

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791888

研究課題名（和文） 内耳におけるマイクロ RNA の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of the micro RNA in mouse inner ear.

研究代表者

西尾 信哉（NISHIO SHINYA）

信州大学・医学部・助教（特定雇用）

研究者番号：70467166

研究成果の概要（和文）：

近年、micro RNA と呼ばれる翻訳されない短い RNA 分子が、発生、分化、生命機能維持や発ガンなど様々な生命現象に重要な事が明らかとなってきた。この短い RNA の作用メカニズムとして、micro RNA に含まれる seed 領域と呼ばれる 18 塩基程度の領域が、mRNA とハイブリッドを形成し、そこに RISC 複合体が形成されて遺伝子発現を抑制すると推定されている。本研究では内耳における micro RNA の解析をテーマに、加齢性難聴を示すモデルマウスとそのコントロール系統を用いて、若齢時と加齢時における内耳の micro RNA および mRNA の発現量の違いを明らかにすることを目的にマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析を行った。その結果、加齢性難聴を示すマウスでのみ micro RNA および mRNA の発現パターンが異なる事を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Micro RNA has important roll in many biological phenomena including development, differentiation, cancer etc. We examine the micro RNA and mRNA expression profiles of 12 weeks old and 20 weeks old senescence-accelerated model mouse (SAM-P1) cochlea and its control strain (SAM-R1) cochlea by using micro RNA microarray. The micro-RNA expression profiles in SAMP1 and SAMR1 mice were quite similar at 12 weeks. On the other hand, the expression profiles changed remarkably in 20 week old SAM-P1 mice than the other. Interestingly, miR-96, miR182 and miR183 which proposed as important factors for inner ear development and function were decreased about half in 20 weeks old SAM-P1, which revealed age related hearing loss.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：耳科学、内耳、マイクロ RNA、遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

近年、神経分化や腫瘍、線虫の脱皮や酵母の減数分裂、等に micro RNA (miRNA) と呼ばれる内在性の翻訳されない短い RNA 分子が、大きな役割を担う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。miRNA は細胞外の刺激などによ

り前駆体から合成され、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の調整を行う重要な分子である。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。しかしながら、これら micro RNA の標的となる mRNA は全く明らかとなっておらず、コンピューター予測プログラムによる予測程度しか検討する方法が無かった。

2. 研究の目的

近年、生物の発生や分化、線虫の脱皮や酵母の減数分裂などの多彩な生命現象およびガンなどの疾病に内在性の翻訳されない短い RNA が重要な役割を果たすことが明らかとなっており、その機能解明が注目されている。

内耳では 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。

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。このように、内耳において重要な機能を有する micro RNA 分子は徐々に解明されてきているが、一方、それら micro RNA が聴覚機能維持にどのような役割を果たしているかに関しては未だ明確となっていない。

研究代表者は、12 週齢および 20 週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1) およびコントロール系統 (SAM-R1) を用いて、内耳における micro RNA の網羅的発現解析を行った。その結果、加齢性難聴を示す 20 週齢の SAM-P1 マウスでのみ micro RNA の発現パターンが大きく異なっていることを見いだした。また、内耳の機能に重要であることが示唆されている micro RNA (miR-96、miR-182、miR-183) では、その発現が他のマウスの約半分に減少していることを見出し報告した。

このように聴覚に micro RNA が重要な役割を持つ事が明らかとなってきたが、どのようなメカニズムで聴覚機能に関与しているかは未だ不明である。そこで、本研究では近年さまざまな機能を持つことが明らかとなってきた micro RNA が、内耳でどのような機能を果たしているかを明らかにすることを目的とした。

特に、幼若マウスおよび老齢マウスの聴力を測定した後、蝸牛を摘出し、miRNA とターゲットとなる mRNA の網羅的解析を行い、マウスの内耳で機能している miRNA のターゲットを明らかにするとともに、Ribo-cluster 免疫沈降法を応用することで、内耳における miRNA とそのターゲットとなる mRNA の同定を行い、マウス内耳の miRNA 機能プロファイルを完成させることを目的とした。

3. 研究の方法

内耳における micro RNA の機能を明らかにすることを目的に、12 週齢および 20 週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1) およびコントロール系統 (SAM-R1) を用いた。

深麻酔下にて ABR 法により聴力の測定を行った後、深麻酔下にて断頭し、速やかに内耳を摘出し、RNAlater 液に浸けた。実体顕微鏡下で RNAlater 液中の内耳より膜迷路を摘出した。RNA 抽出は、ビーズクラッシャーで組織を破砕した後に、QIAGEN 社の RNeasy mini kit を用いて total RNA の抽出を行った。また、同様に摘出した蝸牛膜迷路を用いて QIAGEN 社の miRNeasy mini kit を用い small RNA を含む total RNA の抽出を行った。

得られた RNA を Agilent 社の Bioanalyser 2000/ RNA pico 6000 kit を用いて定量および品質確認を行った後に、Agilent 社の SurePrint G3 mouse gene expression array を用いて遺伝子発現の網羅的解析を行った。また、得られた total RNA の一部を用いて Applied Biosystems 社の High capacity RNA to cDNA kit を用いて逆転写を行い cDNA を得た。得られた cDNA を用いて、遺伝子発現の変化した mRNA を増幅する Taq Man gene expression assays を用いて定量を行い、内耳における遺伝子の発現の変化を確認した。また、研究開始までに明らかとなっていた micro RNA に関しても同様に、Taq Man miRNA expression assays を用いて定量解析を行い、発現量の変化を確認した。

また、micro RNA がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的に、Ribocluster 沈降法を用いて、Dicer、Ago2 を含む RISC 複合体を抗 Ago2 抗体を用いた免疫沈降により回収し、そのなかに含まれている RNA 分子を同様の手法で回収してマイクロアレイで解析を行った。Ribocluster 沈降法により得られた RNA は非常に微量であるため、Agilent 社の Bioanalyser 2000/ RNA pico 6000 kit による測定は行わず、Qubit を RNA High sensitivity kit 用インターカーレーター法により定量を行った。

4. 研究成果

内耳における micro RNA の機能を明らかにすることを目的に、12 週齢および 20 週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1) およびコントロール系統 (SAM-R1) を用い聴力の測定を ABR 法により行った。

その結果、12 週齢では加齢促進モデルマウス、コントロール系統ともに聴力閾値の上昇は認められなかった。一方、20 週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1 20W) では聴力閾値の上昇を認めたのに対して、コントロール系統では 12 週齢と聴力閾値の変化は認められず、20 週齢の加齢促進モデルマウスでのみ加齢性難聴を呈する事を確認した。

また、内耳における micro RNA の機能を明らかにすることを目的に、12 週齢および 20 週齢の加齢促進モデルマウス (SAM-P1) およびコントロール系統 (SAM-R1) より抽出した total RNA を用いてマイクロアレイを用いた発現解析を行った。

その結果、12 週齢および 20 週齢の加齢促進モデルマウスの発現量の比較では、加齢促進モデルマウスで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子が 2450、2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子が 1985 種類であった。加齢性難聴と関係の無い遺伝子発現変化を除去する目的で、12 週齢および 20 週齢のコントロール系統でも同様に遺伝子発現量の比較を行い、加齢促進も出るマウスと同様の挙動を示す変化を示す遺伝子群を解析対象から除去した。その結果、加齢促進モデルマウスでのみ遺伝子発現が特異的に変化している遺伝子群を抽出した。

その結果、加齢性難聴を呈する加齢促進モデルマウスのみで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子が 1613 種、2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子が 991 種類であった。

遺伝子発現の上昇した遺伝子について詳細に見て行くと、*Bdnf*などの成長因子、*Bcl2*などのアポトーシス関連遺伝子の発現が上昇していた。

また、過去に難聴の原因遺伝子変異として同定されている54遺伝子の発現変化に着目すると、2倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子が2種、2倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子が4種類であった (図1、図2)。一例として、先天性難聴の原因遺伝子である *Ptprq* 遺伝子では、加齢性難聴を呈する加齢性促進モデルマウス (SAM-P1) では、12週齢から20週齢になると2倍程度発現が増加するのに対して、コントロール系統 (SAM-R1) では発現がおおよそ半分に減少することが明らかとなった (図1)。

一方、先天性難聴の原因遺伝子である *Myh9* 遺伝子や *Myo6* 遺伝子では、加齢性難聴を呈す

る加齢性促進モデルマウス (SAM-P1) では、12週齢から20週齢になると半分以上に発現が低下するのに対して、コントロール系統 (SAM-R1) では発現がおおよそ2倍に増加することが明らかとなった (図2)。

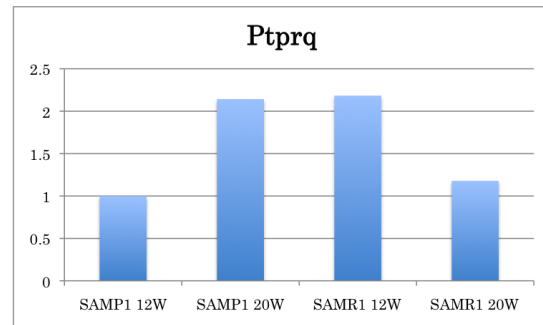


図1 : *Ptprq* 遺伝子発現の変化

加齢性促進モデルマウスでは、12週齢から20週齢になると2倍程度発現が増加するのに対して、コントロール系統では発現がおおよそ半分に減少する。

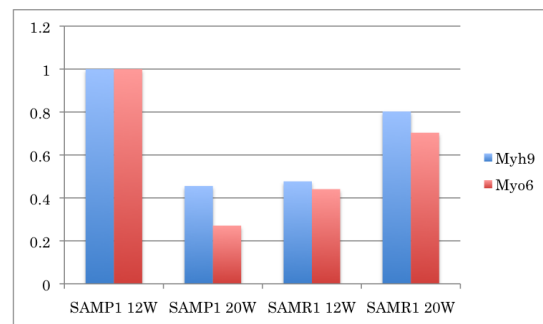


図2 : *Myh9*、*Myo6* 遺伝子発現の変化

加齢性促進モデルマウスでは、12週齢から20週齢になると半分以上に遺伝子発現が減少するのに対して、コントロール系統では発現がおおよそ2倍に増加する。

また、micro RNAがどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的に、Ribocluster沈降法を用いて、Dicer、Ago2を含むRISC複合体を抗Ago2抗体を用いた免疫沈降により回収し、そのなかに含まれているRNA分子をマイクロアレイで解析を行った。その結果、内耳においてRNA分解複合体に取り込まれ遺伝子発現を調節しているmicro RNA群とmRNA群を同定する事ができた。

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)

〔学会発表〕（計 1 件）

①西尾信哉、宇佐美真一：内耳における
microRNAの発現に関する研究第1回 耳鼻咽
喉科フロンティアカンファレンス 2012. 9. 15
旭川グランドホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 信哉 (NISHIO SHINYA)

信州大学・医学部・助教（特定雇用）

研究者番号：70467166