

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09756

研究課題名(和文)急性感音難聴の遺伝子医療に向けた、内耳におけるマスター転写因子の実験研究

研究課題名(英文) An experimental study of master transcription factors that regulate gene expressions in cochleae with acute sensorineural hearing loss

研究代表者

高原 潤子 (Takahara, Junko)

岡山大学・総合技術部・技術専門職員

研究者番号：80448224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：音響外傷により急性感音難聴を呈したマウスの内耳(蝸牛組織)において、遺伝子発現をコントロールすると考えられる転写因子を探索した。難聴発症後3-12時間の蝸牛組織では転写因子Atf3の発現量が8倍以上に著増していた。その際の発現は蝸牛組織の感覚上皮に認められた。また感覚細胞(有毛細胞)での発現は12時間後により明確であった。また発症12時間後に転写因子Stat4の発現には減少する傾向を認めた。Atf3やStat4は蝸牛以外の組織では、炎症・免疫に関係する遺伝子群の発現を制御すると知られている。

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臨床では比較的頻繁にみられ、かつ難治性の病態である。音響外傷により急性感音難聴を呈するマウスの蝸牛では、発症早期に炎症・免疫に関連する遺伝子群が多数変動するが、当研究で検討したAtf3等はそれらの遺伝子発現をコントロールする転写因子であると考えられる。これらの転写因子は、急性感音難聴の発症リスク予測法、治療法やその効果の予測法の開発において、有力な解析ターゲットとなる。

研究成果の概要(英文)：Acute noise trauma is a major form of acute sensorineural hearing loss. It was previously shown that several dozens of inflammation and immunity related genes are up- and downregulated in cochleae at 12 hours post-noise trauma in mice. In this study it was shown that an immunity-regulating transcription factor, Atf3 (Activating Transcription Factor3) is upregulated in mice cochleae with more than 8-fold change in expression levels in 3 and 12 hours post noise trauma. Immunohistochemical experiments showed that Atf3 is expressed in the sensory epithelium of organ of Corti at these time points. An other immunity-regulating transcription factor Stat4 (Signal transducer and activator of transcription 4) showed a tendency of downregulation in cochleae at 12 hours post-noise trauma. Gene expression analysis by RNA-seq, DNA microarray, and realtime RT-PCR showed that other transcription factors, Dbp, Helt, Maff, Nr1d1 expressions are upregulated in cochleae at 3 hours post-noise trauma.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：急性感音難聴 蝸牛 転写因子 遺伝子発現解析 RNA-seq DNAマイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性感音難聴は耳鼻咽喉科の臨床では比較的頻繁にみられ、かつ難治性の病態である。その治療にはいまだ確立されたものはないが、一般に急性期にはステロイド(グルコルチコイド)の投与が行われることが多い。ステロイドはステロイドレセプターを介して、細胞核内で遺伝子発現をコントロールすることが知られている。したがって、急性感音難聴の治療法やその効果予測法を開発するためには、その内耳(蝸牛)での病態を、遺伝子発現を切り口として解明することが有用と考えられる。

我々はこれまでに、音響外傷によって急性感音難聴を呈するマウスの蝸牛で、遺伝子発現解析を行い、難聴発症後の12時間のタイムポイントでは、免疫・炎症機能に関連する数十種類の遺伝子群が変動することがわかった。急性感音難聴の治療法やその効果予測法開発のための解析ターゲットとしては、より少数の遺伝子を対象を絞ることが望ましい。そこで我々はこれらの多数の遺伝子発現をコントロールする少数の転写因子(マスター転写因子)が存在すると仮説をたて、その探索を行うことを計画した。またその際、難聴発症時の蝸牛で発現しており、蝸牛以外の組織では免疫・炎症に関連する遺伝子発現をコントロールすることが知られている、Atf3 (Activating Transcription Factor 3) と Stat4 (Signal transducer and activator of transcription 4) に注目した検討を行うことを計画した。

2. 研究の目的

当研究の目的は、音響外傷による急性感音難聴を発症するマウスの蝸牛において、多数の炎症・免疫関連遺伝子を中心に制御するマスター転写因子を探索することである。またこの際、Atf3 や Stat4 に着目した検討を行う。当研究で明らかになったマスター転写因子を、急性感音難聴の治療法やその効果予測法の解析ターゲットとする。

3. 研究の方法

当研究の動物実験は岡山大学動物実験委員会の審査・承認を経ておこなった。

1) マウスでの急性感音難聴発症実験

6-7週齢 雌 C57BL/6J 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、急性感音難聴(急性音響性障害)を惹起した。難聴発症前後に、聴性脳幹反応によりマウスの聴力を検討した。我々の研究室では、この実験により、CBA/J マウスおよび C57BL/6J マウスで、騒音暴露後24時間以内の一時的な聴力閾値上昇と、14日後の永続的な聴力閾値上昇を呈することを反復確認している。

2) 蝸牛からの RNA 抽出

マウスに急性感音難聴を発症させた後に、ケタミン(80mg/kg)、キシラジン(8mg/kg)で麻酔し、蝸牛組織を剖出した。剖出後の組織は速やかに冷却した RNA 保護試薬(RNA later, Qiagen 社)に浸し、24時間振とうした。その後は-80度で冷凍保存し、miRNAeasy カラムでトータル RNA を抽出した。蝸牛組織一個あたり、1.5-2.5マイクログラムの RNA が抽出された。いずれのサンプルについてもその品質については RNA integrity number が8以上であった。

3) 次世代シーケンサー(RNA-seq)解析

トータル RNA サンプルから Poly-(A) mRNA サンプルを抽出し、これを鋳型として cDNA を合成した。イルミナ NextSeq 500 シーケンサーをもちいて、75bp シングルエンドでのシーケンスをおこなった。シーケンス断片をマウスのリファレンスゲノム配列(mouse mm10)に従ってアラインし、転写産物のシーケンスを RefSeq Gene Database にしたがって検討した。各 RNA サンプルでの総リード数は3,600-4,400万であった。各転写産物ごとのリード数を TMM 法によって標準化し、各転写産物の発現量とした。

4) DNA マイクロアレイ解析

トータル RNA サンプルからオリゴdT プライマーを用いて cDNA を合成した。これをもとに Cy3 ラベルアンチセンス RNA プローブを合成し、SurePrint Mouse GE マイクロアレイ(Agilent 社)にハイブリダイズさせた。27,000以上の mRNA プローブの蛍光シグナルを DNA microarray scanner (Agilent 社)で検出し、Feature Extraction Software (Agilent 社)で定量したのち、標準化して、各転写産物の発現量とした。

5) リアルタイム RT-PCR

トータル RNA サンプルからオリゴdT プライマーとランダムヘキサマープライマーを併用して cDNA を合成した。以下の転写因子をコードする遺伝子について特異的プライマーを用いて定量実験をおこなった。リアルタイム RT-PCR 機器は LightCycler480 system (Roche Molecular Diagnostics)を用い、データは beta-2 microglobulin (キアゲン社プライマーカタログ番号: PPM03562A)を内在性コントロールとする Ct 法で定量化した。

検討遺伝子は次の通りである。: *Atf3* (activating transcription factor 3; PPM04669C), *Dbp* (D site albumin promoter binding protein; PPM24977A), *Helt* (helt bHLH transcription factor; PPM31593A), *Maff* (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family,

protein F; PPM30183B), and *Nr1d1* (nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1; PPM05213E).

6) 免疫染色

難聴発症前、難聴発症 3 時間後および 12 時間後のマウスを 4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定した後、蝸牛組織を剖出して 20 時間浸潤固定した。組織からパラフィン切片を作成し、DAB 法または蛍光抗体法により免疫染色法をおこなった。難聴発症時の蝸牛組織における *Atf3* と *Stat4* の発現部位を次の抗体を用いて検討した：抗 *Atf3* 抗体 (HPA001562, SIGMA)、抗 *Stat4* 抗体 (ab235946 Abcam)。

4. 研究成果

1) 急性感音難聴発症時の蝸牛における *Atf3* 発現

難聴発症後 3 時間後の蝸牛における *Atf3* の発現量は、難聴を発症していない蝸牛にくらべて、RNA-seq で 2.4 倍、DNA マイクロアレイで 2.1 倍に増加していた。より定量性の高いリアルタイム RT-PCR の実験では、難聴を発症していない蝸牛にくらべて 8.4 倍への有意な増加を認めた (8.44 ± 0.31 vs 1.01 ± 0.20 Mean \pm S.D., $n=6$, $P<0.01$ by t-test)。

難聴発症 12 時間後には *Atf3* の発現量は、RNA-seq では 3.1 倍、DNA マイクロアレイで 3.8 倍に増加していた (13.3 ± 1.35 vs 1.00 ± 0.04 , $P<0.01$, $n=6$)。

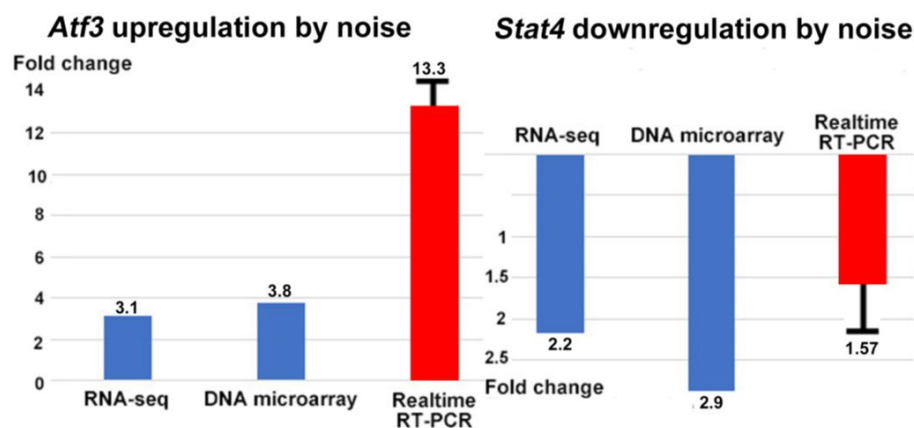
この際、抗 *Atf3* 抗体を用いた免疫染色では 3 時間後、12 時間後ともに、コルチ器での発現をみとめた。コルチ器の支持細胞での発現は 3、12 時間後ともにみとめたが、有毛細胞での発現は 12 時間後の方がより明確であった。

2) 急性感音難聴発症時の蝸牛における *Stat4* 発現

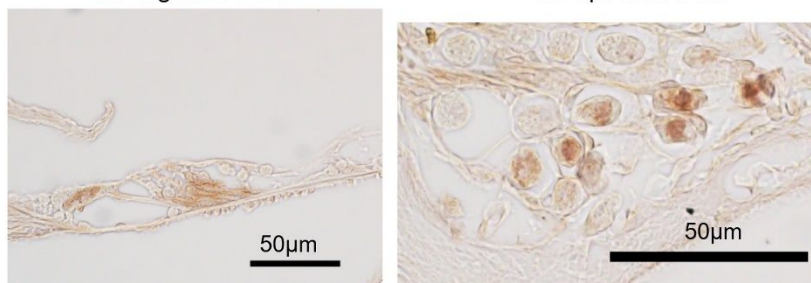
難聴発症後 12 時間後の蝸牛における *Stat4* の発現量は、難聴を発症していない蝸牛にくらべて、RNA-seq で 0.46 倍、DNA マイクロアレイで 0.35 倍に減少していた。より定量性の高いリアルタイム RT-PCR の実験では、統計的に有意ではなかったものの、0.73 倍へと減少する傾向をみとめた。 (0.73 ± 0.28 vs 1.01 ± 0.19 Mean \pm S.D., $n=6$, $P=0.064$ by t-test, $P=0.132$ by Mann-Whitney U-test)。

この際、抗 *Stat4* 抗体を用いた免疫染色では、難聴発症 12 時間後に、コルチ器やらせん神経節ニューロンに弱い発現をみとめた。

図：難聴発症 12 時間後の *Atf3* 発現量増加と *Stat4* 発現量減少



Stat4 発現 (難聴発症12時間後)
the organ of Corti the spiral neurons



3) 急性感音難聴発症 3 時間における遺伝子発現の網羅的解析

次に、急性感音難聴発症 3 時間の蝸牛と、難聴を発症していない蝸牛において、網羅的遺伝子解析法 (RNA-seq、DNA マイクロアレイ) で、発現量が変動している遺伝子をスクリーニングした。両者の実験方法で一致して、難聴発症時に 2 倍以上あるいは 1/2 以下へ発現量が変動していた遺伝子を 273 種類みとめた。これらの機能をデータベース (David Bioinformatic Resources)

で解析したところ転写因子活性に関係すると考えられるキーワード (Gene Ontology Term) との関連をみとめた。“Transcription factor activity, sequence-specific DNA binding” のキーワードに関連する遺伝子には、9 種類の発現増加遺伝子 (*Atf3*, *Dbp*, *Fos*, *Fosb*, *Fosl1*, *Helt*, *Maff*, *Nr1d1*, *Nr1d2*) と 16 種類の発現減少遺伝子 (*Arntl*, *Cdkn2a*, *Elf5*, *Eomes*, *Lbx1*, *Nkx2-2*, *Nkx6-2*, *Npas2*, *Olig1*, *Olig2*, *Pax6*, *Ppara*, *Rfx4*, *Sox3*, *St18*, *Tbx5*) をみとめた。これらの内の 5 種類の転写因子については、リアルタイム RT-PCR での発現定量実験を行い、RNA-seq、DNA マイクロアレイと一致した発現変動を確認した。リアルタイム RT-PCR で確認実験をおこなったのは次の転写因子群である。: *Atf3* (RNA-seq、DNA マイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR でそれぞれ 2.351、2.082、8.44 倍に増加), *Dbp* (4.810、4.299、11.23), *Helt* (3.501、4.293、4.34), *Maff* (3.245、2.927、1.49), *Nr1d1* (2.871、3.443、2.48)

考察:

- 1) 転写因子 *Atf3*、*Stat4* については既に、内耳以外の組織では炎症・免疫機能に関する遺伝子群の発現をコントロールすることが報告されている。当研究により、難聴発症時の蝸牛では *Atf3* の発現が著増することが示された。難聴発症 12 時間のタイムポイントでは、蝸牛において、炎症・免疫機能に関係する遺伝子群の発現が変動するが、*Atf3* はこれに先立って、発症 3 時間の時点より、蝸牛における遺伝子発現をコントロールしていると考えられる。またこれまで、難聴発症時の炎症・免疫反応は蝸牛外側壁を中心起こると報告されていたが、*Atf3* はコルチ器の支持細胞や有毛細胞に発現していた。したがって難聴発症時には、蝸牛の感覚上皮でも炎症・免疫反応が起こると考えられた。これまでの臨床研究では、*Atf3* 遺伝子の多型は喘息の発症リスクに影響すると報告されている。急性感音難聴の発症リスク予測法や治療法などの研究においても *Atf3* は有力なターゲットである。
- 2) *Stat4* に関しては、有意差はみとめなかったが、難聴発症時に減少する傾向を認めた。発現部位としてはコルチ器やらせん神経節ニューロンが考えられた。したがってこれらの構造でも炎症・免疫反応が起こると推察される。
- 3) その他の転写因子としては *Dbp*、*Helt*、*Maff*、*Nr1d1* の発現が、難聴発症 3 時間後の蝸牛において増加することが確認された。これらについても、急性感音難聴の治療法を検討する上で重要な遺伝子としてさらに研究が必要である。

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0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田幸英
2. 発表標題 急性音響性聴覚障害マウスの蝸牛での遺伝子発現解析 -発症直後の自然免疫応答について-
3. 学会等名 日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田幸英、大道亮太郎、菅谷明子、假谷 伸
2. 発表標題 音響外傷マウス蝸牛における、自然免疫応答の転写制御について
3. 学会等名 日本聴覚医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学 研究者総覧 https://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&l=ja researchmap https://researchmap.jp/read0154770/ 岡山大学 研究者総覧 https://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&l=ja researchmap https://researchmap.jp/junkotakahara 岡山大学 研究者総覧 https://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&l=ja researchmap https://researchmap.jp/junkotakahara

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	前田 幸英 (MAEDA YUKIHIDE) (00423327)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	

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
---------	---------