

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09845

研究課題名(和文)急性感音難聴の病態と治療における内耳免疫メカニズム-内耳遺伝子転写網の解析-

研究課題名(英文) Gene expression analysis of innate immunity mechanisms in the cochlea with acute sensorineural hearing loss

研究代表者

前田 幸英 (Maeda, Yukihide)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：00423327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：急性音響性障害を発症したマウスの蝸牛組織での炎症・免疫メカニズムを遺伝子発現のレベルで解析した。RNA-seqとDNAマイクロアレイのデータによると、免疫関連遺伝子Fkbp5の発現量は発症3時間後の蝸牛で増加していた。また難聴発症12時間後では、インターフェロンにより発現誘導される10遺伝子の発現が増加していた。一方リアルタイムRT-PCRのデータでは、難聴発症12時間後の炎症・免疫機能の活性化にはインフラマソーム以外のメカニズムが存在すると示唆された。さらに発症12時間後に発現量が変動する長鎖非コードRNAも探索した。これらが炎症・免疫機能といかに関係するか、今後の検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性感音難聴は比較的頻繁にみられ、かつ難治性の病態である。一般にその治療にはステロイド投与が行われ、ステロイドの作用機序としては炎症、免疫反応を制御すると想定されている。当研究では急性感音難聴(急性音響性障害)を発症したマウスの内耳で、どのような炎症、免疫機能がかかわっているか、遺伝子発現のレベルで検討した。免疫関連遺伝子Fkbp5の発現と難聴発症の関係を検討し、どのような機能的カテゴリーの炎症・免疫関連遺伝子群が難聴発症に関わるか検討した。当研究の成果は急性感音難聴の病態解明と治療法開発のために役立つ。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms of inflammation and innate immunity were clarified by gene expression analyses in the mouse cochlea following intense noise exposure. An immunity-related gene, Fkbp5 was upregulated in the cochlea at 3 hours post-noise trauma compared to the cochlea without noise exposure. Ten interferon-inducible genes were upregulated in the cochlea at 12 hours post-noise trauma. Expressions of 84 genes related to inflammasome were analyzed by realtime RT-PCR array, but only 4 genes of these were significantly upregulated in the cochlea at 12 hours post-noise trauma. In our dataset of RNA-seq and DNA microarray, expressions of 2285 long non-coding RNAs were detected in the cochlear tissues. Four long non-coding RNAs, 8030423F21Rik, Gm5083, A630001G21Rik, and Gm19299 were upregulated or downregulated in the cochlea following acoustic trauma. The relationship between these long non-coding RNAs and inflammation/immunity has not been reported in previous papers.

研究分野：医歯薬学

キーワード：蝸牛 急性音響性障害 遺伝子発現解析 免疫機能 炎症機能 Fkbp5 インターフェロン インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性感音難聴は耳鼻咽喉科の臨床で頻繁にみられ、かつ難治性の病態である。現在のところその治療では早期のステロイド投与が行われるが、その病態や作用機序には不明点が多い。

われわれは先行研究で、マウスの蝸牛にステロイドを投与すると、蝸牛局所で免疫関連遺伝子 *Fkbp5* の発現量が著明に増加することを見出し、*Fkbp5* ノックアウトマウスの実験系を立ち上げた。*Fkbp5* は細胞内でグルココルチコイドのシグナリングを制御する蛋白質である。

また、われわれは先行研究で、急性感音難聴（急性音響性障害）を呈したマウスの蝸牛で、全ゲノムを対象とした遺伝子発現解析をおこなった。次世代シーケンサー（RNA-seq）と DNA マイクロアレイを併用して、マウスの蝸牛で網羅的な遺伝子発現解析を行う実験系を立ち上げ、急性感音難聴発症早期（12 時間後）の蝸牛では、炎症・免疫機能に関係する遺伝子群が多数変動することを明らかにした。当研究では以上の実験系や、リアルタイム RT-PCR を用いて、炎症、免疫機能を持つ遺伝子に照準を絞った遺伝子発現解析を行った。

また、これらの遺伝子発現解析法では長鎖非コード RNA の検出も可能である。長鎖非コード RNA は、蛋白質をコードしない RNA であるが、近年その生理機能の研究がさかんに行われている。したがって当研究では、長鎖非コード RNA の発現も検討対象とした。

われわれの先行研究からは、急性感音難聴の発症と治療メカニズムには、蝸牛局所での炎症・免疫機能が深く関わると考えられる。当研究では急性感音難聴発症時の蝸牛局所における、炎症・免疫機能についてさらに詳細を明らかにした。

2. 研究の目的

1) 免疫関連遺伝子 *Fkbp5* が、急性感音難聴（急性音響性障害）の発症に関わるかどうか、その聴力のデータや、難聴発症マウスの蝸牛における遺伝子発現のデータに基づき明らかにする。

2) 急性感音難聴を発症したマウスの蝸牛において、どのような機能的カテゴリーの炎症・免疫関連遺伝子が発動しているか明らかにする。“研究開始当初の背景”で示した先行研究に続き、当研究では炎症・免疫機能をもつ遺伝子群に照準を絞って検討する。

3. 研究の方法

1) *Fkbp5* ノックアウトマウス系統について

我々は岡山大学動物実験施設で、*Fkbp5* ノックアウトマウスの系統を維持している。米国 Jackson Laboratory から購入したヘテロ接合体マウスを交配させて、ホモ接合体の系統を確立したものである。そのバックグラウンド系統は C57BL/6 系統である。また雄、雌ともにホモ接合体に生殖能力がある。当研究では引き続きこの系統を維持し、聴力の検討をおこなった。

2) マウスでの急性感音難聴惹起

Fkbp5 ノックアウトマウス(6-8 週齢)と、野生型 C57BL/6 マウス(6 週齢)を、強大騒音に暴露して、急性感音難聴（急性音響性障害）を惹起し、聴性脳幹反応で聴力を検討した。マウスを 120dB SPL のオクターブバンドノイズ（8.0-16.0kHz）に 2 時間暴露して難聴を惹起した。先行研究でこの刺激により、騒音暴露直後（24 時間以内）および永続的（14 日間後）な難聴が引き起こされることを確認済みである。当研究では聴力が固定する 14 日後に、聴力を測定し、*Fkbp5* ノックアウトマウスの聴力と野生型マウスの聴力を、Mann-Whitney *U*-test を用いて統計的に比較した。

3) 遺伝子発現解析

野生型マウスに急性感音難聴を引き起こした後に、蝸牛組織を剖出して、miRNeasy カラム（Qiagen 社）をもちいて RNA を抽出した。

次世代シーケンサー（RNA-seq）では、イルミナ HiSeq シーケンサーを用いて、50bp シングルエンドで Poly(A)-RNA のシーケンシングを行った。マウスの全転写産物（全遺伝子および長鎖非コード RNA を含む）を対象に、発現量の定量をおこなった。

DNA マイクロアレイでは SurePrint G3 Mouse Microarray ver 2、(Agilent Technologies) を用いて、マウスの全遺伝子および長鎖非コード RNA の発現量の定量をおこなった。

次世代シーケンサーと DNA マイクロアレイの両方で、発現量が 2 倍以上または 1/2 以下に変動していた遺伝子のリストを作成し、web 上の遺伝子機能のデータベースである、David Bioinformatic Resources (<https://david.ncifcrf.gov/>) でその機能を解析した。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) パスウェイ解析および Gene Ontology term 解析をおこなった。これにより、リストにある遺伝子のうちいかなる遺伝子が炎症、免疫機能を持つか解析した。そしてこれらの遺伝子が、どのようなカテゴリーの炎症・免疫機能に関係しているかを検討した。また、特定の炎症・機能に関係する遺伝子の発現を、リアルタイム RT-PCR アレイ (Qiagen 社) を用いて検討した。当研究ではインフラマソームとその機能に関係する 84 遺伝子の発現量を検討した。

4. 研究成果

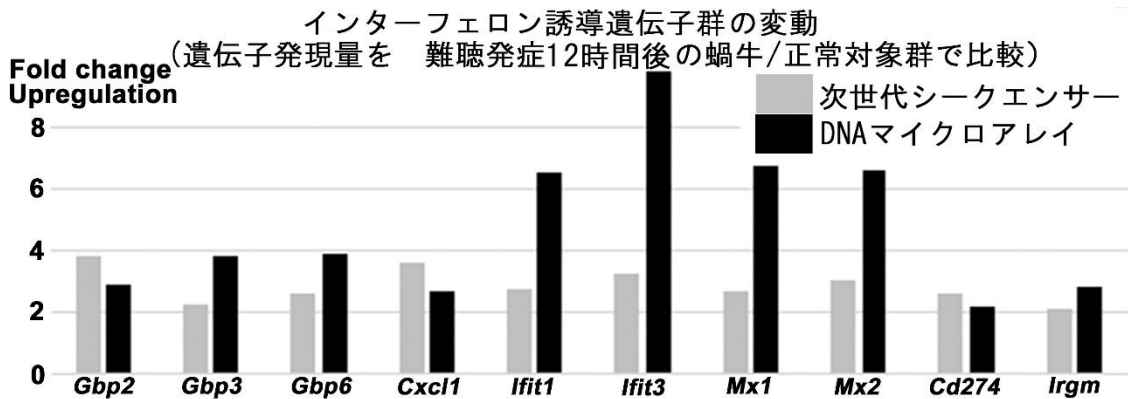
1) *Fkbp5* ノックアウトマウスの聴力と、蝸牛での *Fkbp5* 発現について

急性音響性障害発症 14 日目の *Fkbp5* ノックアウトマウスの聴力は 57.1 ± 16.5 dBSPL (n=7 匹)

で、同様に難聴を惹起して 14 日目の野生型マウスと有意差はみとめなかった。つぎに急性音響障害を呈する野生型マウスの蝸牛での *Fkbp5* の発現量を次世代シーケンサーと DNA マイクロアレイの両方で検討した。難聴発症 3 時間後では、難聴を発症していないマウスに比べて、2 倍以上への発現量の増加を認めた (RNA-seq:2.10 倍、DNA マイクロアレイ:2.49 倍)。難聴発症 12 時間後には難聴を発症していないマウスとくらべ、その様な発現量の増加はみとめなかった。

2) 野生型マウスに難聴を惹起させた際に変動する、炎症・免疫関連遺伝子について

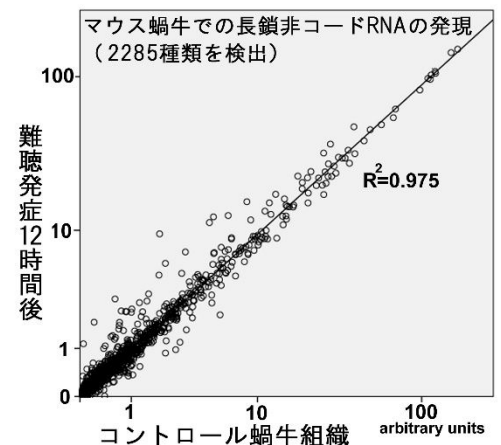
難聴発症 12 時間後に変動する遺伝子群の機能について詳細に検討した結果、インターフェロンにより発現誘導されると報告されている遺伝子群が増加していることがわかった。具体的には *Gbp2* (RNA-seq では 3.87 倍に増加、DNA マイクロアレイでは 2.91 倍に増加)、*Gbp3* (2.25 および 3.86 倍)、*Gbp6* (2.65 および 3.92 倍)、*Cxcl1* (3.66 および 2.72 倍)、*Ifit1* (2.81 および 6.57 倍)、*Ifit3* (3.28 および 9.84 倍)、*Mx1* (2.70 および 6.76 倍)、*Mx2* (3.05 および 6.61 倍)、*Cd274* (2.63 および 2.23 倍)、*Irgm* (2.13 および 2.84 倍) の発現量増加を認めた。難聴発症 3 時間後にはその様な発現量増加はみとめなかった。



また、リアルタイム RT-PCR アレイでインフラマソームとその機能に関する遺伝子について検討したところ、84 遺伝子のうち 14 の遺伝子については有意な発現変動を認めた (平均値で 2 倍以上または 1/2 以下への変動。n=3, p<0.05)。具体的には難聴発症後 12 時間の時点で *Ccl12*、*Ccl17*、*Cxcl1*、*Ptgs2* の発現増加と、*Aim2*、*I11b*、*Irf4m*、*Mefv*、*Naip1*、*Nlrp12*、*Nlrp1*、*Pycard*、*Tnfrsf14* の発現減少をみとめた。従って発現増加をみとめたのは 4 遺伝子であった。またこれらの 84 遺伝子のうち、難聴発症 3 時間後の時点で発現変動をみとめたのは *Ccl17* (RNA-seq で 4.04 倍、DNA マイクロアレイで 4.67 倍へ変動) のみであった。

3) 難聴発症マウスの蝸牛における長鎖非コード RNA の発現について

難聴発症後 12 時間の蝸牛組織および、難聴を発症していないコントロールの蝸牛組織から DNA マイクロアレイで 2285 種類の長鎖非コード RNA の発現を検出した。これらの発現量の、難聴発症マウスとコントロールの間での相関係数は 0.99 と非常に高かった。したがって発現量データ全体としては再現性の高いデータがえられた。これらの長鎖非コード RNA のうち、難聴発症時に 2 倍以上または 1/2 以下への発現量変動をみとめたのは 130 種類で、検出された長鎖非コード RNA の 5.69% であった。また、データベースなどでアノテーションされており次世代シーケンサーでも発現変動が確認された長鎖非コード RNA には 8030423F21Rik (DNA マイクロアレイで 2.44 倍、RNA-seq で 2.38 倍へ増加)、Gm5083 (DNA マイクロアレイで 2.94 倍、RNA-seq で 2.54 倍へ増加)、A630001G21Rik (DNA マイクロアレイで 0.11 倍、RNA-seq で 0.45 倍へ減少)、Gm19299 (DNA マイクロアレイで 0.48 倍、RNA-seq で 0.19 倍へ減少) があつた。



考察:

1) 今回の *Fkbp5* ノックアウトマウスの聴力の検討からは、*Fkbp5* の機能が難聴の発症に影響をおよぼすという直接的なデータは得られなかった。しかしながら野生型マウスでの難聴発症 3 時間では *Fkbp5* の発現量は増加していた。免疫関連遺伝子 *Fkbp5* が何らかの形で急性感音難聴の発症にかかわると示唆された。

2) これまでに急性感音難聴発症 12 時間後には、免疫機能に関するサイトカイン群の発現が変動することが明らかになっていたが、今回の検討では、インターフェロン誘導遺伝子も多く変動するとわかった。これらは急性音響障害における自然免疫応答に関与すると考えられる。インフラマソーム関連遺伝子については、84 遺伝子のうち 14 遺伝子では変動をみとめたが、発

現量増加をみとめたのは4遺伝子にとどまる。急性音響性障害の際の蝸牛での炎症・免疫反応にはインフラマソーム以外の活性化経路もあるものと考えられる。

3) 難聴発症12時間後の蝸牛組織で発現量が変動する長鎖非コードRNAを検討した。これまでのところ文献などで、これらと炎症・免疫機能との関わりは報告されていなかった。これらの長鎖非コードRNAの機能についてさらに検討が必要である。

参考文献

- 1) Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009 4: 44-57.
- 2) Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 37: 1-13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maeda Y, Kariya S, Uraguchi K, Takahara J, Fujimoto S, Sugaya A, Nishizaki K	4. 巻 165
2. 論文標題 Immediate changes in transcription factors and synaptic transmission in the cochlea following acoustic trauma: A gene transcriptome study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 6-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田幸英、大道亮太郎、菅谷明子、假谷 伸
2. 発表標題 音響外傷マウス蝸牛における、自然免疫応答の転写制御について
3. 学会等名 日本聴覚医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦口健介、前田幸英、藤本将平、假谷 伸、西崎和則
2. 発表標題 音響外傷マウスの蝸牛における、シナプス関連遺伝子と転写因子の変動
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学 研究者総覧
<https://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&l=ja>
 researchmap
<https://researchmap.jp/YukihideMaeda>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	假谷 伸 (Kariya Shin) (10274226)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究分担者	菅谷 明子 (Sugaya Akiko) (20600224)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	
研究分担者	高原 潤子 (Takahara Junko) (80448224)	岡山大学・医学部・技術専門職員 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------