

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19611

研究課題名(和文) long non-coding RNAの内耳発生・再生における機能

研究課題名(英文) Function of long non-coding RNA in the development and regeneration of inner ears

研究代表者

山本 典生 (Yamamoto, Norio)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70378644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発現はしているが翻訳されるタンパク質がないlong non-coding RNA (lnc RNA)の内耳蝸牛における発現、機能の検討を行った。lnc RNAのうち、我々はこれまでの研究で内耳機能と関連があると予想されたGomafuとMalat1を研究対象とした。蝸牛内での発現に関しては両者ともに発生期、生後にかけて一定量の発現を認めたが、Gomafuは発生期に多く、生後減少する傾向があり、Malat1は生後聴力が確立するまでは発現量が上昇し、成熟期には減少していた。機能に関しては、Gomafuノックアウトマウスはコントロールマウスと比べて24週で閾値上昇が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで蝸牛における発現や機能が研究されていなかったlnc RNAのうち、Gomafuはその機能が失われると加齢性難聴が加速することが本研究で示された。これまでは、難聴の治療を目指した研究はタンパク質やメッセンジャーRNAが対象であったが、lnc RNAもその対象となることを示した。超高齢社会を迎えた本邦において、加齢に伴う難聴に関わることを予想される新たな研究対象を発見できたことは、加齢性難聴の克服と高齢者の生活の質の改善につながる治療法の開発の可能性が広がったといえる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression and function of long non-coding RNA (lnc RNA) in the cochlea. Among several types of lnc RNA, we picked up two molecules, Gomafu and Malat1, which are considered relevant with cochlear development and regeneration in our preliminary experiments. Regarding the expression level of Gomafu and Malat1, there were stable expression levels throughout the developmental and postnatal stages. The expression of Gomafu was highest at the middle stage of cochlear development and decreased after birth. On the other hand, Malat1 expression increased after birth until postnatal days ten and decreased at postnatal days 21. Regarding the function of Gomafu, we measured the hearing level of Gomafu knockout mice using auditory brainstem response. At six and twelve weeks old, we did not find any difference in the thresholds of examined frequencies. However, at twenty-four weeks old, 20 and 40 kHz thresholds were significantly higher in knockout mice than in heterozygous mice.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：non-coding RNA 内耳 再生

1. 研究開始当初の背景

世界人口の5.3%、3億6千万人が苦しむ難聴 (WHO, 2008) は、本邦では65歳以上人口の約6割に認められ、75歳以上の人口の実に4分の1が日常生活に支障をきたす。このうち、伝音難聴は手術で根治させることができるのに対して、老人性難聴や薬剤性難聴、音響外傷、多くの遺伝性難聴などが含まれる感音難聴は、その主な原因である内耳蝸牛の感覚上皮、有毛細胞が生後の哺乳類では再生能を有さないため、一旦障害されると手術的加療は不可能で有効な薬剤も存在しない。

有毛細胞の再生促進や、有毛細胞のアポトーシス抑制法などが感音難聴治療法の候補であるが、申請者らは、それらをコントロールする可能性がある成長因子の一つ、Insulin-like growth factor 1 (IGF1)を用いて感音難聴の動物モデルへの有効性を示してきた (Lee et al., 2007、Hayashi et al. 2013)。そのメカニズムを探索する中で、IGF1 投与によって蝸牛内で long non-coding RNA (lncRNA)の一つである Malat1 の発現が変化することを見出した。また、申請者らの共同研究者は内耳発生過程で蝸牛有毛細胞にやはり lncRNA の一つである Gomafu が発現することを見出している。non-coding RNA (ncRNA) はゲノムの75%を占め、コードする蛋白質がないにも関わらず DNA 領域から転写されるが、ncRNA はそのサイズにより small RNA と 200 塩基を超える long ncRNA (lncRNA) とに分類されるが、small RNA のうち、22 塩基ほどの microRNA に関しては内耳発生や感音難聴との関連も報告されるようになってい。これまで、遺伝子変異が内耳に与える影響については、遺伝性難聴患者で発見された coding RNA や microRNA 難聴遺伝子の遺伝子改変マウスの形態異常や難聴の有無の解析のみで、200 塩基を超える lncRNA についての解析は行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、lncRNA の哺乳類内耳における発現パターンや発現量、lncRNA のノックアウト (KO) マウスにおける内耳形態や機能の検証を行うことにより、lncRNA の内耳の発生や感音難聴発症への関与を検討することを目的とする。これにより、未だ不明な点も多い内耳発生メカニズムの解明、感音難聴発症メカニズムの解明、これまで哺乳類では困難であった内耳有毛細胞再生を行う手法開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) Gomafu の検討

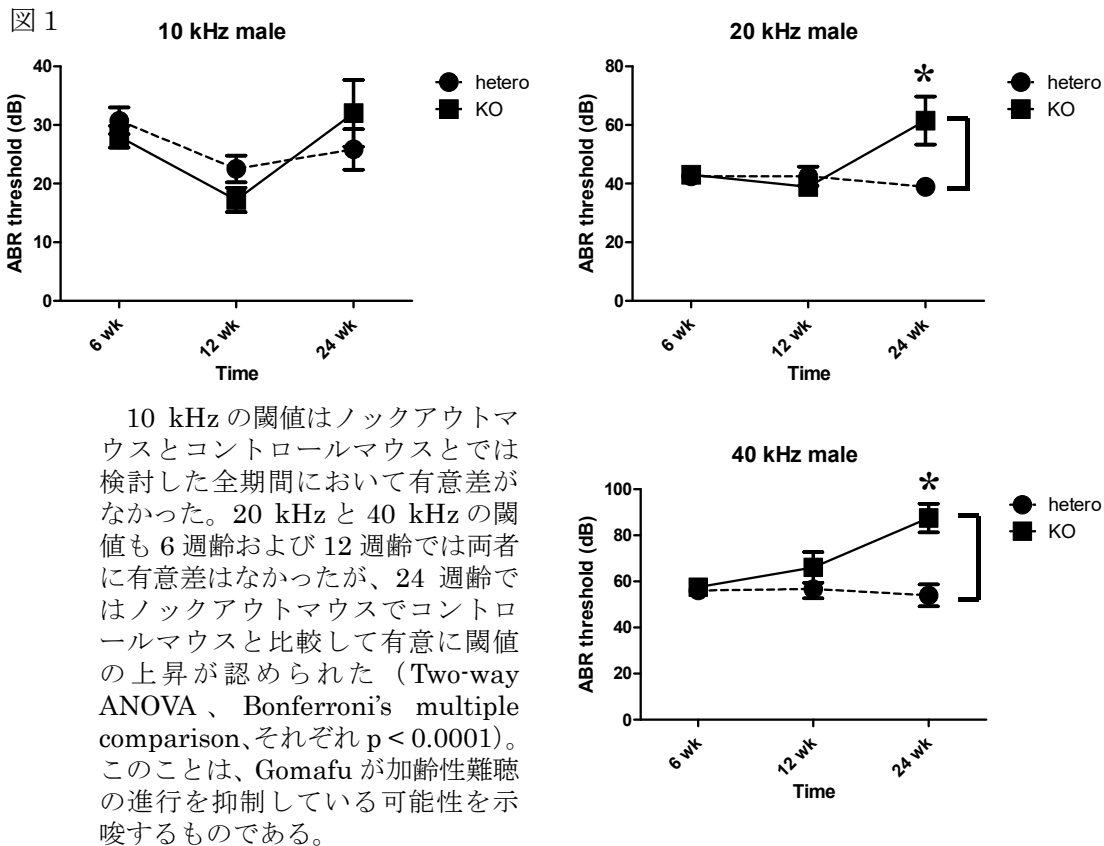
- ① Gomafu ノックアウトマウスの聴力測定
10 kHz、20 kHz、40 kHz のトーンバースト音を用いて聴性脳幹反応の記録を行った。生後6週、12週、24週の時点での各周波数の聴力閾値を求めて、経時的な変化を検討した。使用したマウスの性別はオスで、コントロールはヘテロマウス、各群5-6匹のマウスを用いた。
- ② Gomafu を定量的 RT-PCR で検出するためのプライマーを設計しマウス内耳から調整した cDNA を用いて反応を行った。発生期から生後マウス内耳から調整したサンプルを反応に用いた。

(2) Malat1 の検討

- ① 内耳発生期の Malat1 の発現局在を in situ hybridization を用いて検討した。Malat1 検出用プローブを作成するためのプラスミドを設計した。プラスミドを用いて in situ hybridization 用のプローブを調整した。胎生13.5日、15.5日、17.5日のマウス蝸牛を採取して、凍結切片を作成した後、切片に作成したプローブをハイブリダイズさせて Malat1 の蝸牛における発現部位を観察した。
- ② Malat1 を定量的 RT-PCR で検出するためのプライマーを設計しマウス内耳から調整した cDNA を用いて反応を行った。発生期から生後マウス内耳あるいは生後マウス蝸牛の器官培養にアミノグリコシドあるいはアミノグリコシド+IGF1 を投与したサンプルを反応に用いた。発生期マウスのサンプルの研究は、2種類行った。1つは、内耳全体から調整して経時的な発現量変化を検討した。もう一つは、胎生13日目マウスの蝸牛を単一細胞に分離して採取し、cDNA を調整後に、有毛細胞と支持細胞共通の前駆細胞のマーカーである Sox2 の発現の有無を確認し、Sox2 陽性細胞と Sox2 陰性細胞とに分けて Malat1 の発現量を検討した。
- ③ Malat1 ノックアウトマウスの聴力測定
10 kHz、20 kHz、40 kHz のトーンバースト音を用いて聴性脳幹反応の記録を行う。生後6週、12週、24週の時点での各周波数の聴力閾値を求めて、経時的な変化を検討する。コントロールはヘテロマウスと野生型マウスを用いる。各群3匹のマウスを用いた

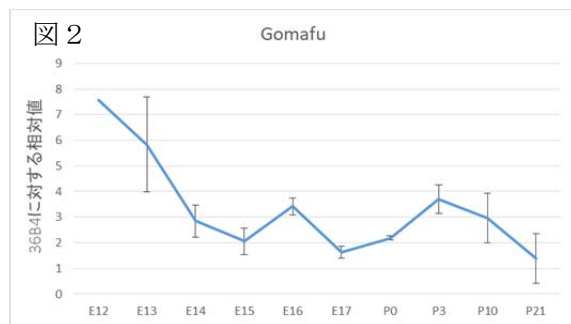
4. 研究成果

(1) Gomafu ノックアウトマウスの聴力 (図1)



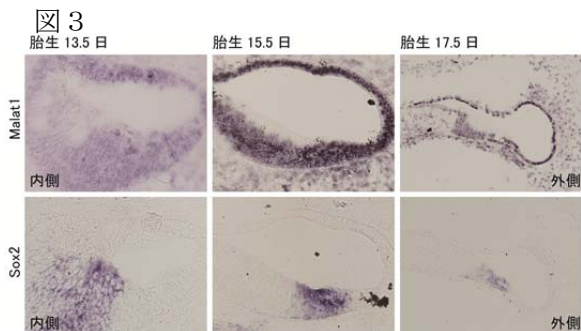
(2) マウス内耳発生過程における Gomafu 発現量の変化 (図2)

Gomafu の内耳における発現量を胎生 12 日目から生後 21 日目まで継時的に検討した。Gomafu は胎生中期 (胎生 12 日目) での発現がピークで、その後胎生後期にかけて発現量は減少して以後生後 21 日目まではほぼ同程度の発現量を維持する。今後はノックアウトマウスで聴力の低下を認める 24 週齢など高齢マウスでの発現量を検討する必要がある。

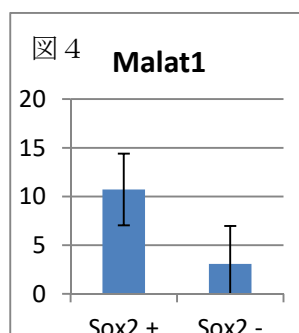


(3) Malat1 の発生期蝸牛における発現部位 (図3)

Malat1 は胎生 13.5 日、15.5 日、17.5 日いずれも蝸牛の上皮全体に発現を認めた。感覚上皮予定領域のマーカーとされる Sox2 の発現よりは広い範囲で発現を認めている。



(4) Sox2 陽性細胞と陰性細胞における



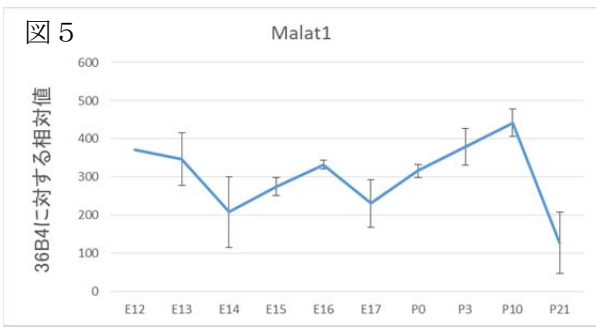
Malat1 の発現量 (図4)

Sox2 陽性細胞では、Sox2

陰性細胞と比べて、Malat1 の発現量が 2 倍以上であった。(3)

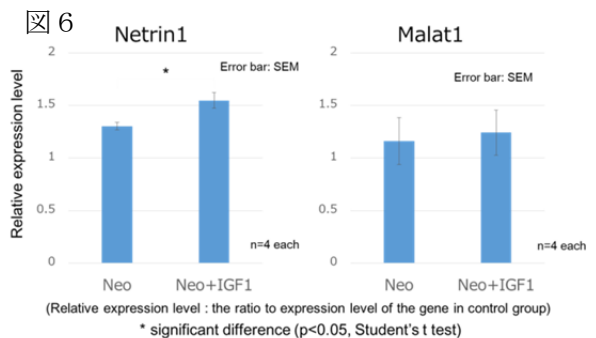
の結果と一見矛盾するように思えるが、本検討は個々の細胞当たりの発現量の比較であり、Sox2 陽性細胞では Malat1 が多く発現していることが予想できる。

(5) マウス内耳発生過程における **Malat1** 発現量の変化 (図 5)
Malat1 の内耳における発現量は胎生期から一定の量が維持され、生後 10 日目まで上昇を続ける。その後、聴力の確立が行われる生後 21 日では発現量が減少することが分かった。

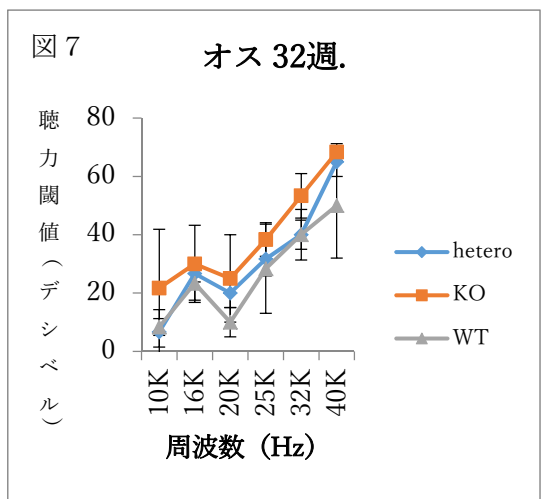


(6) **IGF1** 投与による **Malat1** 発現量の変化 (図 6)

アミノグリコシドのみとアミノグリコシド+**IGF1** の投与とでは、**Netrin1** の発現の上昇は認められたが、**Malat1** の発現に関しては両群間での有意な差は認めなかった。我々がこの研究を開始した端緒の一つとなったマイクロアレイを用いた実験による結果とは異なる結果であった



(7) **Malat1** ノックアウトマウスの聴力 **Malat1** ノックアウトマウスとコントロールであるヘテロマウスとの間に、検討した各周波数において有意な閾値の差を認めなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamamoto N, Ohnishi H, Fukui, M, Yamamoto R, Nakagawa T, Omori K, Ito J
2. 発表標題 Identification of Candidate Genes Expressed in the Part of Sox2 Positive Region in the Developing Cochlea
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 41st Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	中川 隆之 (Nakagawa Talauilo) (50335270)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	
研究分担者	岡野 高之 (Okano Takayuki) (60642931)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------