

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09707

研究課題名(和文) ヒト内耳における遺伝子発現ダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Gene expression analysis of Human inner ear

研究代表者

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：70467166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インスブルック医科大学との国際共同研究により、ヒト内耳サンプルという非常に貴重な研究材料を用い、次世代シーケンズ解析を行うことで、ヒト内耳における遺伝子発現の網羅的解析を行い、ヒト内耳の transcriptome を明らかにすることを目的に研究を実施した。その結果、ヒト内耳の遺伝子発現パターンを明らかにすることができた。また、得られた遺伝子発現量の情報を基に、いくつかの遺伝子に関して免疫染色との比較検討をおこなった。その結果、内耳の組織形態学的な発生段階と、遺伝子発現パターンが一致することを複数の難聴原因遺伝子で明らかにすることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりヒト内耳の遺伝子発現パターンを明らかにすることができた。また、得られた遺伝子発現量の情報をもとに、免疫染色および in situ hybridization の結果との比較検討をおこなった。その結果、内耳の組織形態学的な発生段階と、遺伝子発現パターンが一致することを複数の難聴原因遺伝子で明らかにすることが出来た。今までにヒト内耳発生を形態と遺伝子発現の両面から調べた報告は非常に僅かであるため、共同研究により非常に大きな科学的インパクトのある成果が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in molecular genetic analysis technology enabled to clarify genetic cause of deafness. Genetic diagnosis is useful to predict the phenotype and appropriate clinical treatment. Despite advances in genetic analysis, there remains a significant delay in the pathophysiology elucidation of the hearing loss as the inner ear is surrounded by bone, making it impossible to perform biopsies without causing irreversible deafness. Most previous studies were performed using model mice; however, many mouse models did not reflect human phenotypes. To elucidate the physiology of the auditory system and deafness causing mechanism, we performed RNA-Seq analysis of the developing human inner ear with professor Schrott-Fischer at the Medical University of Innsbruck. In this collaborative study, we analyzed the gene expression pattern of fetal inner ear at each gestational week and clarified gene expression dynamics.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：難聴 内耳 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 先天性難聴の遺伝子診断

先天性難聴は新生児 1,000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性障害のひとつであり、そのうち 60~70%に遺伝子が関与することが推測されている。難聴のみを症状として呈する非症候群性難聴の原因としては、研究開始当初の時点で、すでに 100 種類を超える原因遺伝子が報告されており遺伝的異質性が非常に高いため、次世代シーケンサーを用いた解析等効率的な遺伝子解析手法が必要とされる疾患である。

我々の研究室では、従来より難聴の遺伝子解析に取り組んでおり、数多くの原因遺伝子変異を発見・報告してきた。また、研究成果は 2008 年に先進医療、2012 年には「遺伝学的検査 (先天性難聴)」として保険収載され、日常の診療ツールとして必要不可欠な検査として活用されている。難聴患者の遺伝子解析を行い、原因変異を明らかにすることで、難聴のタイプや重症度、進行性の有無や随伴症状の予測など臨床上有用な情報が得られることより、年間 1400 例程度の症例の遺伝学的検査が実施されている。

(2) ヒト内耳の transcriptome 解析

難聴の原因診断に関しては、遺伝子解析技術の発達 (特に次世代シーケンスの臨床応用) により大幅に進展したが、その基盤となる分子メカニズムに関しては研究が遅れている状況である。現在までに、マウス等のモデル生物を用いた研究は行われているものの、ヒト内耳を用いた研究 (特に遺伝子発現に関する研究) はほとんど行われていない。

これは、ヒト内耳は骨に囲まれた組織であるため組織にアプローチすることが困難であることに加え、内耳を生検することで不可逆的な難聴を生じてしまうため生検してサンプルを得ることが不可能であることに起因している。加えて、世界的に見ても死後病理標本検体を用いて解析を実施している研究室は非常に少数であり、また、得られる検体の大部分はホルマリン固定標本であるため RNA の分解が進んでおり、transcriptome 解析は困難であるためであり、詳細な遺伝子発現に関しては、ほとんど明らかになっていない状態であった。



図 1 実際のヒト側頭骨病理標本

蝸牛は骨に囲まれた 5mm 程度の小さな組織であり、アプローチが困難である。また、生検することで非可逆的な難聴を生じてしまうため生検サンプルを得ることが不可能であるため、遺伝子発現研究が進んでいなかった。

(3) マウス内耳を用いた transcriptome 解析

前述のようにヒト内耳のサンプルの入手が困難であることから、内耳における病態を推定することを目的に、マウス蝸牛における遺伝子発現の網羅的解析が広く行われている。研究代表者らもマウス内耳を用いた遺伝子発現解析に取り組んでおり、蝸牛の基底回転、中回転、頂回転と回転別に遺伝子発現の比較解析や Laser capture micro-dissection 法 (LMD) により、コルチ器、血管条、ラセン神経節などの部位を切り出し、次世代シーケンシング法 (NGS) により全転写産物解析を行ってきた。しかしながら、ヒトより見出された原因遺伝子をノックアウトしたモデルマウスが難聴を示さない例があるなど、マウスとヒトでは蝸牛における各遺伝子の役割が必ずしも同一でないことから、ヒト蝸牛の発生、分化、維持における各種遺伝子の役割を明らかにするためにはヒト内耳サンプルを用いた解析が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、インスブルック医科大学との国際共同研究により、インスブルック医科大学の管理するヒト内耳サンプルおよび UK バイオバンクのヒト内耳サンプルという非常に貴重な研究材料を用い、次世代シーケンシング解析を行うことで、ヒト内耳における遺伝子発現の網羅的解析を行い、ヒト内耳の transcriptome を明らかにすることを目的に研究を実施した。

本研究により、ヒト内耳における時空間的な遺伝子発現パターンを明らかにすることができれば、内耳の発生メカニズムやその際に働く転写因子解明、難聴発症メカニズムの解明、再生医療などの研究の際の基盤となる情報が得られることが期待され、研究領域全体に大きなインパクトを及ぼすことが可能であると期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト内耳サンプルの採取

インスブルック医科大学にてヒト内耳サンプルを摘出後、RNA-Later に入れ、凍結状態を保ったまま顕微鏡下で解剖を行い、骨組織を除去し巻く迷路を取り出す。解剖操作は全て RNA-Later 中で行った。得られた膜迷路標本は直ちに-80 度にて冷凍し、国内に凍結状態を保ったまま輸送した。信州大学では OCT コンパウンドに包埋後に Laser capture micro-dissection (LMD) 用に凍結切片を作成した。

(2) 次世代シーケンス解析用ライブラリ調整

凍結切片より LMD を用いて蝸牛の部位（コルチ器、血管状、内ラセン隆起、蝸牛神経）を摘出した。LMD で得られた微量組織より、TaKaRa 社の SMART-Seq HT kit を用いて RNA 抽出および逆転写反応を行い、cDNA を合成した。次に、得られた cDNA を Template Switching Oligonucleotide を用いて 2nd ストランド合成を行い 2 本鎖 DNA にした後、PCR を行い産物の増幅を行った。得られた 2 本鎖 DNA を基に、illumina 社用の次世代シーケンサーライブラリを Tagmentation 法で作成した。また、Oxford Nanopore 社用の次世代シーケンサーライブラリを Ligation barcoding kit を用いて作成した。

(3) 次世代シーケンス解析

上記の方法で作成したライブラリを NovaSeq および MinION を用いてシーケンスを行った。Short Read シーケンサーの解析結果は STAR を用いて GRCh38 にマッピングし、Stringtie を用いて転写産物の推定、RSEM を用いて定量化を実施した。Long Read シーケンサーの解析結果は Minimap2 を用いて GRCh38 にマッピングし、Stringtie を用いて転写産物の推定、Salmon を用いて定量化を実施した。得られた転写産物の比較は EdgeR を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) インスブルック医科大学より輸送したヒト内耳サンプル由来の RNA の品質

インスブルック医科大学で解剖を行い、日本に輸送した RNA の品質が transcriptome 解析を実施可能であるかどうかを確認することを目的に、ヒト蝸牛全体をビーズクラッシャーを用いてホモジェナイズし、QIAGEN 社の RNeasy Mini Kit を用いて total RNA の抽出を行った。得られた RNA は Qubit を用いて定量を行うとともに、Bioanalyzer を用いて品質の確認を行った。その結果、海外から輸送後も RIN 値で 8 以上と比較的良好な品質の RNA サンプルを得ることができ、transcriptome 解析に十分利用可能なサンプルが得られることが明らかとなった。

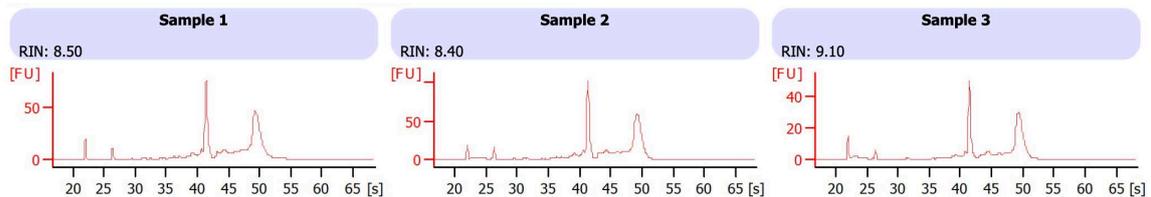


図 2 ヒト内耳サンプルから抽出した RNA の品質

インスブルック医科大学で解剖を行い、日本に輸送したヒト内耳サンプルから RNA 抽出を行い、得られた RNA の品質を、Bioanalyzer を用いて検証した。その結果、いずれのサンプルも RIN 値で 8 を超えており、transcriptome 解析を実施しうるために十分な品質があることを明らかにした。

(2) Short Read 型次世代シーケンス解析

Short Read 型次世代シーケンス解析の結果、ヒト内耳の遺伝子発現パターンを明らかにすることができた。また、得られた遺伝子発現量の情報を基に、いくつかの遺伝子に関して免疫染色および in situ hybridization の結果との比較検討をおこなった。その結果、内耳の組織形態学的な発生段階と、遺伝子発現パターンが一致することを複数の難聴原因遺伝子で明らかにすることが出来た。今までにヒト内耳発生を形態と遺伝子発現の両面から調べた報告は非常に僅かであるため、共同研究により非常に大きな科学的インパクトのある成果が得られたと考えている。この成果に関しても、現在論文投稿に向けた準備を進めている (Steiancher et al., in preparation)。

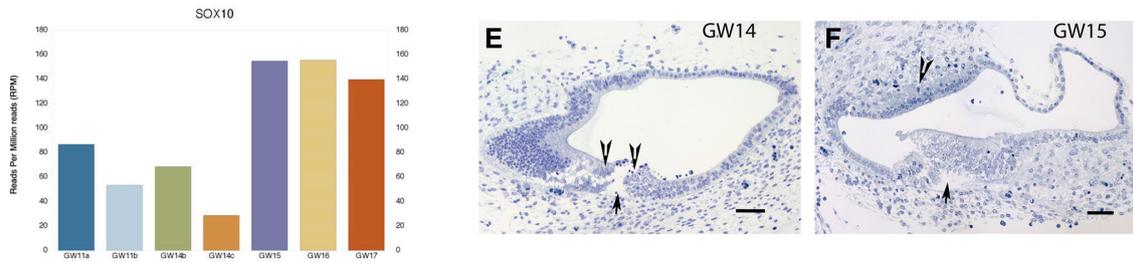


図3 ヒト内耳サンプルの transcriptome 解析 (Steinacher et al., submitted)
 左: 発生中ヒト内耳における *SOX10* 遺伝子の発現量を示す。GW15 以降に急激に発現増加していることが見てとれる。
 右: GW14 および GW15 のヒト内耳の形態。GW15 になると血管条の部位にメラノサイトの侵入が生じており (図 F 上矢頭などの色の濃い細胞)、遺伝子発現の結果が形態学的にも裏付けられた。

(3) Long Read 型次世代シーケンス解析

Long Read 型次世代シーケンス解析の結果、遺伝子発現量のみならず、内耳特異的な alternative splicing variant の存在する遺伝子を複数見出すことが出来た。本研究の成果は、現在論文投稿に向けた準備を進めている (Nishio et al., in preparation)。

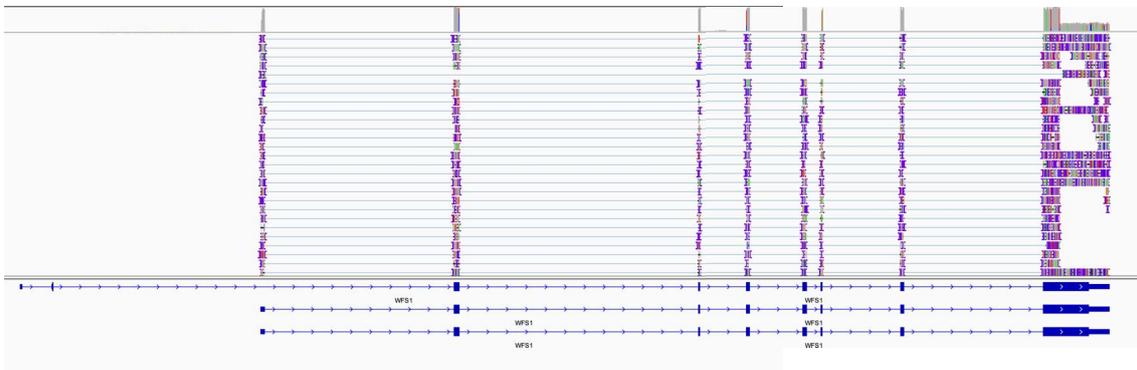


図4 ヒト内耳サンプルの Alternative splicing 解析 (Nishio et al., in preparation)
 今までに、既知の *WFS1* 遺伝子 alternative splicing variant は下段に示す3種類あることが知られていたが、実際にヒト内耳で発現するのはこれらのうちの下の2種類のみであり、最も長い最上段の alternative splicing variant は発現していないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	宇佐美 真一 (USAMI Shin-ichi) (10184996)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

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			
オーストリア	Medical University of Innsbruck			