

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861423

研究課題名(和文) 新たな内耳性難聴治療法の開発 RNAiによる難聴原因蛋白Cochlinの発現抑制

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for inner ear deafness -inhibition of the expression of Cochlin with RNAi-

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成人発症型の遺伝性難聴であるDNFA9の原因蛋白の発現を抑制し、難聴の発症を防ぐことが出来るかどうかを確認する目的で研究を開始した。
まずCochlinを安定発現する細胞を得る必要があるが、商用細胞株でcochlinが発現している細胞はないため、マウスの内耳組織からの繊維芽細胞単離や、不死化細胞株を用い発現ベクターによるCOCH mRNAの強制発現を試みたが、Cochlinの安定発現細胞株を得ることはできなかった。
また、予備実験としてヒト内耳に含まれるmiRNAのにCochlinを抑制する可能性のあるmiRNAが存在するかどうかについても検索したが、確認できなかった。

研究成果の概要(英文)： This study was initiated to check whether the onset of hearing loss can be prevented by inhibiting the expression of the causative protein of DNFA9 in the adult onset-type hereditary hearing loss. First, it is necessary to obtain cells, which are stably expressing Cochlin. However, since there are no cells in the commercial-use cell lines expressing Cochlin, isolated fibroblasts from the inner ear of mice and immortalized cell lines were used to attempt forced expression of COCH mRNA using an expression vector - but cells which stably express Cochlin were unable to be obtained. In addition, as a preliminary experiment, miRNA that could inhibit Cochlin was searched for in miRNA in the human inner ear but was not confirmed.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：inner ear miRNA

1. 研究開始当初の背景

感音難聴は人口の5%に発生するといわれる頻度の高い疾患であり、音声言語を介したコミュニケーションに支障を来すことによって患者の生活の質を著しく下げる。感音難聴に対する根本的な治療法は現時点で存在しておらず、補聴器や人工内耳など、補装具を効果的に用いることがその医療の中心となっている。このため、現在様々な手法を元に内耳障害に対しての根本的な治療の方法についての研究が進んでいるが、未だ決定的な方法は確立されていない。

2005年に福島らの研究(Human Molec Genet vol.14.1641-50, 2005)で正円窓を介した内耳への変異 GJB 遺伝子の導入と siRNA の同時投与での抑制効果を確認しており、内耳においてある種の変異遺伝子に対して RNA 干渉効果があることが確認されており、遺伝性内耳疾患の新しい治療法として期待されている。

RNA 干渉を用いて、病的な作用を持つ遺伝子の発現抑制や、生理的(ないしは病理的)に不利益な働きをする遺伝子の発現を抑制することが可能であれば、より生理的に近い形での遺伝子治療の方策を提供することになり、難聴治療薬創薬の一つの手段として応用可能であると考えられる。

COCH (coagulation factor C homology) 遺伝子は近年非常に注目されている遺伝子である。進行性に難聴・めまいをきたす非症候性優性遺伝性難聴 DNFA9 (deafness, autosomal-dominant 9)の原因遺伝子であることが分かっており、これまでに北米・ヨーロッパ・日本などで変異が報告されている。これまでに我々は COCH 遺伝子の産物蛋白である Cochlin に着目して解析を行い、さまざまな興味深いデータが得られているが、Cochlin の生体内での機能や、変異による機能障害によって難聴が生じるメカニズムについては解明されていない。

DNFA9 などの優性遺伝性疾患においては、変異遺伝子の産物が生理的に不利益な働きをしたり、組織に沈着することで正常な機能を阻害することが分かっている。DNFA9 の病変組織の解析結果においても、変異 Cochlin の沈着が難聴の原因であることを示唆した報告がある。その一方で、COCH ノックアウトマウスにおいて全身的な異常や、難聴などの内耳障害は確認されておらず、RNA 干渉により変異遺伝子の発現を抑制することで治療が期待できる疾患の一つである。COCH 変異遺伝子を RNA 干渉により抑制することができ、レトロウィルスベクター等を用いて長期間効果を持続することができれば、DNFA9 の治療のみでなく、さまざまな優性遺伝性難聴の治療に応用することが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、内耳において RNA 干渉に

よる COCH 遺伝子の発現抑制が可能であるか、また正常内耳において COCH 遺伝子の発現抑制を行った際に内耳組織へどのような影響が現れるかについて、基礎的なデータを得ることにある。そのために、(1) COCH 遺伝子産物を発現した培養細胞の探索、または COCH 遺伝子発現ベクターを培養細胞に導入し cochlin を発現した細胞モデルを作製する、(2) COCH の mRNA の配列よりデザインした siRNA を cochlin 発現細胞に導入し、cochlin 発現抑制条件の最適化とその影響の詳細、(3) マウスなどモデル動物を用いた in vivo における cochlin 発現抑制系の検討、および cochlin ノックダウンによる全身への影響の検討、という3段階の計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) ヒト COCH 遺伝子の mRNA の解析
以前の研究でヒト COCH 遺伝子の mRNA に全長サイズの異なる複数のスプライシングバリエーションが存在するとの報告がある。また COCH 遺伝子産物である cochlin には少なくとも4種類の isoform があることがわかっている。これらのことから、ヒト COCH 遺伝子の mRNA について、ヒト内耳から抽出した total RNA を用いて 5'および 3'-RACE PCR 法で cap 構造および poly-A 構造を持つ、COCH 全長 mRNA の cDNA のクローニングを行った。さらに内耳の RNA 中に COCH 遺伝子の発現を制御するノンコーディング RNA が含まれているかどうかについても解析した。

(2) 培養細胞における COCH 遺伝子発現
マウスを用いた研究から内耳における COCH 遺伝子産物である cochlin は、蝸牛螺旋靭帯やらせん板、蝸牛の血管周皮細胞、さらに前庭の膨大部壁や感覚上皮の下にある繊維芽細胞などの内耳の間質にある繊維芽細胞発現し、神経節や有毛細胞などの感覚・神経細胞では発現は見られないことが判っている。これらのことからまずは繊維芽細胞を用いて cochlin の発現を anti-cochlin 抗体を用いて調べた。しかし、明確な発現はなくその他の代表的な株化細胞でも確認したが、結果として、明確に cochlin を発現している細胞は見つけれなかったため、発現ベクターを培養細胞に導入し cochlin 発現株の作製を試みた。

4. 研究成果

今回の研究は、成人発症型の遺伝性難聴である DNFA9 の原因蛋白の発現を抑制し、難聴の発症を防ぐことが出来るかどうかを確認する目的で開始した。

(1) ヒト内耳 mRNA の解析

内耳 total RNA を用いて、COCH mRNA の同定を行ったところ、ヒト cochlin では、完全長の cDNA と考えられる分子(約 2.0 Kbp)以外に2本の fragment (500bp, 550bp)が検出され、これらの塩基配列を決定した。しか

しこれらが short form mRNA として転写されていたと仮定すると、ストップコドンのない不完全な ORF をコードしており、いずれのクローンも PCR アーティファクトによる偽 cDNA と考えられた。531-536 番目の残基には AATAAA という poly-A 付加シグナルのコンセンサス配列が含まれていることから、生体内で誤ってスプライシングされている分子を PCR で増幅することによって高感度に検出している可能性も考えられた。この結果からは、ヒト内耳での mRNA isoform の存在を否定することはできないが、ヒトの cochlin 発現抑制では完全長 (2.0kbp) の mRNA を対象に siRNA 条件の検討が妥当と考えられた。

さらに、実際にヒト内耳に含まれるノンコーディング RNA の中に Cochlin 発現を制御する小分子の RNA (miRNA)があるかどうかについて、マイクロアレイ解析およびデータベース検索を行った。COCH 遺伝子を制御すると考えられる miRNA はデータベースには登録されておらず、また配列上で siRNA として利用できそうな COCH 遺伝子の発現を抑制する可能性のあるノンコーディング RNA は確認できなかった。この研究の内容については後述した論文にまとめ報告している。

(2) 培養細胞での COCH 遺伝子発現

商業ベースで内耳由来の繊維芽細胞は存在しなかったため、皮膚の正常繊維芽細胞で cochlin が発現している細胞を探索したが見つかることはできなかった。一方で、マウスの内耳組織から繊維芽細胞の単離を試みたが、初代培養から継代し分離することはできなかった。そこでがん細胞から分離された株化細胞 (U2OS) や形質転換によって不死化された細胞 (COS 細胞) を用いて、発現ベクターによる COCH mRNA の強制発現系の構築を試みた。予備実験として、これらの細胞において cochlin の発現を調べてみたが、anti-cochlin 抗体で検出できるような発現は見られなかった。そこでまず、強力な CMV プロモーター下に COCH 遺伝子の全長 mRNA を導入した発現ベクターを構築した。このベクターをリポフュージョン法により細胞に導入して cochlin の一過性発現のプロファイルを調べた。発現のコントロールとして、cochlin と同じ分泌タンパク質であるアルカリホスファターゼの CMV プロモーター発現ベクターを用いた。コントロールタンパク質と比べ、特に U2OS 細胞では cochlin の発現量は非常に少量であった。これまでの研究で免疫組織染色の結果から cochlin が耳小骨 (アブミ骨、ツチ骨、キヌタ骨) の周辺の結合組織にわずかに発現しているとの報告もあるが、蝸牛や前庭の骨組織での発現は確認されていない。U2OS 細胞は骨肉腫由来の接着性の株化細胞であり、骨由来細胞では cochlin タンパク質の安定性に問題があるといった理由で、発現が見られない可能性も考

えられた。一方で CMV プロモーターの発現が最適化されている COS 細胞では cochlin の発現が確認できた。ただ、コントロールでは発現がトランスフェクション後 48 時間まで発現量が増加するのに比べ、cochlin の発現量が最大となる時間は、トランスフェクションから 24 時間以内であることがわかった。cochlin は分泌後、細胞外マトリックスのコラーゲンに結合することが示唆されている。COS 細胞のコラーゲンには結合性が低いことも考えられたので、培養上清の cochlin を調べたが、培養上清には発現は認められなかった。cochlin の発現抑制実験には cochlin の安定発現株が必要となるため、COS 細胞を使って作製を試みた。cochlin 発現ベクターに組み込んだ薬剤耐性遺伝子 Bsd (プラスチジン耐性) を指標に、cochlin 安定発現細胞株のクローニングを目指した。薬剤耐性となった細胞のシングルセルクローニングを行ったところ、PCR でポジティブとなる株について cochlin 抗体でタンパク質の発現を確認したが、発現量は非常に少ないか検出限界以下であり、cochlin の安定発現株を得ることはできなかった。

2018 年の報告で、皮膚の創傷感染症を繰り返す collagen VII 欠損マウスにおいて、脾臓の自然免疫賦活化タンパク質因子に cochlin が含まれ、cochlin と collagen VII が複合体を形成しているとの報告があった。この cochlin-collagen VII complex がマウスの持つ自然免疫を刺激することで皮膚の創傷感染における細菌コロニー形成を抑制するとされている。ヒトの cochlin は内耳にのみ非常に多く発現し、脾臓で発現が多いとの報告はない。また、エライザによる cochlin の解析では血液中の発現量は検出限界以下であること、内耳における cochlin は collagen type II と同じ部位に局在すると報告されている。ヒトとマウスでは cochlin の発現様式が異なるが、cochlin の安定発現には、細胞によって発現するコラーゲンの種類を限定することが重要であると考えられる。今後はこの点を考慮にいれ cochlin の安定発現株の作製を試みる必要がある。

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 1 件)

Sekine K, Matsumura T, Takizawa T, Kimura Y, Saito S, Shiiba K, Shindo S, Okubo K, Ikezono T.

Expression Profiling of MicroRNAs in the Inner Ear of Elderly People by Real-Time PCR Quantification.

Audiol Neurootol. 査読有 22(3): 2017; 135-145. doi: 10.1159/000479724.

[学会発表](計 0 件)

〔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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

松村智裕 (MATSUMURA Tomohiro)
日本医科大学, 医学部, 助教
研究者番号：20297930

池園 哲郎 (IKEZONO Tetsuo)
埼玉医科大学, 医学部, 教授
研究者番号：80277491

(4) 研究協力者

()