

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592501

研究課題名(和文)内耳に発現するmiRNAの分子構造と生理機能の解析

研究課題名(英文)Analysis of miRNAs expression in the mouse inner ear

研究代表者

土井 勝美(DOI, Katsumi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：40243224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：マウス内耳全体、コルチ器、ラセン神経節、血管条・外側壁、前庭系等の亜部位に分けて、組織よりtRNAを抽出し、mirVana miRNA isolation kit等を用いて、内耳miRNAを抽出・精製し、内耳に発現するmiRNAの遺伝子動態を網羅的に解析した。

これまでの欧米からの報告と一致して、マウス内耳の発生、分化、成熟の各段階において重要な役割を果たすmiR-96、miR-182、miR-183の発現を確認した。マイクロアレイ解析から胎生マウス内耳に発現するmiRNA(蝸牛で100種類以上のmiRNA)を同定した。

研究成果の概要(英文)：TRNA was separately extracted from each part of mouse inner ear, then miRNAs from organ of Corti, stria vascularis, lateral wall of cochlea, and vestibule system were analyzed. MiR-96, miR-182, and miR-183 were most abundant miRNAs in the mouse inner ear.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科

キーワード：miRNA 内耳 蝸牛 前庭

## 1. 研究開始当初の背景

塩基数 17-22 個の小さな microRNA は、標的とする多数の mRNAs を直接修飾することにより、ヒトを含めた脊椎動物の多様な細胞内において多くの遺伝子発現を調整していることが明らかになった(Stefani G & Slack FJ, Nature Review 2008)。現在、ヒトでは約 500 種類の miRNA が同定され、すでに miRNA のデータベース構築(miRanda 等)も開始されている。miRNA は細胞・組織に特異的な発現を示し、それぞれの細胞・組織・器官の発生、分化、成熟、そしてその機能維持に重要な役割を果たすことが判明した。例えば、神経系に特異的に発現する miRNA については解析が進んでおり、神経系の発生(miR-196、miR-10、miR-309/3/286/4/5/6 cluster 等)、神経細胞の分化(miR-273、miR-500、miR-124、miR-315 等)、神経細胞死(miR-2 等)、神経細胞の成熟(miR-134、miR-132 等)について miRNA の役割が報告されている。また、いくつかのヒト神経系疾患の発症に関与する miRNA の解析も行われ、fragile-X 症候群と miR-1 および miR-206 の関連、Tourette 症候群と miR-189 との関連が報告された(Kosik KS, Nature Review 2006)。神経系疾患以外でも、ヒトの発癌、血液疾患の発症、膵臓機能に関連する miRNA がいくつか同定され、siRNA 導入や遺伝子・再生治療により miRNA の機能を生体外部より修飾することにより、疾患に対する新しい治療法の開発が進められている(Lu J et al., Nature 2005)。

内耳(蝸牛および前庭系)に発現する miRNA の研究は、欧米において今まさに開始されたばかりであるが、すでにいくつかの報告がなされた。マウス内耳の発生、分化、成熟の各段階において miR-96、miR-182、miR-183 が重要な役割を果たすことを明らかにした研究(Sacheli R et al., Gene Expression Patterns 2009)、マイクロアレイ解析(206 種類の miRNA)から胎生マウス内耳に発現する miRNA(蝸牛で 105 種類の miRNA、前庭系で 114 種類の miRNA)を同定し、その内の miR-15a の標的遺伝子が、有毛細胞の分化および機能維持に必須の Slc12a2、Cldn12、Bdnf であることを示した研究(Friedman LM et al., PNAS 2009)、さらに miR-96 の遺伝子変異による難聴モデルマウスの作製(Lewis MA et al., Nature Genetics)そして実際に遺伝性難聴家系におけるヒト難聴発症因子としての miR-96 遺伝子変異の

同定(Mencia A et al., Nature Genetics)等、本年度(2009 年)に内耳 miRNA に関する最新の研究成果が相次いで報告された。

## 2. 研究の目的

塩基数 17-22 個の小さな microRNA(以下、miRNA と略す)は、標的とする多数の mRNAs を直接修飾することにより、多様な細胞内において多くの遺伝子発現を調整していることが明らかになった。現在、ヒトでは約 500 種類の miRNA が同定され、miRNA のデータベース構築(miRanda 等)も開始されている。miRNA は細胞・組織に特異的な発現を示し、それぞれの細胞・組織・器官の発生、分化、成熟、そしてその機能維持に重要な役割を果たしている。ヒトおよびマウス内耳(蝸牛および前庭系)に特異的に発現する miRNA を同定し、それらの miRNA が標的とする遺伝子・mRNA の内耳における局在や機能を解析し、内耳に発現する miRNA の役割を明らかにすることで、難聴・めまい疾患の発症機序について新たな知見を得ることを目的とする。

内耳に特異的に発現する多数の miRNA を同定し、それらの miRNA が標的とする遺伝子・mRNA の内耳における局在や機能を解析し、内耳に発現する miRNA の役割を明らかにすることが、難聴・めまい疾患の発症機序について新たな知見を得るために、現在最も重要な最優先の研究課題になりつつある。同時に、内耳に発現する miRNA の機能を理解することで、miRNA の標的となる遺伝子・mRNA の発現を生体外部から内耳へ導入する siRNA 等により制御して、難聴・めまい疾患に対する全く新しい治療法の開発が期待できる。

## 3. 研究の方法

正常マウス内耳(蝸牛および前庭系)に発現する miRNA を、miRNA ジーンチップを用いたマイクロアレイ解析により同定し、それらの miRNA の内耳での局在を確認し、miRNA データベース(miRanda 等)上で、内耳 miRNA の標的となる遺伝子・mRNA を決定する。siRNA 導入による内耳 miRNA の機能修飾が聴覚・前庭機能へどのように影響するのか解析して、内耳 miRNA の機能を解明する。次に、遺伝子変異難聴・めまいマウスや聴覚老化マウスの内耳 miRNA の発現動態を同様の手法で解析して、難聴・めまい疾患の発症に関連する miRNA を同定し、さらに、当科で保有する難聴・めまい疾患患者のゲノム遺伝子を用いて、それら miRNA の遺伝子変異と遺伝的パリエーションの有無について臨床遺伝学的解析を行う。

1) 正常マウスおよび難聴・めまい疾患モデルマウス内耳から miRNA の抽出

マウス内耳全体、あるいはコルチ器、ラセ

ン神経節、血管条・外側壁、前庭系等の亜部位に分けて、組織より tRNA を抽出し、mirVana miRNA isolation kit 等を用いて、内耳 miRNA を抽出、精製する。バイオアナライザー・スペクトロフォトメーターを用いて miRNA の質的・量的解析を行った上で、次のマイクロアレイ解析に進む。

#### 2) 内耳に発現する miRNA の DNA マイクロアレイ解析

マウス内耳から抽出された mRNA を、まずは mirVana miRNA labeling kit を用いてラベルし、その後、mirVana miRNA probe set (Ambion) を収載したマイクロアレイ・チップとハイブリダイゼーションさせることで、内耳に発現する miRNA の遺伝子動態を網羅的に解析できる。マイクロアレイの結果は、GenePix biochip reader により読み込んだハイブリ生画像データを Digital Genome System Suite、GeneSpring 等により解析することで得られる。バックグラウンドと比較して 2 倍以上の遺伝子発現量を示すものを”内耳に発現する miRNA”として同定する。

#### 3) 内耳 miRNA の遺伝子動態の RT-PCR 解析

内耳の発生、分化、成熟、および機能維持のそれぞれの段階における内耳 miRNA の発現量を、mirVana qRT-PCR miRNA primer sets (Ambion) を用いて RT-PCR 法で解析することにより、それぞれの miRNA がどの段階で最も重要な役割を果たしているのかを解析する。胎生期、生直後、生後 2 週、生後 1 ヶ月～生後 1 年、さらに高齢期のマウス内耳より、1) の方法によりそれぞれ miRNA を抽出、精製した後、2) の方法により各段階での miRNA の発現量を比較検討する。

#### 4) 内耳 miRNA の内耳発局在についての形態学的解析

3) のステップまで抽出された内耳 miRNA から、まず DNA probe よりもさらに組織親和性の高い locked nucleic acid (LNA) probe を作製する。市販の miRCURY LNA probes の使用も可能である。これらの LNA probe をさらに digoxigenin (DIG) でラベルすることで、形態学的研究で使用可能な内耳 miRNA の DIG-labeled mercury LNA probes を準備する。それぞれの miRNA が最も機能する内耳組織を whole-mount で用いて、上記の DIG LNA probes により ISH 法を施行して、それぞれの miRNA の内耳での局在を明らかにする。

#### 4. 研究成果

マウス内耳全体、コルチ器、ラセン神経節、血管条・外側壁、前庭系等の亜部位に分けて、組織より tRNA を抽出し、mirVana miRNA isolation kit 等を用いて、内耳 miRNA を抽出・精製し、内耳に発現する miRNA の遺伝子動態を網羅的に解析した。

これまでの欧米からの報告と一致して、マウス内耳の発生、分化、成熟の各段階において重要な役割を果たす miR-96、miR-182、miR-183 の発現を確認した。又、マイクロアレイ解析から胎生マウス内耳に発現する機能未知の miRNA (蝸牛で 100 種類以上の miRNA) を多数同定した。

#### 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 31 件)

1. 土井勝美: 急性感音難聴. 今日の治療指針 2013 年度版 山口 徹・北原光夫・福井次矢(編), pp1291-1292, 医学書院, 東京, 2013.(査読なし)
2. 日比野浩, 任 書晃, 村上慎吾, 土井勝美, 鈴木敏弘, 久 育男, 倉智嘉久: 内耳内リンパ液の特殊電位環境の成立機構の理解. 日本耳鼻咽喉科学会会報 116: 60-68, 2013.(査読あり)
3. 土井勝美: 【プロに学ぶ手術所見の記載法】人工内耳手術. JOHNS 29: 691-696, 2013.(査読なし)
4. Ohta Y, Kawashima T, Hasegawa T, Uno A, Imai T, Morihana T, Higashi-Shingai K, Kamakura T, Suwa K, Hanamoto M, Michiba T, Doi K, Inohara H: A case of cholesteatoma occurring after cochlear implantation. In Cholesteatoma and ear surgery an update Takahashi-H (ed), pp377-380, Kugler Publications, Amsterdam, The Netherlands, 2013.(査読なし)
5. Saito K, Isono M, Miyashita M, Sato M, Doi K: Post-operative long-term hearing results in patients who underwent ossiculoplasties. In Cholesteatoma and ear surgery an update Takahashi-H (ed), pp325-327, Kugler Publications, Amsterdam, The Netherlands, 2013.(査読なし)
6. Doi K, Sato M, Miyashita M, Saito K, Isono M, Terao K, Osaki Y, Morihana T, Ohta Y: Congenital cholesteatoma of the middle ear: a

- report of 54 cases. In Cholesteatoma and ear surgery an update Takahashi-H (ed), pp143-145, Kugler Publications, Amsterdam, The Netherlands, 2013. (査読あり)
- 7 . Doi K, Sato M, Miyashita M, Saito K, Isono M, Terao K, Sanada A, Kato A: Surgical management of petrous apex cholesteatoma: our experience of 15 cases. In Cholesteatoma and ear surgery an update Takahashi-H (ed), pp139-141, Kugler Publications, Amsterdam, The Netherlands, 2013. (査読なし)
- 8 . Doi K, Sato M, Miyashita M, Saito K, Isono M, Terao K, Koizuka I, Ohta Y: Stapes surgery and cochlear implant surgery for severe otosclerosis. In Cholesteatoma and ear surgery an update Takahashi-H (ed), pp111-113, Kugler Publications, Amsterdam, The Netherlands, 2013. (査読なし)
- 9 . Doi K, Fukusumi T, Osaki Y, Yasui T, Hasegawa T, Morihana T, Ohta Y: Evaluation of middle ear pneumatization after planned two-staged tympanoplasty for cholesteatoma: its correlations with hearing results and recurrence rates. In Cholesteatoma and ear surgery an update Takahashi-H (ed), pp59-61, Kugler Publications, Amsterdam, Publications, Amsterdam, The Netherlands, 2013. (査読なし)
- 10 . Doi K: Cholesteatoma growth and proliferation: expression of HGF (Hepatocyte Growth Factor) and its high-affinity receptor C-MET. In Cholesteatoma and ear surgery an update Takahashi-H (ed), pp29-31, Kugler Publications, Amsterdam, The Netherlands, 2013. (査読なし)
- 11 . 土井勝美: 突発性難聴. 今日の治療指針 2012 年度版, 山口徹・北原光夫・福井次矢編, 医学書院, 東京, pp 1255, 2012. (査読なし)
- 12 . 土井勝美: メニエール病の外科治療. ENT 臨床フロンティア「めまいを見分ける治療する」内藤 泰編, pp314-322, 中山書局, 東京, 2012. (査読なし)
- 13 . 土井勝美: 急性感音難聴の治療戦略-メニエール病. JOHNS 28: 767-771, 2012. (査読なし)
- 14 . 土井勝美: 突発性難聴とめまい. Clinical Neuroscience 30: 77-78, 2012. (査読なし)
- 15 . 土井勝美: 反復するめまいへの対応: メニエール病. ENTONI 136: 1-7, 2011 (査読なし)
- 16 . 土井勝美: 私の処方箋: 良性発作性頭位めまい症. JOHNS 27: 1328-1330, 2011. (査読なし)
- 17 . K Terao, S Cureoglu, S Schachern, N Morita, S Nomiya, AF Deroee, K Doi, K Mori, K Murata: Cochlear changes in presbycusis with tinnitus. Am J Otolaryngol HNS 32: 215-220, 2011. (査読あり)
- 18 . K Terao, S Cureoglu, S Schachern, MM Paparella, N Morita, T Sato, K Mori, K Murata, K Doi: Marrow-Middle ear connections: a potential cause of otogenic meningitis. Otol Neurotol 32: 77-80, 2011. (査読あり)
- 19 . 土井勝美: めまいの update-めまいの急性期治療と炭酸水素ナトリウム. クリニシアン 57: 283-287, 2010. (査読なし)
- 20 . 土井勝美: 人工内耳医療の過去・現在・未来. 耳鼻臨床 103: 973-982, 2010. (査読あり)
- 21 . 土井勝美: 小児人工内耳の言語獲得における EBM. EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍の治療 2010-2011 中外医学社. 東京. pp179-182. 2010. (査読なし)
- 22 . 土井勝美: 小児人工内耳医療の将来展望. 耳展 53: 400-407, 2010. (査読あり)
- 23 . 土井勝美: 外リンパ瘻. 今日の治療指針 2010 年度版, 山口徹・北原光夫・福井次矢編, 医学書院, 東京, pp 1203-1204, 2010. (査読なし)
- 24 . K. Doi, Y. Osaki, T.

- Kawashima, K. Ohata, T. Yoshinami, K. Suwa, H. Inohara, S. Hio, T. Sato, H. Nishimura: Incidence of revision cochlear implantation in both children and adults. Proceedings of the 7th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Sciences, Medimond, Bologna, Italy, pp111-115, 2010 (査読なし)
- 25 . S. Hio, K. Doi, Y. Osaki, K. Ohata, K. Suwa, M. Hanamoto, H. Inohara, T. Hasegawa: Benefits of cochlear implantation in elderly patients. Proceedings of the 7th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Sciences, Medimond, Bologna, Italy, pp117-120, 2010. (査読なし)
- 26 . Y. Osaki, K. Doi, C. Masumura, K. Suwa, M. Hanamoto, H. Inohara: Activation of the auditory cortex in a child with a cochlear implant: an optical topography study. Proceedings of the 7th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implants and Related Sciences, Medimond, Bologna, Italy, pp175-178, 2010. (査読なし)
- 27 . H. Shojaku, Y. Watanabe, N. Takeda, T. Ikezono, M. Takahashi, A. Kakigi, J. Ito, K. Doi, M. Suzuki, M. Takumida, K. Takahashi, H. Yamashita, I. Koizuka, S. Usami, M. Aoki, H. Naganuma: Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops in Japan: A nationwide survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. Acta Otolaryngol 130: 1135-40, 2010. (査読あり)
- 28 . K. Terao, S. Cureoglu, PA. Schachern, MM. Paparella, N. Morita, T. Sato, K. Mori, K. Murata, K. Doi: Marrow-middle ear connections: a potential cause of otogenic meningitis. Otol Neurotol 32: 77-80, 2010.

(査読なし)

- 29 . N. Hikita-Watanabe, T. Kitahara, A. Horii, T. Kawashima, K. Doi, SI. Okumura: Tinnitus as a prognostic factor of sudden deafness. Acta Otolaryngol 130: 79-83, 2010. (査読なし)
- 30 . K. Kizawa, T. Kitahara, A. Horii, C. Maekawa, T. Kuramasu, T. Kawashima, S. Nishiike, K. Doi, H. Inohara: Behavioral assessment and identification of a molecular marker in a salicylate-induced tinnitus in rats. Neuroscience 165: 1323-32, 2010. (査読あり)
- 31 . C Maekawa, T. Kitahara, K. Kizawa, S. Okazaki, T. Kamakura, A. Horii, T. Imai, K. Doi, H. Inohara, H. Kiyama: Expression and translocation of aquaporin-2 in the endolymphatic sac in patients with Meniere's disease. J Neuroendocrinol 22: 1157-1164, 2010. (査読あり)

[学会発表](計 21 件)

- 1 . DoiK: ilateral VSB implantation: the first experience. (New Trends in Hearing Implant Science 2013, October 26-27, 2013, Hakuba, Japan)
- 2 . 土井勝美, 佐藤満雄, 小林孝光, 宮下美恵, 斎藤和也, 磯野道夫: 正円窓経由の人工内耳手術-CT画像による正円窓窩評価. 第23回日本耳科学会(平成25年11月24日-26日, 宮崎市)
- 3 . 土井勝美, 佐藤満雄, 小林孝光, 宮下美恵, 斎藤和也: 小児人工内耳手術-正円窓経由の電極挿入 第8回日本小児耳鼻咽喉科学会(平成25年6月20日-21日, 前橋市)
- 4 . 土井勝美, 佐藤満雄, 小林孝光, 宮下美恵, 斎藤和也, 磯野道夫, 寺尾恭一: 聴力保存を目指した人工内耳手術-正円窓膜経由の電極挿入. 第22回日本耳科学会(平成24年10月6日, 名古屋)
- 5 . 土井勝美, 佐藤満雄, 宮下美恵, 斎藤和也, 磯野道夫, 寺尾恭一: 正円窓経由の電極挿入による人工内耳手術. 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(平成24年5月11日, 新潟)

- 6 . Sato M, Miyashita M, Saito K, Terao K, Doi K: Expression of HERG and ERG channels in the rat cochlea. IEB 2012 (September 29-October 2, 2012, Tubingen, Germany)
- 7 . Doi K, Sato M, Miyashita M, Saito K, Terao K: Expressions of HGF and its high-affinity receptor C-MET in the early developing rat cochlea. IEB 2012 (September 29-October 2, 2012, Tubingen, Germany)
- 8 . Doi K, Sato M, Miyashita M, Saito K, Isono M, Terao K, Osaki Y, Morihana T, Ohta Y: Congenital cholesteatoma of the middle ear: a report of 54 cases. Cholesteatoma 2012 (June 4-6, 2012, Nagasaki, Japan)
- 9 . Doi K, Sato M, Miyashita M, Saito K, Isono M, Terao K, Sanada A, Kato A: Surgical management of petrous apex cholesteatoma: our experience of 15 cases. Cholesteatoma 2012 (June 4-6, 2012, Nagasaki, Japan)
- 1 0 . Doi K: Cholesteatoma growth and proliferation: Expression of HGF (Hepatocyte Growth Factor) and its high-affinity receptor C-MET. Cholesteatoma 2012 (June 4-6, 2012, Nagasaki, Japan)
- 1 1 . Doi K, Sato M, Miyashita M, Saito K, Isono M, Terao K, Koizuka I, Ohta Y: Stapes surgery and cochlear implant surgery for severe otosclerosis. Cholesteatoma 2012 (June 4-6, 2012, Nagasaki, Japan)
- 1 2 . Doi K, Fukusumi T, Osaki Y, Yasui, Hasegawa T, Morihana T, Ohta Y: Evaluation of middle ear pneumatization after planned two-staged tympanoplasty for cholesteatoma: its correlations with hearing results and recurrence rates. Cholesteatoma 2012 (June 4-6, 2012, Nagasaki, Japan)
- 1 3 . 土井勝美: 人工聴覚器の将来: 人工中耳-BAHA と VSB. 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会 (2011. 5.19-21 京都)
- 1 4 . K. Doi: Binaural advantage in CI patients. APSCI2012 (2011. 10.26-28 Korea)
- 1 5 . Ohta, K. Doi, T. Hasegawa, T. Kawashima, K. Suwa, M. Hanamoto, H.

- Nishimura, Y. Osaki, H. Inohara: Cochlear implantation in patients with middle ear disease. APSCI2012 (2011. 10.26-28 Korea)
- 1 6 . M. Miyashita, M. Sato, K. Saito, K. Terao, K. Doi: Successful cochlear implantation in the case of eosinophilic otitis media with bilateral, progressive and profound sensorineural hearing loss. APSCI2012 (2011. 10.26-28 Korea)
- 1 7 . M. Sato, M. Miyashita, K. Saito, K. Terao, K. Doi: Scala vestibuli cochlear implantation in the case of cochlear incomplete partition with CSF gusher and persistent bleeding via cochleostomy opening of scala tympani. APSCI2012 (2011. 10.26-28 Korea)
- 1 8 . K. Doi, M. Miyashita, M. Sato, K. Saito, K. Terao, K. Suwa, H. Inohara, Y. Ohta, T. Hasegawa, T. Morihana: Residual hearing after ordinary cochlear implant surgery with scala tympani cochleostomy and full-electrodes insertion. APSCI2012 (2011. 10.26-28 Korea)
- 1 9 . 土井勝美, 宮下美恵, 佐藤満雄, 斎藤和也, 寺尾恭一, 磯野道夫, 長谷川太郎, 太田有美, 宇野敦彦, 猪原秀典, 諏訪圭子: 人工内耳症例の普通小学校への進学率. 第 21 回日本聴覚医学会 (2011. 11.24-26 沖縄)
- 2 0 . 土井勝美, 村本大輔, 長谷川太郎, 太田有美, 諏訪圭子, 大崎康宏, 藤本揚子: 人工内耳手術前後の骨導閾値の変化. 第 55 回日本聴覚医学会 (2010. 11.10-12 奈良)
- 2 1 . 土井勝美, 佐藤満雄, 藤原良平, 斎藤和也, 村本大輔, 寺尾恭一, 磯野道夫, 長谷川太郎, 太田有美, 諏訪圭子, 猪原秀典: 人工内耳手術前後の骨導閾値変化. 第 20 回日本耳科学会 (2010. 10.6-9 愛

〔図書〕(計 0 件)

- 6 . 研究組織
  - (1)研究代表者  
土井 勝美 (DOI katsumi)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 40243224
  - (2)研究分担者
  - (3)連携研究者