

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462629

研究課題名(和文) 老人性難聴発症の分子機構を規定するmiRNA・標的遺伝子群の同定

研究課題名(英文) A study of microRNAs regulating the pathogenesis of age-related hearing loss

## 研究代表者

野口 佳裕 (NOGUCHI, Yoshihiro)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：50282752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：聴覚の老化に重要な調節因子を明らかにすることを目的とした。月齢1カ月、10カ月、16カ月のC57BL/6(加齢性難聴モデルマウス)蝸牛に対して網羅的miRNA発現解析を行った。非階層クラスター分析を行い、老人性難聴に関与しうる6つのクラスター(32のmiRNAを含む)を選別した。6つのクラスターの中で3つのクラスター(クラスター1、クラスター5、クラスター6)において、12のmiRNAの発現が月齢1カ月から10カ月の間に上昇していた。これらの12miRNAを対象として、加齢性難聴モデルマウスC57BL/6と非加齢性難聴モデルマウスC3H/HeにおけるmiRNA発現を比較した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to clarify the important regulatory factors for age-related hearing loss. Exhaustive miRNA expression analyses were performed to the cochleae of C57BL/6, an age-related hearing loss mouse model, at the ages of 1 month, 10 months and 16 months. Non-hierarchical cluster analyses detected six clusters, including 32 miRNAs, which could be associated with age-related hearing loss. The expression levels of 12 miRNAs in three cluster (clusters 1, 5 and 6) among the 6 clusters increased from the age of 1 month to the age of 10 months. The expression levels of the 12 miRNAs were compared between age-related hearing loss mice (C57BL/6) and non age-related hearing loss mice (C3H/He).

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：老人性難聴 内耳 蝸牛 加齢 マイクロRNA 発現解析 C57BL/6

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 老人性難聴は、環境要因と遺伝要因が複雑に絡み合った多因子疾患の1つである。多因子疾患ではゲノムワイド関連解析を用いた研究が進められているが、老人性難聴の疾患感受性遺伝子は同定されていない。

(2) 老人性難聴の発症にはミトコンドリア機能の低下、酸化ストレスなどが考えられており、遺伝要因に関しても複数の遺伝子が複雑に絡み合っていると考えられる。

(3) 研究代表者は、ヒト難聴に関する分子遺伝学的研究、マウス聴覚の分子生物学的、形態学的研究に従事してきた。これらの研究成果をふまえ、miRNAが複数のmRNAをターゲットとし、その発現を抑制することで、細胞増殖・分化やアポトーシスなどの生物学的プロセスをコントロールする遺伝子発現の重要な調節因子であることに着目した

(4) miRNAは非翻訳性で約22塩基より成るsmall RNAの一つである。2001年にScience誌に掲載された3つの報告(Logos-Quintanaら、Lauら、Leeら)以降、癌、神経変性疾患、心疾患などとmiRNAとの関連が明らかになり、治療への応用も期待されている。そして、老化に関しても肺、脳、心などに関する特定のmiRNAが同定され、ターゲット遺伝子のコンピューター解析などにより各臓器における老化の分子機構が解明されつつある。

(5) 内耳においても、miR-183、miR-182、miR-96と内耳発生との関連が報告されている。また、miR-96遺伝子が非症候群性遺伝性難聴の原因遺伝子となることが報告されている。このように、特定のmiRNAが内耳機能に重要な働きをすることが判明している。しかし、miRNAと蝸牛の老化に関する報告は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、老化を含めた生物学的プロセスをコントロールする遺伝子発現の重要な調節因子であるmiRNAを老人性難聴の研究に展開する。

(2) 難聴の加齢変化に関与するmiRNAを特定するのみではなく、標的遺伝子群を同定することで老人性難聴発症の分子機構を総括的に捉えることが可能になると考えられる。

(3) miRNAは、長期間活性、in vivoで安定、RNAプロモータを活用できる、複数の標的を制御できる、毒性がないなどの特徴を有する。これらの特徴は、siRNAと比較し治療戦略としても有利である。従って、将来的には老人性難聴治療への応用を期待

しうるものである。

## 3. 研究の方法

(1) 研究代表者は、加齢性難聴モデルマウスC57BL/6の経時的な聴力変化を検討してきた。その検討結果では、ABRの閾値測定を行うと、月齢1カ月から9カ月までは正常を示すが、10~12カ月の間に急速な閾値上昇を示した。その後、徐々にABR閾値は上昇し、16カ月で無反応となった。すなわち、C57BL/6は生後16カ月に完全に聴覚を失うが、月齢10カ月に聴覚加齢変化の重要なターニングポイントがあることが判明した。

(2) 研究代表者は、月齢1カ月、10カ月、16カ月のC57BL/6マウスの蝸牛を対象に網羅的miRNA発現解析を行っていた。その解析結果をもとに、非階層クラスター分析を行った。分類されたクラスターの中で、月齢1カ月から10カ月の間に発現が上昇するクラスターを選定した。

(3) 加齢性難聴モデルマウスC57BL/6と非加齢性難聴モデルマウスC3H/Heを対象に、1カ月齢と10カ月齢における蝸牛(各マウス20耳)を収集した。マウスを安楽死させ、その直後に側頭骨を摘出し、RNA later(Ambion)内に置いた。実体顕微鏡下で、蝸牛外側の骨迷路を丁寧に除去し、蝸牛外側壁、コルチ器、ラセン神経節を含む膜迷路のみとした。RNA laterで満たされたマイクロチューブ内に収集し、-20℃で冷凍保存した。

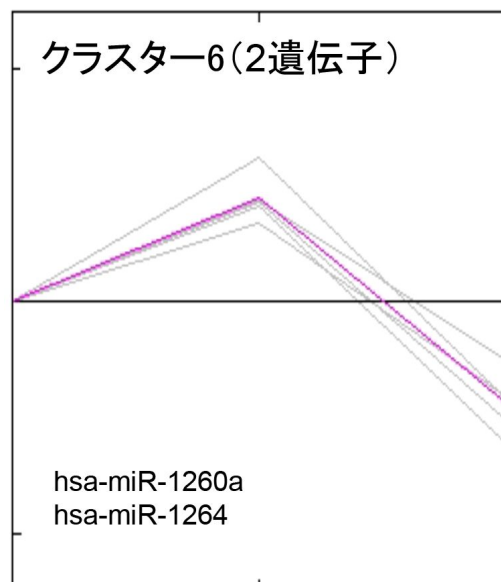
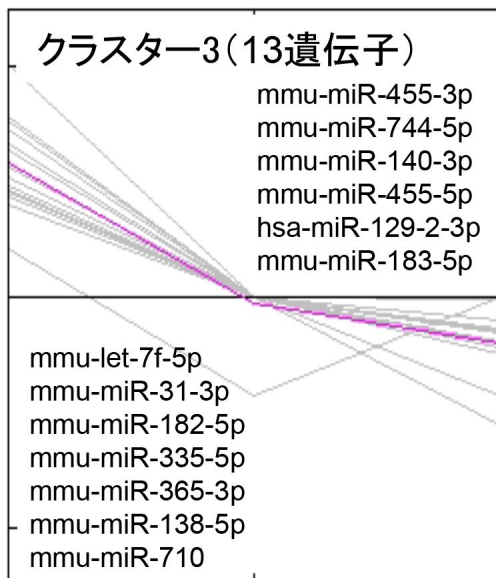
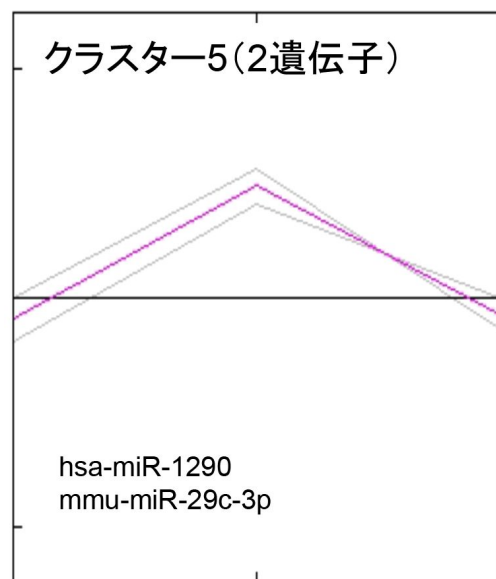
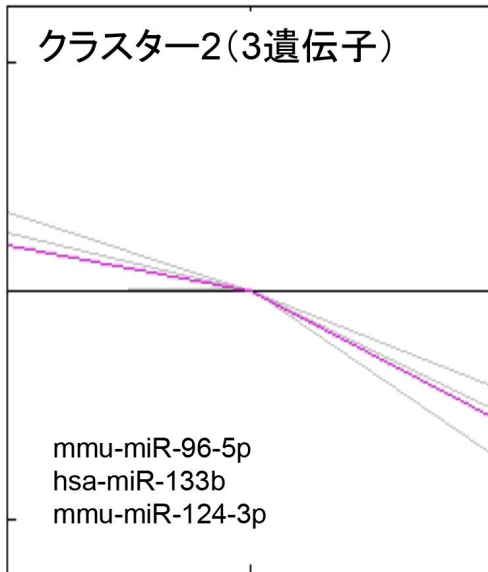
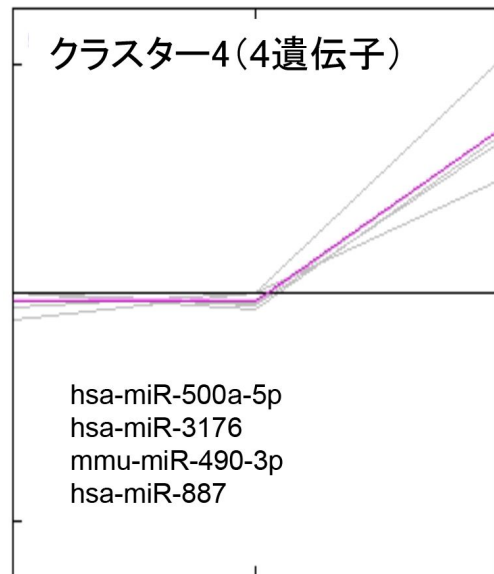
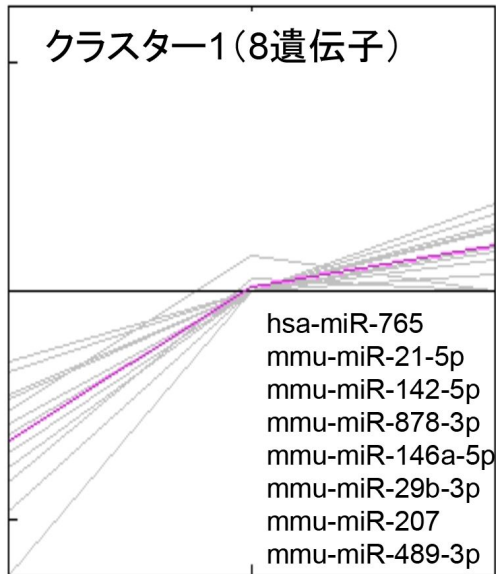
(4) 選定されたクラスターに含まれる遺伝子に対して、C57BL/6とC3H/Heの蝸牛からmiRNAを抽出し、定量PCRによる発現量の比較を行った。定量PCRにあたり、最初にマイクロチューブ内の細胞を粉砕した。その後、MirVana™RNA isolation kit(Invitrogen)にてtotal RNAを分離した。Total RNAをDNase I(Invitrogen)で処理し、MirVana qRT-PCR miRNA-specific RT-primerとSuperScript III Reverse Transcriptase(Invitrogen)にて逆転写した。

## 4. 研究成果

(1) 非階層クラスター分析を行い、老人性難聴に関与しうる6つのクラスター(図参照)を選別した。

(2) 6つのクラスターの中で3つのクラスター(クラスター1、クラスター5、クラスター6)の中の12のmiRNAでは、月齢1カ月から10カ月の間にmiRNA発現が上昇していた。

(3) これらの12miRNAを対象として、加齢性難聴モデルマウスC57BL/6と非加齢性難聴モデルマウスC3H/HeにおけるmiRNA発現を比較した。



(4)経時的に発現が低下するクラスター(2、3)には miR-183、-182、-96(蝸牛有毛細胞に発現)、miR-124(蝸牛・前庭神経節に発現)が含まれ、これらは加齢に伴う細胞の変性・消失に対応する変化と考えられた。

#### 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 1 件)

Honda K, Noguchi Y, Kawashima Y, Takahashi M, Nishio A, Kitamura K. Ex vivo visualization of the mouse otoconial layer compared to micro-computed tomography. *Otology and Neurotology* 36: 311-317, 2015, 査読有

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

野口 佳裕 (NOGUCHI, Yoshihiro)  
信州大学・医学部・特任教授  
研究者番号：50282752

##### (2)研究協力者

喜多村 健 (KITAMURA, Ken)  
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：90010470

西尾 綾子 (NISHIO, Ayako)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：00611576

本田 圭司 (HONDA, Keiji)  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：90621079