

平成 23 年 5 月 8 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591977
 研究課題名(和文) 細胞外マトリックスによる難聴に関する基礎的、臨床的研究
 研究課題名(英文) Basic and clinical research of deafness causing mechanisms by extra cellular matrix components.
 研究代表者
 工 穰 (TAKUMI YUTAKA)
 信州大学・医学部・准教授
 研究者番号：70312501

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリックスを構成する主成分としてはコラーゲンが知られている。コラーゲンのうちのいくつかは難聴の原因になることが報告されているが、内耳に特異的、あるいは高発現している遺伝子は難聴の原因となる可能性が示唆される。本研究では Whole body RNA に比して高発現するコラーゲン遺伝子を網羅的に解析した。その結果 13 種のコラーゲン遺伝子が内耳で 2 倍以上の発現量を呈しており、特に 6 種類が 10 倍以上を示した。また typeIX コラーゲンでは Col9a1 が 8.8 倍 Col9a2 が 17.9 倍と高倍率の発現がみられた。高倍率を呈しているものは新規の難聴原因遺伝子変異候補として考えられるとともに、内耳におけるコラーゲンの機能を検討する上で重要な情報になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In Extra cellular matrix, many kind of collagen are contained and some species of them are reported as a responsible gene for deafness causing. In this study, we analyzed all kinds of collagen genes expression levels of inner ear and whole body. As a result, 13 collagen gene expressed twice or more in inner ear than whole body, And 6 collagen gene expressed 10 fold or more. These genes might be good candidates for new deafness causing genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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・細胞外マトリックス・難聴遺伝子・蓋膜・血管条・ラセン靭帯

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスを構成する基質タンパク質には、コラーゲン、ラミニン、プロテ

オグリカン、フィブロネクチン、エンタクチン、パーレカンのほか、ヒアルロン酸、やコンドロイチン硫酸、グルコサミンなど多数のタンパク質が含まれている。

中で最も多く含まれるコラーゲンは内耳においても様々なバリエーションが豊富に分布しており、なお且つ遺伝子変異が難聴の原因になっていることが報告されている。内耳の構造を詳細にみると、有毛細胞の上部に存在する蓋膜と呼ばれる構造がある。蓋膜は、音声の振動により生じたリンパ液の振動を介して、外有毛細胞、内有毛細胞の感覚毛を刺激するために必要不可欠であるが、その構造には細胞が含まれておらず、II型コラーゲン、IX型コラーゲン、オトジェリン、アルファ・テクトリン、ベータテクトリンなどの細胞外マトリックスのみで構成されている。従って、内耳の聴覚機能を維持するためには細胞外マトリックスが非常に重要である事が示唆されていた。

我々の研究室で行った、cDNA micro arrayを用いたヒト内耳RNAの発現解析では、内耳ではtypeIXコラーゲンの発現が他の組織と比較して高いことが明らかと成っている(Abe et al., 2003)。

また、我々の研究室で、typeIXコラーゲン遺伝子の変異スクリーニングを行った結果、日本人難聴患者からCOL9A1およびCOL9A3変異を見いだされた(Asamura et al., 2005、van Camp et al., 2006)。

さらにtype9 collagen ノックアウトマウスの解析では、蓋膜が変形すると共に進行性の難聴を呈することが明らかとなった(Suzuki et al., 2005)。

また、海外の報告では、難聴以外の症状も合併する症候群性の感音難聴の原因遺伝子としていくつかのコラーゲン遺伝子が報告されている。具体的には、Stickler症候群の原因遺伝子として、COL2A1、COL11A1、COL11A2が、またAlport症候群の原因遺伝子としてCOL4A1が報告されている。

以上のことからコラーゲンタンパク質の内耳での重要性が示唆されるが、現時点で46種類存在するコラーゲン遺伝子のうち、内耳に発現するコラーゲン遺伝子を同定することにより、新規の難聴原因を解明するとともに、聴覚がどのように担われているかを解明する上で非常に有用な情報になり得ると考えた。

また、コラーゲン以外の細胞外マトリックスの構成要因も難聴の原因となり得ることが考えられた。実際、アルファ・テクトリンをコードするTECTA遺伝子が、常染色体優性遺伝形式の中音域障害(U型)の聴力像を呈する難聴および、常染色体劣性遺伝形式の高音漸傾型の聴力像を呈する難聴の原因遺伝子として報告がなされており、他の細胞外マ

トリックスの構成要因の遺伝子変異によっても難聴が引き起こされる可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

背景にも記載したように、内耳において細胞外マトリックスを構成する遺伝子が難聴の原因遺伝子として報告されていること、また、ノックアウトマウスを用いた解析からも、表現型として難聴が認められることより、内耳における細胞外マトリックス構成遺伝子が聴覚の維持に重要な機能を有しており、その遺伝子変異により難聴が引き起こされる可能性が示唆されていた。そこで、本研究では次の2つの目的で細胞外マトリックスが聴覚機能維持にどのように寄与しているかを検討するとともに、新規の難聴遺伝子解析の候補を絞り込むための基盤の確立を目指した。

(1)内耳におけるコラーゲン遺伝子の網羅的発現解析

本研究を開始する前にcDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリングは行われていたが、cDNAマイクロアレイの弱点として、アレイごとにはばらつきが大きく、またダイナミックレンジが狭いことが問題となっていた。そこで、本研究では現在までに報告されている46種類のコラーゲン遺伝子の残種類の遺伝子発現を定量リアルタイムPCR法により測定する事で、内耳に発現するコラーゲンの種類とその発現量を明らかにすることを目的とした。

内耳に発現するコラーゲン遺伝子バリエーションの発現を詳細に解析することは、新たな難聴原因の解明に貢献し、発症真家ニズムの手がかりとして有用であると考えた。そこで、特に量的に少ないコラーゲンバリエーションを含めた内耳での発現パターンを網羅的に解析し、whole bodyを対象として発現分布を比較検討した。

(2)細胞外マトリックス構成因子ノックアウトモデルマウスの解析

細胞外マトリックスの構成因子としては、コラーゲンの他に、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、エンタクチン、バーレカンのほか、ヒアルロン酸、やコンドロイチン硫酸、グルコサミンなどが含まれるが、これら因子が内耳においてどのような機能を有しているかは必ずしも明確になっていない。

我々は、信州大学大学院医学系研究科の樹

立したヒアルロン酸合成酵素ノックアウトマウスの提供を受け、その内耳機能の解析を行い、コラーゲン以外の細胞外マトリックスの構成因子の及ぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

(1)内耳におけるコラーゲン遺伝子の網羅的発現解析

8週齢 C57/BL6J オスマウス 3匹(6耳)を深麻酔下で内耳を摘出し、速やかに RNA later solution(Ambion) に浸す。RNA later solutionに浸したまま、顕微鏡下で蝸牛膜迷路のみを取り出し、RNeasy micro Kit(QIAGEN)を使用して total RNA を抽出する。Bio analyzer 2100 (Agilent)を使用してクオリティチェックおよび定量を行った後、6耳分の RNA をプールして、Expression array(Agilent)に載せ発現解析を行った。

コントロールの RNA としては mouse whole body RNA (Agilent)を使用した。コラーゲン遺伝子バリエーションの発現の検討は、High capacity RNA to cDNA kit(Applied biosystems)を用いて逆転写を行った後に、TaKaRa社のレディメイド定量PCR用プライマーを使用した。また、測定にはABI社の Step One Plus リアルタイム PCR 装置を使用した。

(2)細胞外マトリックス構成因子ノックアウトモデルマウスの解析

信州大学大学院医学系研究科の樹立したヒアルロン酸合成酵素ノックアウトマウスの提供を受けて解析を行った。

聴力の測定は、3ヶ月齢、6ヶ月齢のマウスを用いて麻酔下に、聴性脳幹反応 (ABR) を用いてクリック音の聴力の測定を行った。

また、形態学的解析では、深麻酔下で 4% パラホルムアルデヒドを用いて、経鼓膜のおよび還流固定を行った後に内耳の摘出を行い、蝸牛の凍結切片を作製して透過型電子顕微鏡下に組織の形態を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1)内耳におけるコラーゲン遺伝子の網羅的発現解析

方法に記載したように、8週齢の C57/BL6J オスマウス 3匹の蝸牛組織より抽出した total RNAより得られた cDNA と、市販の Whole body total RNA より同様の手法にて合成した cDNA 間でコラーゲン遺伝子の発現の量を定量 RT-PCR 法により計測を行った。

その結果、Whole bodyに含まれる RNA と比較して、13種のコラーゲン遺伝子が内耳で2

倍以上の発現量を呈しており、中でも特に6種類が10倍以上の発現していることが明らかとなった。また typeIXコラーゲンでは *Col9a1* が 8.8 倍 *Col9a2* が 17.9 倍と高倍率の発現がみられた。

<i>col2a1</i>	11.0
<i>col4a3</i>	4.35
<i>col8a2</i>	18.7
<i>col9a1</i>	8.81
<i>col9a2</i>	17.9
<i>col11a1</i>	9.59
<i>col11a2</i>	40.03
<i>col13a1</i>	9.42
<i>col14a1</i>	13.0
<i>col19a1</i>	4.61
<i>col22a1</i>	10.7
<i>col23a1</i>	3.97
<i>col27a1</i>	9.08

また難聴に関連するコラーゲン以外の既知の遺伝子に注目すると、*Gjb2* が 1080 倍 *Coch* が 869 倍など高倍率がみられる反面 *Tecta* や *Slc26a4* など2倍に満たないものもみられた。

これらの結果から高倍率を呈している、従って内耳で高い発現をしているコラーゲン遺伝子に関しては、難聴患者の新規原因遺伝子変異候補として考えられるばかりでなく内耳におけるコラーゲンの機能を検討する上で重要な情報になると考えられた。

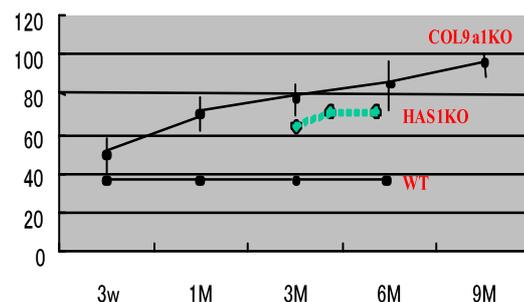
(2)細胞外マトリックス構成因子ノックアウトモデルマウスの解析

信州大学大学院医学系研究科の樹立したヒアルロン酸合成酵素ノックアウトマウスの提供を受けて解析を行った。

聴力の測定は、3ヶ月齢、6ヶ月齢のマウスを用いて麻酔下に、聴性脳幹反応 (ABR) を用いてクリック音の聴力の測定を行った。

その結果、野生型と比較してヒアルロン酸

ABR (Click)の閾値

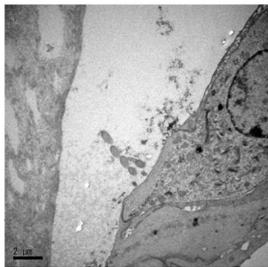


合成酵素ノックアウトマウスでは閾値の上昇が認められた。併せて行った type IX コラーゲンノックアウトマウスと比較した場合には難聴はややマイルドであった。

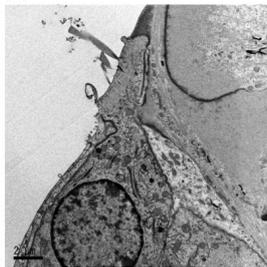
また、形態学的解析では、深麻酔下で 4% パラホルムアルデヒドを用いて、経鼓膜のおよび還流固定を行った後に内耳の摘出を行い、蝸牛の凍結切片を作製して透過型電子顕微鏡下に組織の形態を詳細に検討した。

その結果、内有毛細胞の感覚毛の形態が大幅に変化しており、ドット状の形態と成っていた。

Auditory hair of the Inner Hair cell in HAS1 KO & C57BL mice (2)



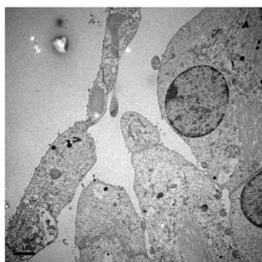
HAS1 KO mouse (18W)



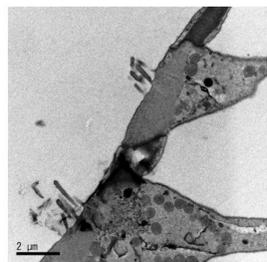
C57BL mouse (18W)

また、外有毛細胞に関しては、本来有るはずの感覚毛構造が消失しており、また形態的にも有毛細胞の形が成熟していない。

Auditory hair of the Outer Hair cell in HAS1 KO & C57BL mice (2)



HAS1 KO mouse (18W)



C57BL mouse (18W)

過去の報告では、ヒアルロン酸はアブミ骨の底板に発現しており、遺伝子変異により耳硬化症様の伝音難聴を呈すると考えられていたが、今回の解析により、内有毛細胞の構造が大きく変化している点、外有毛細胞の毛構造の消失など感音難聴の原因となる所見が多数得られ、非常に新規性の高い結果を得る事が出来た。なお、ヒアルロン酸ノックアウトマウスの解析の結果に関しては現在と論文投稿準備中である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

菊池安剛、鈴木伸嘉、橋本繁成、工 穰、宇佐美真一、内耳におけるコラーゲン遺伝子バリエーションのプロファイリング、2010 年 10 月 7 日、第 20 回日本耳科学会総会・学術講演会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工 穰 (TAKUMI YUTAKA)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：70312501

(2) 連携研究者

宇佐美 真一 (USAMI SHINICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：10184996

鈴木 伸嘉 (SUZUKI NOBUYOSHI)
信州大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20377641

橋本 繁成 (HASHIMOTO SHIGENARI)
信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)
研究者番号：90359729

西尾 信哉 (NISHIO SHINYA)
信州大学・医学部・研究員
研究者番号：70467166