

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791202

研究課題名 (和文) 内耳における遺伝子発現パターンと聴力像に関する研究

研究課題名 (英文) The relationship between the gene expression profile and the type of hearing impairment.

研究代表者

鈴木 伸嘉 (SUZUKI NOBUYOSHI)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20377641

研究成果の概要 (和文)：

今までに難聴の原因遺伝子が数多く報告されてきた。現在、さらなる新規難聴遺伝子の探索や、それぞれの遺伝子から転写・翻訳されたタンパクが内耳のどの部分に局在するのか精力的な研究がつつけられている。しかしながら、遺伝子変異の表現型である難聴には高音漸傾型や低音障害型など様々なパターンがあり、遺伝子変異によって特徴的な型の難聴が引き起こされるメカニズムは不明である。おそらく遺伝子発現パターンと聴力像に関連性があると考えられる。本研究ではマウスを用いて、内耳の遺伝子発現パターンをレーザーマイクロディセクションと Real-Time PCR 解析および DNA マイクロアレイを用いて内耳における遺伝子発現パターンを研究した。

研究成果の概要 (英文)：

Many hearing impairments are known to be caused by genetic factor. Hereditary hearing loss contributes to the various type of hearing impairments. However, little is known about what lead to such many different phenotypes. And now, it is generally accepted that the importance of the searching another responsible genes for auditory disturbance or the identification with the localization of transcription products. We hypothesized that the variety of phenotypes are caused by not only distribution of products but also the differences in the pattern of the gene expression. We attempted to identify the gene expression analysis in the cochlea by using Real-Time PCR with laser micro dissection system and the DNA microarray analysis with using the model mouse for age-related hearing impairment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：高音障害型難聴、老人性難聴、遺伝子発現パターン、SAM、レーザーマイクロダ

## イセクション

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究室ではこれまで難聴の遺伝子解析を精力的に行い、数多くの報告を行ってきた。(Usami et al., 2002 他)

申請者は内耳に高発現している IX 型コラーゲンをノックアウトしたマウスを用いた解析を行い、IX 型コラーゲンノックアウトマウスが進行性の難聴を呈したことより、IX 型コラーゲン遺伝子変異による難聴は進行性であり (Asamura et al., 2005)、形態学的に内耳の蓋膜が徐々に変化していくことを明らかにした (Suzuki et al., 2005)。

興味深いことに、IX 型コラーゲンノックアウトマウスの形態学的解析より、高音を感受する内耳の基底回転の蓋膜が、低音域を感受する頂回転の蓋膜と比較して、著しい形態変化を起こしていることから、低音を感受する頂回転の蓋膜とはコラーゲンの構成比率 (コラーゲン遺伝子の発現比率) が異なることを予想した。このように、内耳の場所によって異なる遺伝子発現パターンをとることが、異なる音域を担当するため、遺伝子変異により異なったタイプの難聴がもたらされている原因ではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、IX 型コラーゲンノックアウトマウスの解析により明らかとなった、内耳の回転における形態学的な変化が、内耳におけるタンパク質の局在の変化あるいは遺伝子の発現パターンの変化により引き起こされている可能性を考え、内耳における遺伝子発現パターンを詳細に解析し、遺伝子発現パターンが聴力像と関連していることを証明することを目的とした。

特に、内耳の遺伝子発現パターンを検討することによって、低音障害型の感音難聴や高音域が特異的に障害される老人性難聴の原因解明をすることができると期待される。

### 3. 研究の方法

(1) レーザーマイクロダイセクションを用いた、Real-Time PCR による発現解析

内耳 (蝸牛) は 2 回転半の渦巻き状の形をしており、20Hz から 20,000Hz までの周波数 (ヒト) を、それぞれ特定の部位で感受している事が大きな特徴であり、低い周波数帯は頂回転で、高い周波数帯は基底回転の細胞で感受している。

IX 型コラーゲンノックアウトマウスの知見より得られた、「蓋膜の細胞外器質タンパクの構成比率は頂回転と基底回転では異な

り、この比率の違いは難聴のパターンに影響している」という仮説を証明するためにレーザーマイクロダイセクションによる、各回転ごとの細胞の採取と、Real-Time PCR による遺伝子発現解析を併用することで、各回転ごとの遺伝子発現量の比較を行った。

C57BL/6J の内耳から凍結切片を作成し、蓋膜の細胞外器質タンパクを産生している interdental cell をレーザーで切り出す。細胞群は頂回転の細胞と基底回転の細胞とで分けて採取した。切り出した細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作成する。そして頂回転と基底回転の細胞から発現している細胞外器質タンパクの遺伝子の量には差があることを Real-Time PCR を用いて検証した。

(2) 加齢促進マウスを用いた DNA マイクロアレイによる、高音部の進行性感音難聴の遺伝子発現解析。

高音障害型の難聴となる、老人性難聴のモデルマウスである SAMP1 系統 (Senescence Accelerated Mouse Prone) とそのコントロールである SAMR1 系統 (Senescence Accelerated Mouse Resistance) を用いて実験を行った。12 週齢と 20 週齢のマウスの聴力レベルを、ABR (Auditory Brainstem Response) を用いて測定した。次に聴力測定を行ったマウスより内耳から膜迷路のみを摘出し、QIAGEN RNeasy micro kit を用いて RNA を抽出した。膜迷路から抽出した RNA を用いて、Agilent 社のマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現パターンを解析した。遺伝子発現パターンの解析には Gene Ontology 解析と Pathway 解析を用いた。

### 4. 研究成果

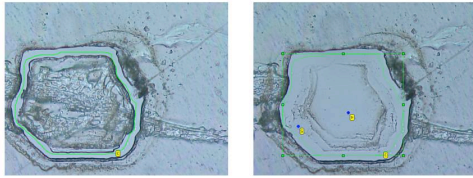
(1) レーザーマイクロダイセクションを用いた、Real-Time PCR 解析。

ごく少数の細胞群から超微量 RNA を抽出するために、高度な技術と工夫を要した。C57BL/6J の内耳を摘出し、未固定のまま凍結切片を作成した。5-7 $\mu$ m の切片を作成後、未染色のまま interdental cell を同定し PALM 社 Laser Micro Dissection system を用いて細胞群を切り出し採取した

RNA の解析を行う必要があるため、パラホルムアルデヒドによる固定を行うことができないため、切片作成時の形態の変化を最低限に抑えるために、内耳の採取および包埋の際のコンパウンドの種類を検討を行うこ

とで、レーザーによる細胞の切り出しが可能となった。

図1 レーザーマイクロダイセクション  
左：レーザーにて切り出し直後。右：細胞群の採取後の顕微鏡画像である。



レーザーマイクロダイセクションにより採取された細胞群から RNA を抽出し蓋膜の構成成分の一つである col9a1 の Real-Time PCR を行った。発現量の比較に関しては現在解析中である。

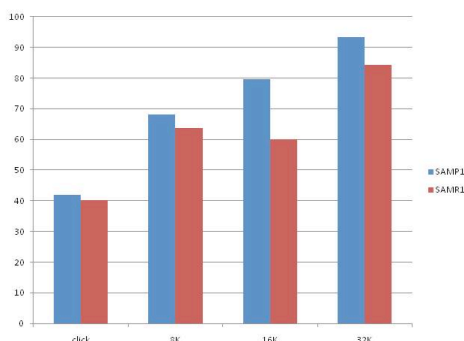
(2) 加齢促進マウスを用いた高音部の進行性感音難聴の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析。

加齢促進マウス SAMP1 とそのコントロールである SAMR1 の 12 週齢と 20 週齢のマウスの聴力レベルを、ABR (Auditory Brainstem Response) を用いて測定した。次に聴力測定を行ったマウスより内耳から膜迷路のみを摘出し、QIAGEN RNeasy micro kit を用いて RNA を抽出した。

得られた RNA を Agilent 社のマイクロアレイにて発現解析した。2 倍もしくは 0.5 倍の変動があった遺伝子を有意なものとしたところ、20 週齢の SAMP1 マウスは 12 週齢に比べて 863 遺伝子が発現上昇しており、806 遺伝子が発現減少していた。また、ABR では、20 週齢の SAMP1 で高音部の難聴が始まっている事を確認することができた。

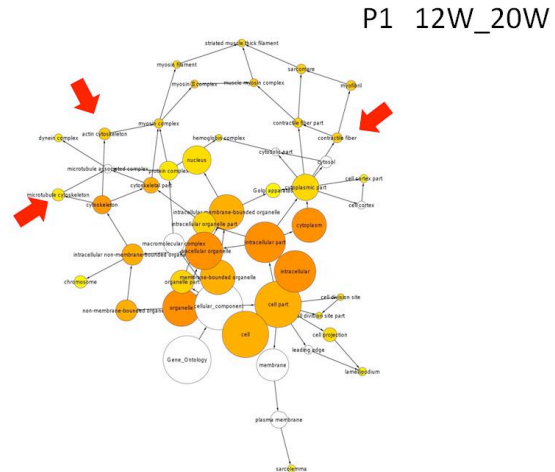
図2 SAM マウスの聴力  
20 週齢の SAMP1 マウスでは 16K、32K の高音域の聴力閾値の上昇が認められる。

### SAM 20W ABR 結果



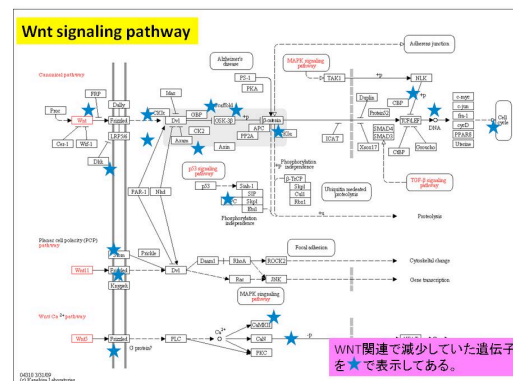
GoTerm や小胞体ストレスに関連するような GO:0005783 endoplasmic reticulum が有意なものであった。(Suzuki et al., 投稿準備中)。

図3 12 週齢と 20 週齢の SAMP1 マウスの遺伝子発現パターンの比較に基づく Gene Ontology 解析の結果



また、得られたマイクロアレイのデータを用いた Pathway 解析 (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) では、mmu04310:Wnt signaling pathway (KEGG ホームページを一部改変) や細胞外マトリックスに関連する mmu04512:ECM-receptor interaction が有意なものであった (Suzuki et al., 投稿準備中)。

図4 12 週齢と 20 週齢の SAMP1 マウスの遺伝子発現パターンの比較に基づく Gene Pathway 解析の結果



5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計2件)

- ① 鈴木伸嘉、橋本繁成、森政之、樋口京一、  
宇佐美真一 SAMP1 の内耳における遺伝  
子発現について。老化促進モデルマウス  
(SAM) 研究協議会第 23 回研究発表会  
2008 年 7 月 17・18 日 京都
- ② 鈴木伸嘉、橋本繁成、森政之、樋口京一、  
宇佐美真一 SAMP1 の内耳における遺伝  
子発現について。第 31 回日本基礎老化学  
会 2008 年 6 月 12・13 日 長野

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 伸嘉 (SUZUKI NOBUYOSHI)  
信州大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：20377641

### (4) 研究協力者

宇佐美 真一 (USAMI SHINICHI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号：10184996

橋本 繁成 (HASHIMOTO SHIGENARI)  
信州大学・医学部附属病院  
・助教  
研究者番号：90359729

西尾 信哉 (NISHIO SHINYA)  
信州大学・医学部附属病院・研究員  
研究者番号：70467166