

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007-2008 年度
 課題番号：19791251
 研究課題名 (和文) 転写因子 Pou3f3 の内耳発達における役割とエピジェネティック制御の解明
 研究課題名 (英文) Study of transcription factor Pou3f3 in developing mammalian inner ear and its regulation by epigenetic pathway
 研究代表者
 務台 英樹 (Mutai Hideki)
 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター聴覚平衡覚研究部 研究員
 研究者番号：60415891

研究成果の概要：難聴の再生医療法の開発には、内耳細胞の分化、聴力の発現と維持の分子機構の解明が不可欠である。近年、遺伝子発現調節機構の一つとして、エピジェネティック制御機構の重要性が明らかになってきた。務台は生後発達期の聴覚上皮で、エピジェネティック制御機構が存在することを証明し、制御下にある転写因子 Pou3f3 を同定し、そのメチル化様式を明らかにした。さらに、遺伝子欠損動物を用いた機能解析をおこなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

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：耳鼻咽喉学、発生医学

1. 研究開始当初の背景

哺乳類はその聴力発現時期に、蝸牛各種細胞の分化成熟と、それにともなう遺伝子発現の劇的変化をおこし、その発現と分布は長期間維持される。齧歯類においては、聴力発現時期は生後 12-13 日 (P12-13) である。この時期に聴覚上皮の感覚細胞である有毛細胞の再生能は失われる。

一方、遺伝子の長期から永続的発現抑制機構として、ゲノム DNA のメチル化を介したエピジェネティック制御機構が知られていた。研究代表者は、前駆細胞が細胞増殖・分化能を失い、有毛細胞が音刺激に対する応答性を獲得するこの時期に、エピジェネティック制御

機構が関与していると考え、その証明を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、聴覚上皮発達にエピジェネティック制御機構が関与しているとの仮説を証明することを目的とした。エピジェネティック制御機構には、ゲノム DNA のメチル化、ヒストンタンパク質の修飾、および低分子 RNA との相互作用といった経路が存在するが、中でも聴覚上皮のような少量の組織からでも検出が容易であり、他分野で研究が進展している DNA メチル化に焦点を絞った。本研究では胎生期の聴覚発達ではなく、聴覚発現前

後におけるメチル化分布に差があるゲノム領域を同定することを研究の出発点とした。遺伝子発現の細胞特異的、長期制御機構を明らかにすることは、将来、聴覚障害に対する再生治療法を開発する上で重要な知見となりうる。

3. 研究の方法

(1)ゲノムDNAは、近交系ラット Wistar-Imamichi 聴覚上皮より抽出した。

(2)エピジェネティック制御下の遺伝子としての Pou3f3 領域の同定には、改変 AIMS 法 (amplification of inter-methylated sites) 法、2002 NucAcidRes 7: e28)を用いた。

(3)Pou3f3 ゲノムのメチル化修飾割合の分析には、バイサルファイト法および定量的メチル化特異的 PCR (qMSP)を用い、複数の転写調節候補領域について検討した。

(4)転写量解析には定量的 RT-PCR を用いた。

(5)免疫組織学的解析には、内耳凍結切片をもちいた蛍光免疫染色をおこない、レーザー共焦点顕微鏡を用いて観察した。

(6)Pou3f3、および Pou3f2/3f3 遺伝子欠損マウスは理化学研究所：杉谷・野田博士より提供を受けた。

(6)内耳有毛細胞前駆細胞培養は既報(2003 NatMed 9: 1293)に従った。

4. 研究成果

(1)研究代表者は、改変AIMS法を用いて生後1日(P1)とP14ラット聴覚上皮ゲノムDNAを比較し、Pou3f3ゲノムの3'下流の領域が、生後発達期特異的にメチル化修飾をうけることを発見した(図1)。エピジェネティック制御機構の哺乳類内耳発達への関与を示した報告は世界初である。

(2)定量的PCRおよびバイサルファイト法により、Pou3f3ゲノム上のCpGアイランドが聴覚発現前後において有意な高メチル化修飾をうけること、同時期に転写量が有意に低下することを明らかにした。また近傍のノンコーディング(nc)RNAの同定とその転写量の低下との関連についても、詳細な解析をおこなった。さらに、メチル化阻害剤の生後in vivo投与によりPou3f3近傍CpGアイランドのメチル化が抑制され、Pou3f3および近傍ncRNAの発現抑制が解除されるデータも得ている。

(3)また、免疫染色法により、Pou3f3が内耳聴覚・平衡覚上皮の支持細胞、有毛細胞前駆細胞および線維細胞に発現し、有毛細胞および神経節細胞には発現しないことを見出した(図2)。

(4)Pou3f3欠損マウス胎生19日における蝸牛の形態、および細胞マーカーの分布が正常動物と顕著な変化がみられず、また感覚細胞前駆細胞の増殖能、分化能についても変化がないことから、Pou3f3は胎生期の蝸牛上皮の細胞増殖・分化よりも、生後の機能維持に重要な役割をもつと考えられた。Pou3f3/3f2両遺伝子の欠損でも顕著な形態の変化は観察されなかった。

(5)さらに、聴力発現前後にPou3f3ゲノムがメチル化をうけることから、新規DNAメチル化酵素であるDnmt3a, 3bの蝸牛における経時的発現と蝸牛内分布をRT-PCRおよび免疫組織学的手法により明らかにした。Dnmt3aは聴覚発現期に有毛細胞などPou3f3陰性の細胞で発現が上昇し、Pou3f3のゲノムDNAメチル化には、Dnmt3aが関与している可能性が高いと考えられた。また、Dnmt3bは成熟個体の聴覚上皮でも発現しており、聴力維持機構との関連が疑われた。

(6)本研究は、聴覚発現前後の、生後発達期におけるエピジェネティクス制御機構の存在を証明することに成功し、さらに制御下遺伝子の一つであるPou3f3の役割を、ゲノムメチル化による転写調節機構解析から遺伝子欠損動物の解析までおこなうことに成功した。

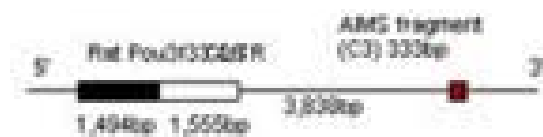


図1：Pou3f3のゲノム地図。タンパク質コード領域を黒、3' -UTRを白、AIMS法によって明らかになった、聴覚発現期までに高メチル化されるAIMS領域を赤で示す。なお、ラット Pou3f3プロモーター領域の配列決定も本研究の成果の一つである。

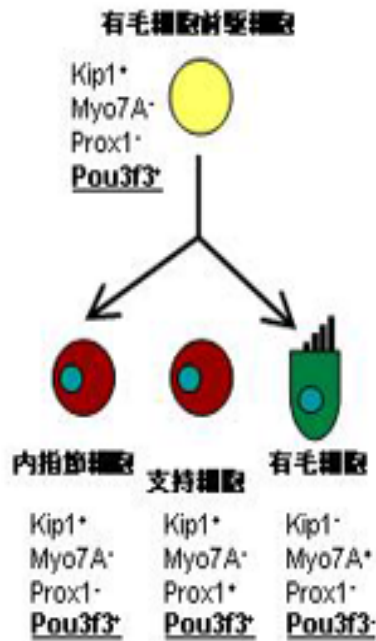


図2：本研究により明らかになったPou3f3の聴覚上皮における発現分布。

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 Hideki Mutai, Reiko Nagashima, Yoshinobu Sugitani, Tetsuo Noda, Masato Fujii, Tatsuo Matsunaga. Expression of *Pou3f3/Brn-1* and its genomic methylation in developing auditory epithelium • *Developmental Neurobiology* • in press. 2009 査読有

2 Hideki Mutai, Reiko Nagashima, Masato Fujii, Tatsuo Matsunaga. Mitotic activity and specification of fibrocyte subtypes in the developing rat cochlear lateral wall • *Neuroscience* • in press. 2009 査読有

3 松永達雄、務台英樹 Auditory neuropathyの遺伝子研究の動向 *Monthly Book ENTONI*. 93:11-16. 2008 査読無

4 松永達雄、幸池浩子、務台英樹 難聴の遺伝子検査 *神経内科*. 68: 415-421. 2008 査読無

[学会発表] (計8件)

1 藤井正人、務台英樹 聴覚のエイジングと全身疾患-基礎的検討と臨床研究 2009年3月13日 第4回感覚器シンポジウム 東京

2 Hideki Mutai, Masato Fujii, Tatsuo Matsunaga Genomic DNA of *Pou3f3/Brn-1* is highly methylated in the CpG island at the 3' -flanking region in the developing auditory epithelium. 2009年2月15-20日 32nd meeting, Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, MA, USA

3 瀧口洋一郎、孫コウイ、務台英樹、幸池浩子、水足邦雄、藤井正人、小川郁、松永達雄 急性内耳エネルギー不全による蝸牛外側壁線維細胞の可塑的变化 2008年10月16-18日 第18回日本耳科学会 神戸

4 務台英樹、藤井正人、松永達雄 生後発達の聴覚上皮におけるエピジェネティック遺伝子制御機構 2008年10月16-18日 第18回日本耳科学会 神戸

5 松永達雄、加我君孝、務台英樹、孫コウイ、守本倫子、泰地秀信、竹腰英樹、藤井正人、井上泰宏、小川郁 小児難聴に対する系統的遺伝子解析の第1次解析の検討 2008年10月2-3日 第53回日本聴覚医学会

6 Hideki Mutai, Masato Fujii, Tatsuo Matsunaga Expression of *Pou3f3/Brn1* and its possible epigenetic regulation in the developing mammalian cochlea. 2008年2月14-19日 31st meeting, Association for Research in Otolaryngology, Phoenix, AZ, USA

7 務台英樹、藤井正人、松永達雄 *Pou3f3/Brn1* の胎生内耳における発現分布と欠損マウスを用いた解析 2007年10月18-20日 第17回日本耳科学会 福岡

8 松永達雄、幸池浩子、務台英樹、孫コウイ、藤井正人、守本倫子、泰地秀信、宇佐美真一、佐藤美奈子、小川郁、加我君孝 原因不明の日本人難聴者における 12S ribosomalRNA (MTRNR1) 遺伝子変異解析 2007年10月18-20日 第17回日本耳科学会 福岡

[図書] (計1件)

松永達雄、孫コウイ、務台英樹. 病因と遺伝子 in 小耳症/外耳道閉鎖症に対する機能と形態の再建. 朝戸裕貴、加我君孝編 金原出版. 11-16. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

務台英樹 (代表)

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター・聴覚平衡覚研究部・研究員 研究者番号: 60415891

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：