

令和 3 年 6 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18802

研究課題名(和文) Pathophysiology and novel drug development targeting deafness-associated potassium channel KCNQ4

研究課題名(英文) Pathophysiology and novel drug development targeting deafness-associated potassium channel KCNQ4

研究代表者

デイ ティモシー (Timothy, Day)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：00838667

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)：本研究は、優性遺伝形式をとる日本人難聴患者より見出されたKCNQ4遺伝子変異の病態および疾患発症メカニズムを明らかにするとともに、治療のためのモデル動物を確立することを目的として研究を行った。CRISPR-Cas9を用いてオルソロガスな変異を導入したKCNQ4ノックインモデルマウス確立するとともに、聴性脳幹反応を用いた聴力の測定、耳音響放射を用いた外有毛細胞の機能解析を行った。その結果、変異をhomoで有するモデルマウスは、コントロールおよびheteroで有するモデルマウスと比較し、有意に聴力が悪く、難聴は生後から始まり、進行的に増悪し2ヶ月齢では重度難聴になることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、常染色体優性遺伝形式をとる日本人難聴患者に比較的高頻度に認められるKCNQ4遺伝子変異を導入したモデルマウスを確立するとともに、その聴力を経時的に測定し、また、病理組織の観察を行った。得られた情報は将来的な治療法(遺伝子治療等)を確立するための基盤として有用であると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have completed experimental testing for data in the project titled “Pathophysiology and novel drug development targeting deafness-associated potassium channel KCNQ4”. Using the KCNQ4 c.211delC knock-in mouse we collected all auditory brain stem response (ABR), and otoacoustic radiation (DPOAE). The KCNQ4 c.211delC mice had significant hearing loss compared to wild-type control and heterozygous control mice. Hearing loss began shortly after birth, and the mice were deaf by 2 months old. DPOAE results indicate loss of outer hair cells (OHC). Inner ear cellular composition was examined by confocal microscopy to visualize loss of OHC. The project is currently in manuscript preparation for publication in a peer reviewed journal.

研究分野：分子生物学

キーワード：難聴 遺伝子 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

難聴は newborn 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い疾患である。原因としては少なくとも 60% 程度に遺伝子が関与していることが知られており、現在までに 100 種類を超える原因遺伝子が報告されている。また、後天発症（遅発性）の難聴にも原因遺伝子が関与することが明らかとなっており、我が国では若年発症型両側性感音難聴を引き起こす原因遺伝子として 7 種類の遺伝子（*ACTG1* 遺伝子、*CDH23* 遺伝子、*COCH* 遺伝子、*KCNQ4* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*TMPRSS3* 遺伝子、*WFS1* 遺伝子）の関与が報告されている。

KCNQ4 遺伝子は、常染色体優性遺伝形式をとる非症候群性感音難聴（DFNA2）の原因遺伝子である。臨床的には後天発症（6 歳以後）の進行性難聴であり、聴力像としては高音漸減型と高音急墜型の報告があるが、*KCNQ4* 遺伝子変異や家系の報告は少なく希少であるため、その病態等の詳細は明らかにはなっていない。日本人難聴患者の遺伝子解析の結果、*KCNQ4* 遺伝子お c.211delC 変異が複数家系から見出された recurrent 変異であることが明らかとなっており、また、ハプロタイプ解析の結果、創始者変異であることが明らかとなっている（Naito *et al.*, 20013）

KCNQ4 遺伝子から産生される蛋白質は蝸牛内の有毛細胞（特に外有毛細胞）に発現し、細胞膜上のカリウムイオンチャンネルとして働くことが明らかになっており、内リンパから流入したカリウムイオンを排出し、蝸牛内電位を適切に維持するのに重要な働きを担っていると考えられている。*KCNQ4* 遺伝子変異によりこのカリウムイオンのリサイクルが障害され、蝸牛内電位を維持できなくなり難聴が起きると考えられている。特に、カリウムが通過する領域を担う P-LOOP 領域や通過を制御する電位センサー部が特定されており、これらの領域の変異が優性阻害効果による難聴を引き起こすと考えられていたが（図 1）、近年では欠失・挿入変異などの機能喪失型変異（Loss Of Function 変異：LOF 変異）の報告も多く、優性阻害効果ではなくハプロ不全が疾患のメカニズムとして推定されるなど、病態に関しても不明確な点が多い。

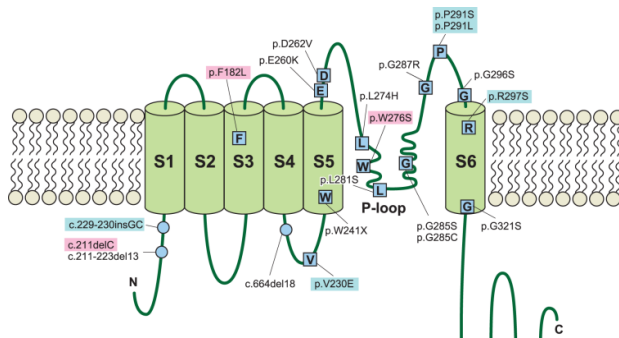


図 1 *KCNQ4* タンパクのドメイン構造

KCNQ4 タンパクは 6 回膜貫通型のイオンチャンネルをコードしており、P-Loop 領域が K⁺イオンの通過するポアと考えられている。従来、P-loop 領域のミスセンス変異が多く報告されており、優性阻害効果による病態が考えられていたが、欠失・挿入変異が多くみつかるようになり、ハプロ不全による疾患発症の可能性も考えられるようになっており、意見が対立している。

2. 研究の目的

前述のように、従来 *KCNQ4* 遺伝子変異による難聴は常染色体優性遺伝形式をとる進行性難聴を呈することから、P-loop 領域および周辺の膜貫通ドメインにある電位センサー部のミスセンス変異の報告が多いことから、優性阻害効果（ドミナントネガティブ）による病態メカニズムが想定されていた。その後、欠失・挿入変異、ナンセンス変異などの機能喪失型変異（LOF 変異）の報告が増加してきており、ハプロ不全（haplo-insufficiency）による疾患発症のメカニズムが推定されるなど、一定の見解を得ていない。

我々は、日本人難聴患者を対象に *KCNQ4* 遺伝子の解析を行った結果、複数の家系より、c.211delC 変異（図 1）を見出し報告してきた（Naito *et al.*, 2013）。そこで、本研究では、優性遺伝形式をとる複数の日本人難聴患者より見出された *KCNQ4* 遺伝子 c.211delC 変異の病態および疾患発症メカニズムを明らかにすることを目的に、モデルマウスを用いた検討および細胞への遺伝子導入実験を行い疾患発症のメカニズムに関する研究を行った。

3. 研究の方法

モデル動物の作出・聴力測定

KCNQ4 遺伝子変異による難聴の発症メカニズムに関して明らかにすることを目的に、複

数の日本人難聴患者より見出された *KCNQ4*: c.211delC 変異と相同な塩基に変異を有する KI モデルマウスを CRISPR-Cas9 系を用いて導入する。得られたモデルマウスを戻し交配して、off target 変異を減らし系代維持する。遺伝子型は変異周辺部位に設計したプライマーを用いて PCR を行い、制限酵素 (*Hae*III) で PCR 産物を切断することで、断片長多型により判別を行う。10 世代戻し交配を行った後に、hetero 接合体のマウスを掛け合わせ、homo 型、hetero 型、control を得て、1 週間おきに聴性脳幹反応 (ABR) を用いた聴力の測定、耳音響放射 (DPOAE) を用いた外有毛細胞の機能解析を行った。また、前述の手法で確立したモデルマウスを用いて、homo 型、hetero 型および control を深麻酔下にて解剖し、蝸牛骨包を摘出する。EDTA-2Na を用いて脱灰した後に、OCT コンパウンドに包埋して凍結切片を作成した。得られた凍結切片を用い、抗 *KCNQ4* 抗体、ファロイジン (アクチン繊維を染色)、DAPI (核を染色) を用いて染色の後に蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

本研究は、優性遺伝形式をとる複数の日本人難聴患者より見出された *KCNQ4* 遺伝子変異 (c.211delC 変異) の病態および疾患発症メカニズムを明らかにするとともに、治療のためのモデル動物を確立することを目的に、CRISPR-Cas9 を用いてオルソロガスな変異を導入した *Kcnq4* ノックインモデルマウス確立した (図 2)

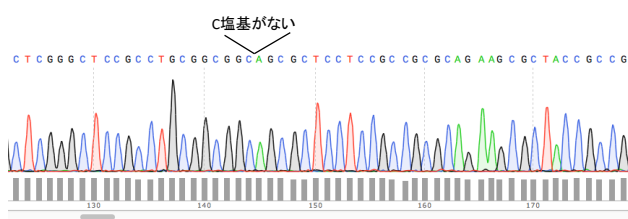


図2 *Kcnq4*モデルマウスのシーケンス

本研究では CRISPR-Cas9 系を用いて、日本人難聴患者に比較的多く見つかる *KCNQ4*:c.211delC 変異を導入したモデルマウスを作成した。変異は PCR-RFLP で確認するとともに直接シーケンスを行い、正しい位置に変異が導入されていることを確認した。

また、確立した *Kcnq4* ノックインモデルマウスを用いて聴性脳幹反応 (ABR) を用いた聴力の測定、耳音響放射 (DPOAE) を用いた外有毛細胞の機能解析を行った。その結果、変異を homo で有するモデルマウスは、コントロールおよび hetero で有するモデルマウスと比較し、有意に聴力が悪く、難聴は生後から始まり、進行的に増悪し 2 ヶ月齢では重度難聴になることを明らかにした (図 3)。

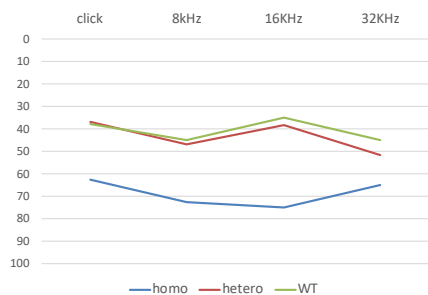


図3 *Kcnq4*モデルマウスの聴力

本研究で作出したモデルマウス (4 週齢) の聴力を示す。変異を homo で有するモデルマウスは、コントロールおよび hetero で有するモデルマウスと比較し、有意に聴力が悪い。

得られた結果より、homo 型では難聴を呈するのに対し、hetero 型では難聴を呈していないという結果であったことより、少なくともマウスにおいては常染色体優性遺伝形式を呈するモデルとはなっていない。過去の報告では *Kcnq4* 遺伝子のノックアウトマウスにおいて、同様に hetero 型では難聴を呈さないのに対し、homo 型では難聴を呈するという報告と一致する結果であった。したがって、少なくともマウスにおいてはハプロ不全による難聴という病態では無いことが明らかとなった。考えられる理由としては、1) ヒトでは、c.211delC によるフレームシフト変異はすぐに終止コドンを生じず、読み取り枠がずれたまま 68 アミノ酸後に終止コドンが生じると考えられる。通常であればこのような mRNA は速やかに NMD で分解されるが、変異の配列により、不完全なタンパクが合成され、優性阻害効果を引き起こしている。2) ヒトとマウスで内耳における役割が異なるという 2 つの可能性が考えられた。

参考文献

Naito T et al., Comprehensive genetic screening of *KCNQ4* in a large autosomal dominant nonsyndromic hearing loss cohort: genotype-phenotype correlations and a founder mutation. *PLoS One*. 2013;8(5):e63231.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyajima H, Moteki H, Day T, Nishio SY, et al	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel ACTG1 mutations in patients identified by massively parallel DNA sequencing cause progressive hearing loss.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63690-5.	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 -

1. 著者名 Oka SI, Day TF, Nishio SY, Moteki H, et al	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical Characteristics and In Vitro Analysis of MYO6 Variants Causing Late-Onset Progressive Hearing Loss.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11030273.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Day Timothy, 岡晋一郎、宮嶋宏樹、北尻真一郎、西尾信哉、宇佐美真一
2. 発表標題 Molecular investigations of deafness-related genes ACTG1 and MYO6 in vitro
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮嶋宏樹、茂木英明、Timothy Day, 西尾信哉、北尻真一郎、宇佐美真一
2. 発表標題 ACTG1変異による難聴症例の臨床像と変位型 アクチンの細胞内局在
3. 学会等名 第64回 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Day T.F. Oka S, Kitajiri S, Moteki H, Nishio S, Usami SI
2. 発表標題 Identification of Hearing-Loss Associated Mutations in MYO6 and IN Vitro Functional Analysis.
3. 学会等名 43th ANNUAL MidWinter Meeting
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------