

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591876

研究課題名（和文）マウス蝸牛microRNA発現解析による老人性難聴発症機構の解明

研究課題名（英文）Mouse microRNA expression study identifying the nature of age-related hearing loss

研究代表者

野口 佳裕 (NOGUCHI YOSHIHIRO)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50282752

## 研究成果の概要（和文）：

microRNA (miRNA) は約 22 塩基対より成る二重鎖非翻訳性 RNA である。ターゲットとなる mRNA の翻訳や安定性を制御し、種々の疾患や老人性変化に関与する。本研究では、老人性難聴モデルマウスの蝸牛における miRNA の経時的な発現を解析し、老人性難聴病態を明らかにすることを目的とする。

C57BL/6 を老人性難聴モデルマウスとして用いた。聴性脳幹反応 (ABR) と歪成分耳音響放射 (DPOAE) により聴覚機能を評価した。周波数 8、16、32kHz の短音刺激に対する ABR 検出閾値は、10 カ月の時点で急速に悪化し、16 カ月に反応が認められなくなった。DP レベルは徐々に低下し、12 カ月までにノイズレベルに達した。1 カ月齢 18 匹 36 耳、10 カ月齢 18 匹 36 耳、16 カ月齢 15 匹 30 耳を miRNA 発現解析に用いた。RNAlater 内で、迷路骨包から膜迷路を摘出した。small RNA を含む全 RNA を各月齢グループごとに抽出し、Agilent2100 バイオアナライザーにて品質チェックを行った。miRNA 発現解析には miRCURY LNA microRNA Array を用いた。非階層クラスタ分析により、計 42 の老人性難聴に関連しうる候補 miRNA を同定した。

## 研究成果の概要（英文）：

MicroRNAs (miRNAs) are approximately 22 nucleotide, double-stranded, non-coding RNAs. They are shown to regulate the stability and translation of the target RNAs, and are associated with many disorders and aging. The aims of the present study are to investigate the time-course changes in miRNA expressions in the cochlea of age-related hearing loss mouse and to clarify the nature of age-related hearing loss.

C57BL/6 mouse was used as a mouse model of age-related hearing loss. Auditory brainstem responses (ABRs) and distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs) were carried out to evaluate the auditory functions. ABR thresholds for tone-burst stimuli at 8, 16, and 32 kHz rapidly increased at 10 months of age, and reached undetectable levels by 16 months of age. DPOAE levels gradually decreased to the noise levels by 12 months of age. Thirty-six ears from 18 mice at the age of 1 month, 36 ears from 18 mice at the age of 10 months, and 30 ears from 15 mice at the age of 16 months were used for miRNA expression analyses. Membranous labyrinths were dissected from otic capsules in RNAlater solution. Total RNAs including small RNAs were purified by each age group. The quality and quantity of each RNA preparation were determined using a Model 2100 Agilent BioAnalyser. miRCURY LNA microRNA Array (Exiqon) was used for miRNA expression profiles. Non-hierarchical cluster analysis of miRNA expressions detected 42 miRNAs that could be associated with age-related hearing loss.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

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：老人性難聴、内耳、蝸牛、加齢、マイクロRNA、mRNA、発現解析、C57BL/6

1. 研究開始当初の背景

65歳以上の高齢者では約40%が難聴によるコミュニケーション障害を有すると考えられており、老人性難聴の予防および治療は現在の高齢化社会において重要な課題である。老人性難聴の発症時期や程度の個人差は、種々の遺伝因子や環境因子が関与して生じると考えられている。また、発症機序として、ミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスなどの発症機序に関する報告がなされているが、未だ不明の点が多い。さらに重要なことは、種々の発症機序が複雑に絡み合っており、老人性難聴が発症すると考えられる点である。このため、老人性難聴の発症を総括的に捉える分子機序の解明が必要と考えられる。

miRNAは非コードRNAの一つであり、20塩基ほどの一本鎖RNAである。現時点で約1500のmiRNAが同定されているが、標的となるmRNAの翻訳制御もしくは分解によりタンパク合成を阻害する。細胞増殖・分化・発達やアポトーシスなどの生物学的に重要な役割を果たし、癌や心臓病などの疾患の制御にも関与することから治療への応用も期待されている。miRNAの中には組織特異性のあるものが存在し、内耳には全miRNAの約3分の1が発現する。また、最近ではmiRNA(miR-96)の変異がマウスとヒトにおける難聴の原因となることが報告され、特定のmiRNAが聴覚機能に重要な役割を果たすことが判明している。

miRNAとsmall interfering RNA (siRNA)は、低分子RNAであり同様のRNA干渉(RNAi)を起こす点で類似する。しかし、siRNAが完全な相補性により標的遺伝子(mRNA)に作用するのに対して、miRNAは不完全な相補性によりRNAiを引き起こす。この特徴により1つのmiRNAは複数の標的遺伝子に作用し、中心となる生物学的プロセスを総括的に調節する。miRNAが老化の分子機序にも重要であることはすでに報告されている。実際に

C57BL/6マウスを用いた肝における老化研究では、2つの特定のmiRNAの発現が老化とともに上昇し、これらのmiRNAが酸化防御機構に関与するタンパクを制御することが判明している。従って、本研究により、加齢とともに発現が変化する蝸牛内のmiRNAを特定すれば、老人性難聴という生物学的プロセスに重要で中心となる調節因子を明らかにすることができる。さらに、特定されたmiRNAの標的遺伝子群を同定することで、これまで個々に研究されてきた老人性難聴発症の分子機序を総括的に捉えることが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、老人性難聴モデルマウスから蝸牛を摘出し、月齢1、10、16カ月のmiRNA発現プロファイルを比較解析することにより、難聴の加齢変化に関与する特定のmiRNAを明らかとする。さらに、mRNA解析との統合解析を行うことで、特定されたmiRNAの標的遺伝子群を同定することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認のもと行われた。

老人性難聴モデルマウスとしてC57BL/6を用いた。miRNA発現解析に先立ち、聴性脳幹反応(ABR)と歪成分耳音響放射(DPOAE)を用いて腹腔内麻酔を施したC57BL/6の経時的な聴覚評価を行った。ABRは、8、16、32kHzの短音を音刺激とし、防音ボックス内でスピーカより呈示した。音刺激回数、波形のS/N比に応じ200~1000回とした。刺激音圧は90dBから10dB、その後5dBごとに低下させ、各周波数におけるABR検出閾値を求めた。DPOAEは、音響プローブ(ER-10C:Etymotic Researchs社)と専用の測定装置(DP2000、Mimosa Acoustics社)を用いた。音の呈示方法はL1=65dB SPL、L2=55dB SPL、f2/f1=1.2、

f2=4-20kHz とし、DP グラムを作成した。使用したマウスの数は、7 匹（月齢 1 カ月）、7 匹（月齢 2 カ月）、7 匹（月齢 3 カ月）、7 匹（月齢 4 カ月）、7 匹（月齢 6 カ月）、10 匹（月齢 8 カ月）、12 匹（月齢 10 カ月）、5 匹（月齢 12 カ月）、5 匹（月齢 5 カ月）、13 匹（月齢 12 カ月）であった。

ABR、DPOAE の結果に基づき、miRNA、mRNA 発現解析時期を 1、10、16 カ月に設定した。マウスを安楽死させた直後に側頭骨を摘出し、RNAlater 内で解剖した。実体顕微鏡下で外側の骨迷路を丁寧に除去し、蝸牛外側壁とコルチ器を含む膜迷路のみとした。左右の蝸牛膜迷路を RNAlater で満たされたマイクロチューブ内に収集し、-20℃で冷凍保存した。1 カ月齢 18 匹 36 耳、10 カ月齢 18 匹 36 耳、16 カ月齢 15 匹 30 耳から、miRNA を含む全 RNA を抽出し、Agilent2100 バイオアナライザーにて品質チェックを行った。miRNA 発現解析には miRCURY LNA microRNA Array を用いた。mRNA の発現解析は、CodeLink™ Mouse Whole Genome Bioarray を用いた。

#### 4. 研究成果

ABR 検出閾値は、8、16、32kHz の全ての周波数において月齢 10 から 12 カ月の間に急速に上昇し、月齢 16 カ月の時点で完全に反応が認められなくなった。DP レベルは、月齢 3 カ月の時点で軽度の低下を示し、その後少しずつ低下しながら、月齢 12 カ月でノイズレベル以下となった。

miRNA 発現は、非階層クラスター分析（どれか 1 つの比較で  $\text{Ratio} \geq 1.5$  あるいは  $\leq 0.66$ ）により 6 つのクラスターに分類され、クラスター 1 に 12 遺伝子、クラスター 2 に 3 遺伝子、クラスター 3 に 15 遺伝子、クラスター 4 に 5 遺伝子、クラスター 5 に 2 遺伝子、クラスター 6 に 5 遺伝子、計 42 の候補となる老人性難聴関連 miRNA を同定した。同定された miRNA には常染色体優性遺伝性難聴と難聴マウス *diminuendo* の原因遺伝子 miR-96、内耳有毛細胞やラセン神経節に発現し有毛細胞の分化、成熟に関連すると考えられる miR-183 および miR182、アポトーシスに関連する miR-29 が含まれていた。1、10、16 カ月齢の全 RNA に対する mRNA 発現プロファイルとの統合解析にて、候補となる老人性難聴関連タンパクを同定した。

#### 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）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

① 野口佳裕、高橋正時、喜多村 健: 加齢性

難聴モデルマウス C57BL/6J における miRNA 発現解析. 第 20 回日本耳科学会総会, 松山, 2010.10

- ② Noguchi Y, Takahashi M, Honda K, Nishio A, Kitamura K: microRNA expression in the aging mouse cochlea. 35<sup>th</sup> Annual Midwinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, San Diego, 2012.2
- ③ 野口佳裕, 本田圭司, 高橋正時, 川島慶之, 喜多村 健: 加齢性難聴モデルマウスにおける加齢に伴う miRNA 発現の変化. 第 22 回日本耳科学会総会, 名古屋, 2012.10

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 佳裕 (NOGUCHI YOSHIHIRO)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50282752

(2) 研究分担者

高橋 正時 (TAKAHASHI MASATOKI)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80401355

(3) 研究分担者

伊藤 卓 (ITO TAKU)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究

科・助教

研究者番号：80401355

(4)連携研究者

( )

研究者番号：