としては、*Ccl12*、*Ccl2*、*Ccl4*、*Ccl7*、*Cxcl1*、*Cxcl10*、*Ptgs2*(発現増加遺伝子)や *Ccr7*、*Cxcr2*、*King1*、*Ltb*、*Tnfsf14*(発現減少遺伝子)が同定された。

免疫関連遺伝子 *Ccl12* と *Glycam1* の発現量は、Noise 群で Baseline 群にくらべ、それぞれ  $3.29 \pm 0.24$  倍(平均値±標準偏差)および  $2.30 \pm 0.09$  倍へ増加していた。一方 Dex12h 群では Control12h 群にくらべて、 $0.60 \pm 0.05$  および  $0.14 \pm 0.02$  倍へ有意に減少した( $n=6$ ,  $p < 0.01$ ) (右図: Maeda, et al. Otol Neurotol 2018 より引用)。



## 考察

当研究ではマウスの全ゲノムを対象に蝸牛での遺伝子発現を検討した。その結果、急性感音難聴（急性音響障害）発症 12 時間の時点では、炎症・免疫機能に関する遺伝子群が多数変動することがわかった。また、ステロイドを投与することにより、発症 12 時間の時点ではこれらの炎症・免疫機能に関する遺伝子群がさらに変動する。発症 24、48 時間の時点ではこれらの変化はみとめられなかった。発症 48 時間の時点での遺伝子発現データにもとづけば、ステロイドの作用はらせん神経節や、感覚細胞での神経情報伝達にもかかわる可能性がある。

## 参考文献

- 1) Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009 4: 44-57.
- 2) Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 37: 1-13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Y, Kariya S, Omichi R, Noda Y, Sugaya A, Fujimoto S, Nishizaki K	4. 巻 39
2. 論文標題 Targeted PCR Array Analysis of Genes in Innate Immunity and Glucocorticoid Signaling Pathways in Mice Cochleae Following Acoustic Trauma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Otolology Neurotology	6. 最初と最後の頁 e593-600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000001874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Y, Omichi R, Sugaya A, Kariya S, Nishizaki K	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Cochlear Transcriptome Following Acoustic Trauma and Dexamethasone Administration Identified by a Combination of RNA-seq and DNA Microarray	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Otol Neurotol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.0000000000001373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田幸英、假谷 伸、大道亮太郎、菅谷明子、西崎和則
2. 発表標題 急性音響性難聴マウス蝸牛におけるケモカイン遺伝子群の発現
3. 学会等名 日本耳科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田幸英、假谷 伸、大道亮太郎、菅谷明子、西崎和則
2. 発表標題 急性音響外傷マウスにおける炎症関連遺伝子の関与
3. 学会等名 日本耳科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田幸英、大道亮太郎、菅谷明子、假谷 伸、西崎和則
2. 発表標題 デキサメタゾン投与後の蝸牛遺伝子発現パターンの経時的・動態的検討
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田幸英、大道亮太郎、菅谷明子、片岡祐子、假谷 伸、西崎和則
2. 発表標題 急性感音難聴モデルマウスへのステロイド投与後の内耳遺伝子発現-RNA seqとDNAマイクロアレイを用いた解析
3. 学会等名 第26回日本耳科学会総会学術講演会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学 研究者総覧  <a href="https://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&amp;l=ja">https://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&amp;l=ja</a></p> <p>Researchmap  <a href="https://researchmap.jp/read0154770/">https://researchmap.jp/read0154770/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	假谷 伸  (Kariya Shin)  (10274226)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授    (15301)	

