

## 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 06 月 09 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791636

研究課題名（和文）

内耳疾患における miRNA の機能解明と新たな診断マーカーの開発

研究課題名（英文）

Research of miRNA function in inner ear disease and new diagnostic biomarker

研究代表者

関根 久遠（SEKINE KUWON）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20566377

研究成果の概要（和文）：マイクロ(mi)RNA とは小さな非翻訳 RNA で、遺伝子発現を制御することで、発生、分化の制御や腫瘍の発生、ウイルス感染など様々な生命活動にかかわることが明らかになり、非常に注目されている。耳科領域において近年 miRNA の機能や難聴とのかかわりについての研究が進められている。本研究においては剖検された高齢者および超高齢者の内耳 miRNA の解析を行い、ラットの研究で内耳に発生や機能分化に重要とされる miRNA が高齢者、超高齢者においても発現しており、内耳の恒常性維持や、機能維持にも重要な役割をしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：miRNAs are small non-coding RNAs. They are involved in diverse physiological, developmental, and pathological processes by regulating the expression of target messenger RNAs (mRNAs). In the current review, they discuss the developments in miRNAs research with a focus on the potential role of miRNAs in inner ear development, genetic hearing loss. In this study we examined miRNAs expression in plural geriatric human inner ear. In this research we found that these miRNAs that have a important roles in inner ear, are still expressed in old age, and oldest olds. This result shows that these miRNAs have important roles not only in development but also in inner ear maintenance of homeostasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：内耳、miRNA、マイクロアレイ、高齢者

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA とは 20~25 塩基ほどの小さな非翻訳 RNA で、翻訳レベルで遺伝子発現を制御することで、発生、分化の制御や腫瘍の発生、ウイルス感染など様々な生命活動にかかわることが明らかになってきており、近年、非常に注目されている。その生成に Dicer という蛋白が必要であることや、複数の mRNA を標的として、翻訳抑制のみの場合や、mRNA の切断を行う場合があるということなど miRNA の総論としての生成や機能が分かってきている。しかし、実際にどの miRNA がどの mRNA を標的とし、どの程度制御しているのかは未だにほとんど解明されていない。

内耳における miRNA 研究は 2006 年に Weston らによってマウス内耳の miRNA の発現についての初めて報告され、miR-183, miR-96, miR-182 (miRNA 183 family) は内耳に特異的に発現しており、有毛細胞の分化や機能維持に重要な役割を果たすことが示唆されている。さらに 2011 年には Tal Elkan-Miller らにより miR-135b が内耳では前庭に多く発現し、PSIP1(PC4 and SFRS1 interacting protein 1)-P75 (蝸牛有毛細胞に特異的に発現し、蝸牛への分化に係る) を down regulate することが示されている。

miRNA と難聴については、2009 年に Mencia A らによって miR-96 がその変異によって非症候性の進行性感音難聴 DFNA50 を生じることが報告されており、その病態については、2009 年に Friedman らによって miRNA の生成に必須である Dicer のノックアウトマウスでは有毛細胞を含む内耳の形態異常を生じることが報告されている。

## 2. 研究の目的

miRNA の機能解明は内耳の発生や機能維持、また老人性難聴のような感音難聴のメカニズムを解明する上でも重要と考えられる。内耳 miRNA の機能解明により老人性難聴などこれまで克服できなかった疾患の病態に迫ることが期待できる。

ラット内耳における miRNA 発現の経時的变化を各週数の rat を用いることによって検討した。また、これまで、ヒトでの内耳 miRNA の発現についてはまとまった報告がなく、高齢者の内耳でどのような miRNA が発現しているのかは知られていなかった。本研究では、ヒト高齢者内

耳での miRNA 発現を解析し、その機能解明および内耳疾患のバイオマーカーとなり得る miRNA 候補を検索することを目的としている。

## 3. 研究の方法

ラットを用いた実験は生後 0 日、8 日、20 日のラットそれぞれ 22 耳、20 耳、20 耳から採取した内耳組織から抽出した totalRNA を用いた。

ヒトの検体には他疾患で死亡した 60 歳以上の高齢者 9 人より摘出した側頭骨を用いた。60~75 歳 5 例、90 歳以上 4 例であった。看護記録からは 75 歳以下はすべて難聴の記載はなく、90 歳以上はすべて難聴ありであった。頭骨を切り出し凍結保存し、解凍後正円窓から RNA later (Ambion) を注入した上で膜迷路組織を取り出した。この組織より ISOGEN (Nippon Gene) 法を用いて total RNA を抽出し実験に用いた。

miRNA の発現解析には Applied Biosystems の TaqMan® Array MicroRNA Card を用いて、プロトコールに従って解析した。このプロトコールには検体の total RNA の量により逆転写後に cDNA 増幅を行うことが推奨されており、本実験では、内耳組織から抽出される total RNA 量が少ないため cDNA 増幅プロトコールを用いた。

検体の total RNA の逆転写には Megaplex™ RT Primer Pools および、TaqMan® MicroRNA RT Kit を用いた。cDNA 増幅には Megaplex™ PreAmp Primer Pools および、TaqMan® PreAmp Master Mix Kit を用いた。これらの PCR には Applied Biosystems の Veriti® 96-Well Thermal Cycler を用いた。

Realtime PCR には TaqMan® Universal Master Mix および、TaqMan® Array MicroRNA Card Ver2.0 A および B を用いました。Realtime PCR には Applied Biosystems 7900HT を用いた。

Realtime PCR の結果の解析には、解析ソフトウェア SDS v2.3、RQ manager を用いた。

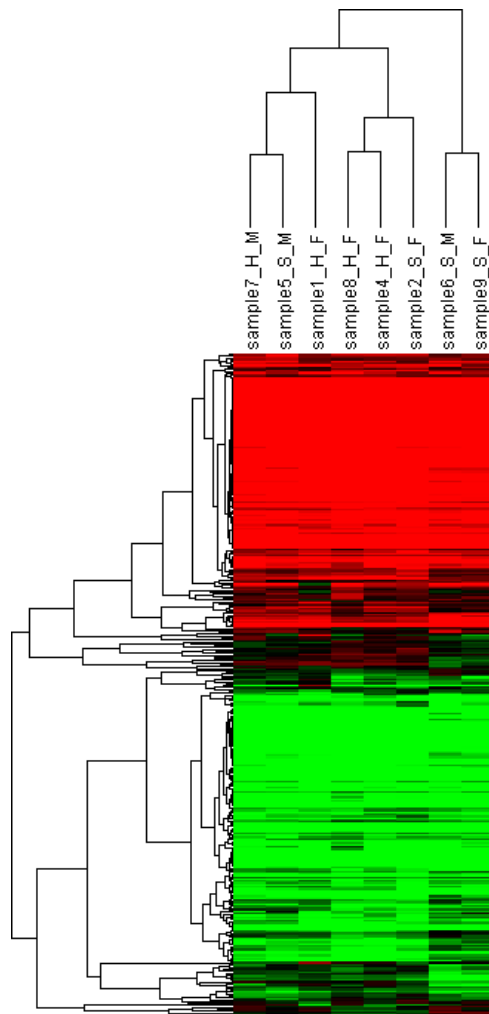
## 4. 研究成果

ヒト高齢者 miRNA の発現解析については、9 例のうち 1 例 (75 歳未満男性) は、内在性コントロールの U6 の発現が他の検体と比較し明らかに少ないため検討から除外した。その結果、解析対象は 60~75 の高齢者 4 例、90 歳以上の 4 例と

なった。男性3例、女性5例であった。

アレイで解析できる miRNA662 種のうち 発現数が最も少ないもので 403 種、最も多いもので 445 種の発現を認めた。これらのうち、全ての症例で発現を認めたのは、345 種であった。

これらの遺伝子の発現解析結果をまず、階層的クラスタリング法により遺伝子およびサンプルのクラスタリングを行った。



その結果、性別群、高齢者群、超高齢者群におけるクラスター形成は認めなかった。

次に、すべての症例で発現を認めた miRNA について、高齢者群、超高齢者群の間での発現量差について検討した。

データを比較するに際して、それぞれの2群における t 検定での比較を検討していたが、検定の性質上発現量の低いものがより上位に来やすいという傾向があるため、miRNA 発現の様に miRNA の種類によって発現量に大きな差があるものでは必ずしも正しいとは言えないと考えられる。そのため解析結果の信頼性

向上のため、t 検定と 2-Fold change (2 倍以上の発現量変化のあるもの) を組み合わせた解析、t 検定を改良し発現量による影響を少なくした Significance analysis of microarrays (SAM) 解析 (Tusher et al., PNAS, 2001)、Fold change の相乗平均を用いた Rank products 解析 (Breitling et al., FEBS Lett., 2004) の3種の解析法を用いて解析を行い、これらのうち2種以上の解析法で有意差有の miRNA を有意な発現量差とした。

その結果、以下の15種の miRNA について高齢者群において超高齢者よりも有意に多く発現していた。

hsa-miR-132, hsa-miR-190,  
has-miR-155, hsa-miR-331-5p,  
hsa-miR-218, hsa-miR-543,  
hsa-miR-148b, hsa-miR-126,  
hsa-miR-323-3p, hsa-miR-488,  
hsa-miR-625, hsa-miR-374a,  
hsa-miR-656, hsa-miR-139-5p,  
hsa-miR-363

超高齢者群で高齢者群より優位に多く発現している miRNA は認めなかった。

さらに、男性群、女性群の間での発現量差を検討した。その結果、以下の2種について男性群において女性群より有意に多く発現していた。

hsa-miR-34b\*, hsa-miR-572

また、以下の23種について女性群で男性群より有意に多く発現していた。

hsa-miR-886-3p, hsa-miR-671-3p,  
hsa-miR-223, hsa-miR-198,  
hsa-miR-504, hsa-miR-505,  
hsa-miR-365, hsa-miR-511,  
hsa-miR-140-5p, hsa-miR-148a,  
hsa-miR-204, hsa-miR-339-5p,  
hsa-miR-224, hsa-miR-618,  
hsa-miR-627, hsa-miR-523,  
hsa-miR-542-5p, hsa-miR-532-3p,  
hsa-miR-455-5p, hsa-miR-502-3p,  
hsa-miR-135b, hsa-miR-328,

hsa-miR-488,

さらに過去の報告で、内耳に存在し、内耳の分化や機能維持に重要とされている miRNA の高齢者内耳での発現状況について検討した。

Weston らに報告されている、miR-183 family の miR-183, miR-96, miR-182 は、高齢者、超高齢者においても発現を維持していた。また、2012 年の Patel らによる review では、その他に miR-15a, miR-18a, miR-30b, miR-99a, miR-100, miR-124, miR-125b, miR-130b, miR-135b, miR-199a3p についても、内耳で何らかの機能を持つ miRNA として報告しているが、今

回の検体では8例全てにおいて、これらすべてのmiRNAが検出されており、これらのmiRNAが発生時における内耳の分化のみでなく、内耳の恒常性維持や、生理学的な機能維持にも重要な役割を持つことが示唆された。

さらにこれらのmiRNAの中で、miR-135bは今回の解析で男女差があり、有意に女性で多いことが示された。miR-135b 蝸牛よりも前提に多く発現し、蝸牛有毛細胞に特異的に発現し、蝸牛への分化に係るとされる蛋白質 PSIP1(PC4 and SFRS1 interacting protein 1)-P75 を down regulate することが Tal Elkan-Miller らによって示されている。このように内耳において重要な役割を果たすmiRNAが高齢者の内耳において男女差があるということが示されたことは、男性で多いや加齢性難聴や、女性に多いめまい疾患などの内耳疾患の性差にmiRNAが何らかの関与をしている可能性が示唆されたと考えられる。

現在、ラットにおける加齢とmiRNA発現の変化について解析を進めており、これらの結果を踏まえバイオマーカーの候補となりうるmiRNAの検索を進める。

#### 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4件)

- ① Shiiba K, Shindo S, Ikezono T, Sekine K, Matsumura T, Sekiguchi S, Yagi T, Okubo K. Cochlin expression in the rat perilymph during postnatal development. Acta Otolaryngol. 査読有 132巻2012年 1134-1139 doi: 10.3109/00016489.2012.687456.
- ② Ikezono T, Shindo S, Sekine K, Shiiba K, Matsuda H, Kusama K, Koizumi Y, Sugizaki K, Sekiguchi S, Kataoka R, Pawankar R, Baba S, Yagi T, Okubo K. Cochlin-tomoprotein (CTP) detection test identifies traumatic perilymphatic fistula due to penetrating middle ear injury. Acta Otolaryngol. 査読有 131 巻 2011 年 937-944 doi: 10.3109/00016489.2011.575795.
- ③ Li L, Ikezono T, Sekine K, Shindo S, Matsumura T, Pawankar R, Ichimiya I, Yagi T. Molecular cloning of the Coch

gene of guinea pig inner ear and its expression analysis in cultured fibrocytes of the spiral ligament. Acta Otolaryngol. 査読有 130 巻 2010 年 868-880 doi: 10.3109/0001648903493766.

- ④ Sekine K, Ikezono T, Matsumura T, Shindo S, Watanabe A, Li L, Pawankar R, Nishino T, Yagi T. Expression of cochlin mRNA splice variants in the inner ear. Audiol Neurootol. 査読有 15 巻 2010 年 88-96. doi: 10.1159/000231634.

[学会発表] (計2件)

- ① 高齢者剖検例の内耳における microRNA の発現 日本耳科学会 平成 23 年 11 月 24 日 沖縄コンベンションセンター
- ② 高齢者内耳 microRNA の発現 日本耳科学会 2010 年 10 月 8 日 松山市道後ひめぎんホール

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

関根 久遠 (SEKINE KUWON)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20566377