

機関番号 : 13601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20791187

研究課題名 (和文) 内耳におけるマイクロ RNA の網羅的研究

研究課題名 (英文) Expression analysis of micro-RNAs in inner ear.

研究代表者

西尾 信哉 (NISHIO SHINYA)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号 : 70467166

研究成果の概要 (和文) : 近年、神経分化やガン、線虫の脱皮や酵母の減数分裂、動物、植物の発生時に、miRNA と呼ばれる内在性の翻訳されない短い RNA 分子が大きな機能を持つことが明らかとなり、その機能の解明が世界的に大きな注目を集めている。本研究では、12 週齢と 20 週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1) と、その対象系統 (SAMR-1) を用いて、マウスの蝸牛内の micro RNA の発現を網羅的に解析した。その結果、マウス内耳では有毛細胞とらせん神経節にだけ発現する micro RNA として知られている miR-183 ファミリーの発現が老人性難聴を呈するマウスでは半分以下に減少している事が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we examined the expressions of microRNAs in the inner ear of the senescence-accelerated model (SAM-P1) mouse and its control strain using microRNA microarray to understand the microRNAs role in the maintenance of hearing function and the mechanism of age-related hearing impairment. We identified microRNAs highly expressed in mouse cochleae. Interestingly, miR-96, miR-182 and miR-183, which are proposed as important factors for inner ear development and function, were decreased by about half in 20-week-old SAM-P1 mice, revealing an age-related hearing loss phenotype.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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 : 遺伝子・難聴・内耳・聴覚・マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

近年、神経分化やガン、線虫の脱皮や酵母の減数分裂、動物、植物の発生時に、miRNA と呼ばれる内在性の翻訳されない短い RNA 分子が大きな機能を持つことが明らかとな

り、その機能の解明が世界的に大きな注目を集めている。

non-coding RNA は DNA、mRNA、タンパクの 3 つの段階で機能することが示されており、遺伝子発現を微調整する役割を担っているのではないかと考えられ、ポストゲノ

ムの主役として脚光を浴びていた。これら non-coding RNA の中でも特に注目を集めているのが、マイクロ RNA(miRNA)と呼ばれる内在性の短い RNA であった。

miRNA は細胞外の刺激などにより、前駆体から合成され、他の遺伝子の発現量の調整を行うことが明らかになっている。また、miRNA が遺伝子量の調整を行うメカニズムとしては、2本鎖 RNA 上にサイレンシング複合体が形成され、ターゲットとなる mRNA の分解を促進することで遺伝子の発現量調節が行われている。この短い RNA を利用して遺伝子発現をコントロールする siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法は、多くの生物において遺伝子の機能解析手法の一つとして広く利用されており、老人性黄斑症やエイズ、ガンなどの臨床応用が期待されている。

また、当研究室において先天性難聴のスクリーニングを行っている際に、ATP1A2 遺伝子においてそのイントロン領域に原因と推定される遺伝子変異が見つかったが、スプライシングにも関与しない領域であったため、どのようなメカニズムで難聴を引き起こすのかまったく不明であった。

さらにまた、2006年に Guy Van Camp のグループにより騒音性難聴患者および老人性難聴患者と内耳で高発現している遺伝子の SNPs との相関解析が行われ、騒音性難聴および老人性難聴の原因遺伝子の候補として *KCNE1*, *KCNQ4* 遺伝子が見出されたが、騒音性難聴では3箇所中1箇所、老人性難聴では6箇所中5箇所の SNPs はイントロン領域に存在していた。また、Morton のグループは、内耳で高発現する *COL9A1* 遺伝子に3' UTR の短いアイソフォームがあることを見出した。また、長いアイソフォームと短いアイソフォームで異なる領域内にマイクロ RNA (miR-9) と高い相補性を持つ配列があることを示した

このようにイントロン領域に存在する変異により難聴が発症するメカニズムとして、micro RNA を介した遺伝子発現調節が考えられるが、内耳におけるマイクロ RNA の研究に関しては、明らかと成っておらず、少数のグループで研究がスタートしたばかりという状況であった。

2. 研究の目的

内耳における micro RNA の役割に関しては、2009年に優性遺伝形式をとる遺伝性難聴(DFNA50)の原因遺伝子変異が micro RNA (miR-96) に存在することが明らかとなり、聴覚の機能維持に重要な役割を果たす事が明らかとなった (Mencia et al., 2009)。

また、miR-96 および miR-182, miR-183 に関しては、その発現が有毛細胞とラセン神

経節に局在していること、また哺乳類だけでなく、魚類や両生類の感覚細胞に特異的に発現していることより、感覚細胞の分化および機能維持に重要であることが示唆されている (Weston et al., 2006; Pierce et al., 2008; Sacheli et al., 2009)。

このように内耳におけるマイクロ RNA の機能に関しては徐々に明らかと成ってきたが、未だ非常に限定的な知見しかえられていない。また、聴覚に関連する遺伝子の多くは局所的に発現しており、発現が厳密に調整されていることが予測されるが、その詳細な遺伝子発現調節のメカニズムはいまだ明らかになっていないものが多く、遺伝子発現制御に micro RNA が関わっている可能性が示唆された。そこで、本研究では、内耳における micro RNA の網羅的解析を行う事により、内耳における micro RNA の果たす役割を明確にすることを目的とした。

(1)内耳における micro RNA の発現の網羅的解析

本研究では、内耳における miRNA の同定を行い、その発現を網羅的に解析することにより、マウス内耳の miRNA 発現プロファイルを完成させることを目的のひとつとした。

網羅的に micro RNA の発現を調べる事により、発現量の多い micro RNA から順に機能解析を行うことが可能となる。

(2) 加齢に伴う miRNA 発現変化の解明

背景にも記載したように、老人性難聴の原因遺伝子変異がイントロン領域に見出される事などからも、老人性難聴に micro RNA を介した遺伝子発現調節が関与している可能性が示唆されたため、幼若マウスと老齢マウスの比較(加齢促進モデルマウスを使用)により内耳の機能(特に老人性難聴)と miRNA を結びつける基盤となる情報を整備する事を目的とした。また、同定した miRNA のいくつかにおいては、そのターゲットとなる遺伝子をコンピュータで推定し、実際に発現を阻害するかどうかを in vitro で確認することも併せて目的とした。

3. 研究の方法

12週齢と20週齢の加齢促進モデルマウス(SAM-P1)と、その対象系統(SAMR-1)を用いて、マウスの蝸牛内のmicro RNAの発現解析を目的に下記の研究を実施した。

(1)聴力の測定

聴力の測定としては、12週齢と20週齢のSAM-P1マウスおよび対象系統のSAM-R1マウス各4匹を深麻酔下に聴性脳幹反応(

ABR) を計測した。ABRの測定はクリック音出の測定とトーンバーストでの測定を行い32kHz~4kHzまでの聴力を測定した。

(2) micro RNA の網羅的解析

micro RNAの網羅的発現解析には、12週齢と20週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1) と、その対象系統 (SAM-R1) を各3匹用いて、深麻酔下にて内耳を摘出し、速やかに RNA later solution (Ambion) に浸す。

RNA later solutionに浸したまま、顕微鏡下で蝸牛膜迷路のみを取り出し、miRNeasy mini Kit (QIAGEN) を使用して micro RNA を含む total RNA を抽出した。抽出した RNA の品質は Bioanalyzer 2100 (Agilent) を使用してクオリティチェックおよび定量を行った後、3 耳分の RNA をプールして、Expression array (ToYoBo) に載せ発現解析を行った。

また、発現量に変化の認められた micro RNA のいくつかに関しては、Applied biosystems 社の TaqMan Micro RNA assays および TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit を利用して定量的 RT-PCR 法によりその発現量の変化を確認した。

4. 研究成果

12週齢および20週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1) と、その対象系統 (SAM-R1) を用いて、マウスの蝸牛内の micro RNA の発現解析を行った。

聴性脳幹反応 (ABR) による聴力測定の結果では、4 群のうち20週齢の SAM-P1 マウスでは老人性難聴の特徴である高音部の聴力低下を認めたが、12週齢の SAM-P1 マウス、12週齢・20週齢の対象系統マウス (SAM-R1) では老人性難聴の特徴である高音域の閾値上昇が認められなかった。

また、DNA マイクロアレイを用いた micro RNA の発現量の比較を行った結果、20週齢の SAM-P1 の蝸牛においていくつかの micro RNA の発現量に変化するのに対して、12週齢の SAM-P1 マウス、12週齢・20週齢の対象系統マウス (SAM-R1) では micro RNA の発現量がほとんど変化していないことを見出した (図1)

また、発現量の変化した micro RNA の中には、近年、魚類の側線の感覚細胞、眼に発現しており、マウス内耳では有毛細胞とらせん神経節にだけ発現する micro RNA として知られている miR-183 ファミリー (

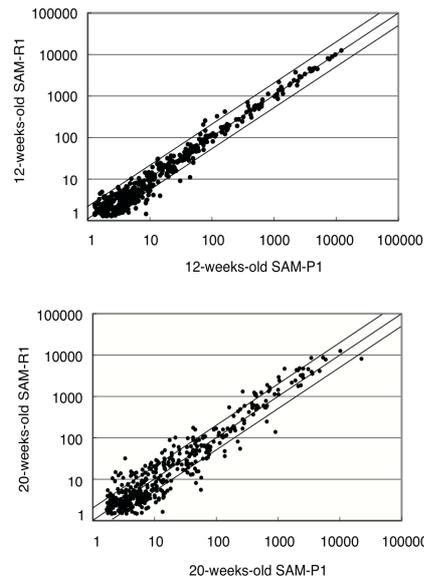


図1 加齢促進モデルマウス内耳における miRNA の発現変化

加齢性難聴を示す 20 週齢の SAM-P1 系統ではコントロール系統と比較してマイクロ RNA の発現が大きく変化している。特に内耳の機能に重要であることが示唆されている miR-182 の発現は約半分に減少していた。(Nishio et al., submitted)

miR-96、miR-182、miR-183) が含まれていたため、リアルタイムPCRによる確認を行った。その結果、老人性難聴の表現型を示していた20週齢の SAM-P1 マウスにおいて、老人性難聴を示さない12週齢の SAM-P1 マウス、12週齢・20週齢の対象系統マウス (SAM-R1) と比較して miR-183 ファミリーの発現量が約半分に減少していることが明らかとなった。この結果は、内耳に発現する micro RNA の発現量の変化が、老人性難聴の原因となっている可能性を示唆しているものと考えられる。

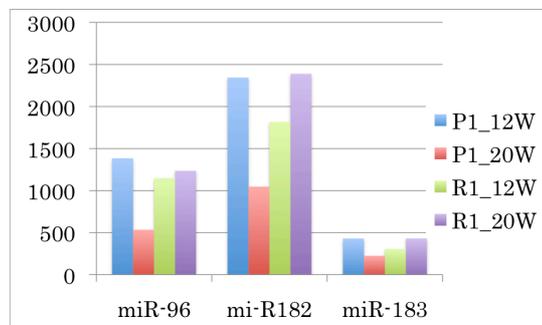


図2 加齢促進モデルマウス内耳における miRNA183 ファミリーの発現変化

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 西尾信哉、橋本繁成、鈴木伸嘉、工 穰、宇佐美真一、老化促進モデルマウス(SAMP1)の内耳におけるマイクロRNAの発現、第19回日本耳科学会総会・学術講演会、2009.10.9

② 西尾信哉、橋本繁成、鈴木伸嘉、工 穰、宇佐美真一、老化促進モデルマウス(SAMP1)の内耳におけるマイクロRNAの発現、第24回 老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、2009.7.9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

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

工 穰 (TAKUMI YUTAKA)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：70312501

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

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