

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04291

研究課題名(和文) マウス順遺伝学の技術革新に基づく難聴の発症原因解明と聴力正常化近交系の樹立

研究課題名(英文) Identification of genetic risk factors and phenotypic rescue of deaf mutant mice based on technological innovations of the forward genetics approach

研究代表者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20280787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くの近交系マウスは遺伝的背景に潜在するゲノム多型の効果によって難聴を発症する。本研究ではコンソミック系統、ゲノム編集およびアレル発現量の定量を取り入れた順遺伝学的アプローチを用いて近交系マウスの難聴発症に関与するゲノム多型の同定を試みた。本研究のアプローチはB6マウスの難聴発症の解明に特に有効であった。我々はカドヘリン23遺伝子の多型のゲノム編集とMSMマウス由来の第12番染色体ゲノム領域の導入によってB6マウスの聴力をMSMレベルまで正常化すること、およびコンジェニックマッピングとアレル発現量データを活用することによって第12番染色体に新たな難聴発症関連遺伝子の候補を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Several inbred strains of mice develop hearing loss (HL) caused by genomic polymorphisms accompanying their genetic backgrounds. To identify the genomic polymorphisms associated with the development of HL, we challenged technological innovations of the forward genetics approach adapted using consomic/congenic mapping, allele-specific gene expression analysis, and genome editing. In particular, this approach was powerful for the identification of genes that are responsible and can rescue HL in C57BL/6J (B6) mice. We discovered that substitutions in a genomic region of chromosome 10 (Chr10) and 12 (Chr12) of MSM/Ms (MSM) mice reduced the symptoms of HL in B6 mice. Moreover, the HL in B6 mice were completely rescued by genome editing of a polymorphism in the gene encoding Cadherin 23 on Chr10 and a genomic substitution of MSM-derived Chr12. In addition, we identified candidate genes on Chr12 associated with HL by congenic mapping and allele-specific gene expression analysis.

研究分野：実験動物学

キーワード：実験動物学 遺伝学 難聴 ゲノム編集 アレル発現量比較 コンソミックマウス カドヘリン23

1. 研究開始当初の背景

表現型を出発点とする順遺伝学は、遺伝子改変技術に基づく逆遺伝学とともにマウス遺伝学の両輪として、遺伝子の機能解明に大きく貢献してきた。また、マウスのゲノム情報基盤が整備されたことから、順遺伝学的手法によって表現型から発症原因遺伝子に辿り着く作業は比較的容易なものとなった。しかし、これまで同定された遺伝子の大多数は単一変異によって発症したものであり、多因子疾患の解明、量的形質遺伝子座 (QTL) の実態解明はいまだ困難な状況にあり¹、このような QTL 同定の難しさは本研究で標的とする聴力の表現型においても同様である。

一方で、僅かではあるが成功例も報告されており、その成功例には共通点がみられる。第1の共通点は、成功例においては遺伝的背景に存在する効果の強い QTL の効果を考慮した実験系を用いている。近交系マウスにおいては、多くの系統が難聴を発症することが知られているが、主要な難聴発症原因はカドヘリン 23 遺伝子のゲノム多型 (*Cdh23*^{c.753G>A}) である²⁻⁴。従って、これまで近交系の QTL 同定の成功例は *Cdh23*^{c.753G>A} の効果を共通に保有する系統間交配を用いて QTL マッピングが実施されたものである⁵⁻⁷。しかし、この実験系で同定された遺伝子変異は表現型への作用が大きい QTL であった。第2の共通点は、成功例における多くの場合には共通してリコンビナント近交系およびコンソミックなどの QTL 解析用システムの活用していた⁶⁻⁸。特にコンソミック系統は1対の染色体領域を除き、均一の遺伝的背景で QTL 解析を実施することが可能である⁸⁻¹⁰。しかし、これまで開発されたコンソミック系統の受容系統である C57BL/6 (B6) は *Cdh23*^{c.753G>A} を保有するため、これが解析のノイズとなるケースも想定される。第3の共通点は、QTL に作用するゲノム多型の同定に辿り着いた例は、多型が翻訳領域内に存在していた^{4, 11-13}。しかし、QTL の染色体上の位置が同定されても QTL に作用する多型が翻訳領域に存在しない場合、その同定は極めて困難である。実際に、Keane ら¹⁴ は、多くの QTL の原因はイントロンや翻訳領域から離れた遺伝子座間に存在していることを明らかにした。この事実は表現型への QTL の作用の多くが遺伝子発現量を制御するシス配列の多型が原因であることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、QTL 解析の技術革新に基づく聴力の表現型に作用する QTL の同定を主要目的とした。詳細な目的は以下の通りである。

- (1) B6 マウスの1対の染色体を日本産野生マウス由来の近交系である MSM/M \times (MSM) の染色体に置換したコンソミック系統を

基盤とした QTL 解析に、*Cdh23*^{c.753G>A} などの機能ゲノム多型のゲノム編集を組み合わせ、難聴発症に關与するゲノム多型を同定する。

- (2) 聴覚の基盤となる内耳に発現する遺伝子において B6-MSM 間のアレル特異的発現量を正確に定量し、QTL の位置的マッピング情報と統合することで QTL に作用となるゲノム多型の同定を実現する。
- (3) 第3に、本研究では他の近交系マウスにおいても QTL マッピングにゲノム編集を活用し、新規の難聴発症関連ゲノム多型を同定する。

3. 研究の方法

- (1) 本研究で使用したマウス系統

本研究で用いた B6 および NOD/Shi (NOD) マウスは日本クレアから購入し、MSM、B6-Chr10C^{MSM} および B6-Chr12C^{MSM} コンソミックマウスは国立遺伝学研究所から導入した。加えて、Jackson shaker (*Ush1g*^{js}) マウスは研究代表者所属機関で維持しているマウスを研究に用いた。また、本研究の動物実験は所属機関の承認を得て実施した (承認番号 15046, 16064 および 17040)。

- (2) ゲノム編集

標的ゲノム多型の塩基置換のためのガイド RNA (sgRNA) は CRISPRdirect を用いてデザインし、PCR および MEGAshortscript T7 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。sgRNA と Cas9 mRNA または Cas9 タンパク質および目的の塩基置換部位を含むドナーオリゴヌクレオチドとともにマウスの受精卵前核および細胞質にマイクロインジェクションした。得られた産仔は標的配列近傍のプライマーを用いた PCR および塩基配列決定によってゲノム編集を確認後、系統化した。

- (3) 表現型解析

マウスの表現型は、主として経時的な聴性脳幹反応 (ABR) および歪成分耳音響放射 (DPOAE) の測定により解析し、走査型電子顕微鏡による内耳有毛細胞の stereocilia (不動毛) の形態観察および免疫染色による有毛細胞数の計測により補足した。

- (4) QTL マッピング

コンソミック系統を用いた QTL マッピングは B6 マウスと交配後によって得た F₂ マウスの ABR 閾値データおよび MassARRAY System (Agena Bioscience) により判定した遺伝子型データを R/qtl ソフトウェアで解析することにより行った。また、遺伝子座を同定したコンソミックは B6 との交配により遺伝子座を含むゲノム領域のコンジェニックマウスを作製し表現型を解析した。さらに、一部の解析には *Cdh23*^{c.753G>A} ゲノム編集を行い

解析した。

NOD マウスの難聴発症原因遺伝子座の QTL マッピングは、MSM マウスと交配後によって得た F₂ マウスの ABR 閾値データおよび遺伝子型データを R/qlt ソフトウェアで解析することにより行った。

(5) アレル発現量定量

本研究では、B6、MSM および B6 と MSM の交配により得た F₁ [(B6 × MSM) F₁ および (MSM × B6) F₁] マウスの内耳蝸牛から抽出した RNA を用いた。RNA はライブラリー化し、Hi-Seq2500 (Illumina) を用いて RNA-Seq 解析を行った。得られたデータは CLC ソフトウェアを用いて解析し、また、F₁ マウスから得たリードからの B6 および MSM アレルのカウントには先端ゲノム支援からの多大なサポートを受けた。

4. 研究成果

(1) *Cdh23* のゲノム多型の編集による B6 マウスの難聴発症の抑制

本研究では、第一に B6 マウスの難聴発症の主要原因となるゲノム多型と報告されている *Cdh23*^{c.753A} を MSM マウスがもつ野生型 *Cdh23*^{c.753G} へとゲノム編集した。ゲノム編集した *Cdh23*^{c.753G>A} ノックインマウスは、予想したように B6 マウスの早発・進行性難聴が抑制され、ABR 閾値は大幅に良好化した (図 1)。また、*Cdh23* は第 10 番染色体に存在するが、MSM 由来の *Cdh23*^{c.753G} アレルを含むゲノム領域を B6-Chr10C^{MSM} コンソミックマウスもほぼ同様の効果が認められた。さらに図 1 には高周波音 (32 kHz) に対する ABR 閾値のデータのみを示したが、低中周波音 (4, 8 および 16 kHz) に対する ABR も同様に回復していた。加えて、この結果は DPOAE の測定

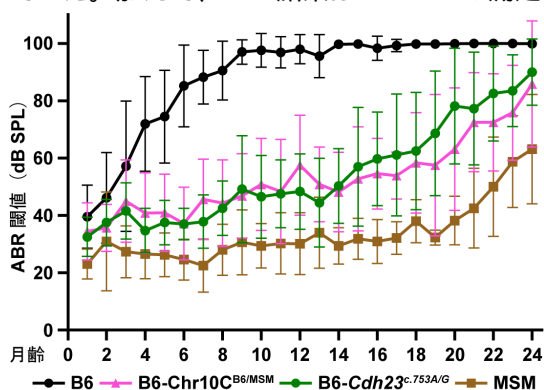


図 1. MSM 由来の第 10 番染色体ゲノム領域の導入および *Cdh23*^{c.753A>G} ゲノム編集により B6 マウスの加齢性難聴発症は抑制される。グラフは B6, B6-Chr10C^{MSM} サブコンソミック, B6-Cdh23^{c.753A} および MSM マウス間の 1~24 ヶ月齢にわたる 32kHz の刺激音に対する ABR 閾値の経時的比較を示している。

結果からも裏打ちされた。

一方、本研究では *Ush1g*^{js/+} ヘテロマウスの進行性難聴と *Cdh23*^{c.753A} アレルのホモ接合との連鎖が強く示されていたことから、作製し

た *Cdh23*^{c.753G>A} マウスを *Ush1g*^{js} マウスと交配し、表現型を解析した。その結果、得られた *Ush1g*^{js/+} ヘテロ、*Cdh23*^{c.753A/G} 二重ヘテロマウスの進行性難聴は完全に抑制され、*Ush1g*^{js/+} ヘテロマウスの進行性難聴の原因であると予想される内耳有毛細胞の不動毛の変性および外有毛細胞の脱落も認められなかった¹⁵。この結果は多型レベルでの表現型修飾を聴覚研究において実証した初めての例となり、本研究分野において国内外へ強いインパクトを与えることができた。

このように本研究の結果は *Cdh23*^{c.753A} が B6 マウスの難聴発症の主要原因であること、および難聴マウスの難聴発症を促進することを実証するものとなった。しかし、図 1 に示すように *Cdh23*^{c.753G>A} マウスの聴力は、MSM レベルまで回復することが出来なかったことから、B6 マウスの難聴発症には他のゲノム多型が関与することを強く示唆するものともなった。

(2) 新規難聴発症遺伝子座の同定候補遺伝子の抽出

次に、本研究では B6-MSM コンソミックマウスの *Cdh23*^{c.753G>A} ノックイン編集を行った。その結果、B6 マウスの第 12 番染色体のセントロメアから 72 Mb のゲノム領域を MSM マウス由来のゲノムに置換した B6-Chr12C^{MSM} サブコンソミックマウスの ABR 閾値はゲノム編集により MSM レベルまで回復した (図 2A)。この結果を受け、申請時に計画していた B6 マウスの難聴抑制効果が示唆されていた他のコンソミックマウスの解析を中断し、B6-Chr12C^{MSM} マウスの解析に集中した。

第 12 番染色体上の難聴発症と関連するゲノム多型を同定するため、QTL マッピングを行った。その結果、QTL はセントロメアから約 30 Mb の領域にマップされたが、この領域内の 2 か所に QTL の存在を示唆する LOD ピークが検出された。そこでコンジェニックマウスを作製し、表現型を解析した結果、セントロメアから最大 11.3 Mb を MSM ゲノムに置換したコンソミックマウスの難聴抑制が認められたことから、QTL はこの領域に存在することが明らかとなった。

この領域には 31 遺伝子が存在していた。そこで B6 と MSM 間のアレル発現量比較のデータを活用し、これら遺伝子のアレル発現変動を調査した。その結果、図 2B に示すように *Pfn4*, *Pomc* および *Rdh14* の有意な発現変動が確認された。そこでこの遺伝子のコード領域および非コード領域のゲノム多型を NIG Mouse Genome Database から抽出した。しかしながら、それらの遺伝子のエクソン領域、イントロン領域および発現制御領域と予測される配列に候補となるゲノム多型は検出されなかった。しかし、発現量が少ないが、両アレル間で発現差が認められる数種の遺伝子においては、エクソン内において保存性が極めて高い塩基に置換が認められ、有害変

異と評価できるアミノ酸置換も検出されたことから、これらの遺伝子を含めて今後詳細な遺伝子・タンパク質発現解析ならびにゲノム編集による表現型回復実験を進める予定である。

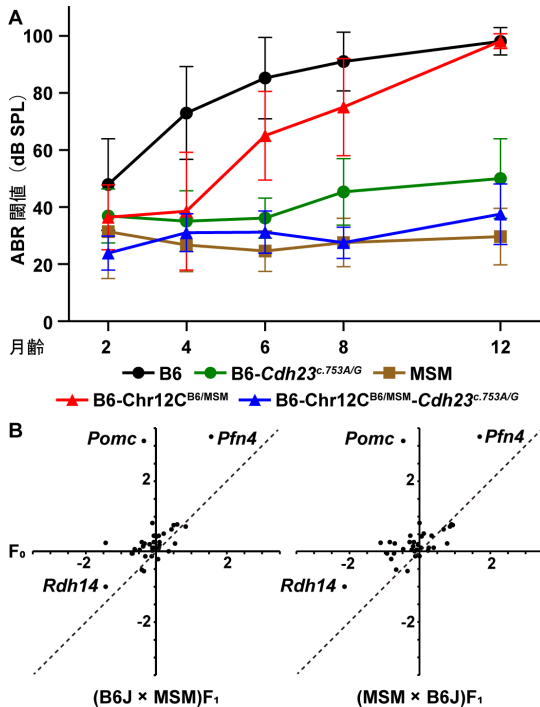


図 2. MSM 由来の第 12 番染色体ゲノム領域の導入した B6 マウス (B6-Chr12C^{MSM} サブコンソミックマウス) における *Cdh23*^{c.753A>G} ゲノム編集の相対効果によってその聴力は MSM マウスレベルに回復する。(A) B6, B6-*Cdh23*^{c.753A/G}, MSM, B6-Chr12C^{MSM} サブコンソミックおよび B6-Chr12C^{MSM}-*Cdh23*^{c.753A/G} マウス間の 2, 4, 6, 8 および 12 ヶ月齢にわたる 32kHz の刺激音に対する ABR 閾値の比較。(B) 第 12 番染色体の難聴発症関連遺伝子座に存在する遺伝子群の B6 および MSM 間のアレル発現量比較。両図ともに縦軸は F₀、左図は横軸に (MSM × B6) F₁、右図は (B6 × MSM) F₁ の MSM/B6 アレル相対発現量 (log₂) をプロットしている。

(3) B6 マウスの難聴発症関連遺伝子 *Lrrc30* の解析

本研究で計画していた B6 マウスの難聴発症関連遺伝子 *Lrrc30* のゲノム多型の編集は研究期間内に達成することができなかった。しかし、*Lrrc30* の MSM アレルを導入したトランスジェニックマウスは難聴発症がやや抑制されることが示され、今後早急にゲノム編集による表現型回復実験を実施し、解析を進めていきたい。

(4) QTL マッピングとゲノム編集による NOD マウスの新規難聴遺伝子の同定

NOD マウスは早発型・重度難聴を発症するマウスモデルであり、生後 1 ヶ月齢でほとんどの個体は失聴する。MSM との F₂ マウスを用いた QTL マッピングを実施した結果、主要難聴発症原因遺伝子座は、図 3A に示すように第 10 番染色体の *Cdh23* 近傍にマップされた。同様のデータが Johnson & Zheng⁵ によっても報告されており、NOD は *Cdh23*^{c.753A} アレ

ルをもつことから、本研究においては *Cdh23*^{c.753G>A} ノックインゲノム編集を行った。ゲノム編集の結果、4, 8 および 16 kHz の周

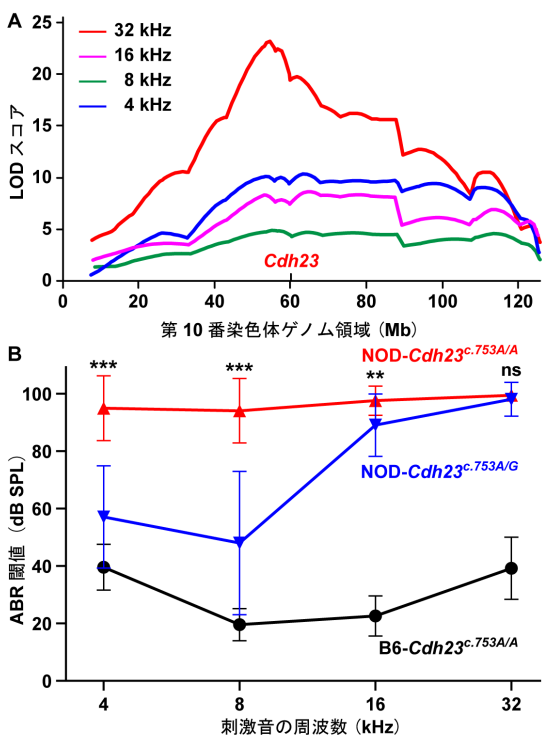


図 3. *Cdh23*^{c.753A} 変異は NOD マウスの難聴発症の一つの要因である。(A) 染色体マッピングによって同定した第 10 番染色体の *Cdh23*^{c.753A} 変異近傍の NOD マウスの難聴発症に關与する主要原因遺伝子座。(B) B6, NOD およびゲノム編集により作製した NOD-*Cdh23*^{c.753A/G} マウス間の ABR 閾値の比較。アスタリスクは NOD マウスの遺伝的背景における *Cdh23*^{c.753A/A} および *Cdh23*^{c.753A/G} 遺伝子型のマウス間の有意差を示している。***P < 0.001, **P < 0.01, ns: 有意差無し。

波数音に対する難聴発症は有意に抑制されたが、予想に反して大きな効果は認められず、特に高い周波数音ほど難聴回復効果は弱く、32 kHz の刺激音に対する難聴抑制効果は認められなかった(図 3B)。QTL マッピングの結果、32 kHz の刺激音に対する *Cdh23* 近傍の効果は極めて強かったことから(図 3A)、この領域には *Cdh23*^{c.753G>A} とは異なる NOD の難聴発症に強い効果をもつゲノム多型が存在する可能性が強く示唆された。

現在、我々は作製したゲノム編集マウスを用いて解析を進めており、NOD の難聴発症との関連が予想されるゲノム多型の同定に成功し、そのゲノム多型を編集したマウスも樹立できた。このゲノム多型が存在する遺伝子は、これまで難聴との関連が不明である遺伝子ファミリーに属していることから、本研究の成果が大きな波及効果を生むことが予想され、解析を進め成果の公表を目指す。

<引用文献>

1. Mott R, Flint J. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 14, 421-439, 2013.
2. Kikkawa Y et al. *Exp Anim*, 61, 85-98, 2012.
3. Miyasaka Y et al. *Exp Anim*, 62, 333-346,

- 2013.
4. Noben-Trauth *et al.* *Nat Genet*, 35, 21-23, 2003.
 5. Johnson KR, Zheng QY. *Genomics*, 80, 461-464, 2002.
 6. Johnson KR *et al.* *Genomics*, 92, 219-225, 2008.
 7. Zheng QY *et al.* *Neurobiol Aging*, 30, 1693-1705, 2009.
 8. Nemoto M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 1283-1288, 2004.
 9. Takada T *et al.* *Genome Res*, 18, 500-508, 2008.
 10. Takada T, Shiroishi T. *Exp Anim*, 61, 375-388, 2012.
 11. Charizopoulou N *et al.* *Nat Commun*, 2, 201, 2011.
 12. Johnson KR *et al.* *Neurobiol Aging*, 33, 1720-1729, 2012.
 13. Shin JB *et al.* *J Neurosci*, 30, 9683-9694, 2010.
 14. Keane *et al.* *Nature*, 477, 289-294, 2011.
 15. Miyasaka Y *et al.* *Hum Mol Genet*, 25, 2045-2059, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Miyasaka Y, Shitara H, Suzuki S, Yoshimoto S, Seki Y, Ohshiba Y, Okumura K, Taya C, Tokano H, Kitamura K, Takada T, Hibino H, Shiroishi T, Kominami R, Yonekawa H, Kikkawa Y: Heterozygous mutation of *Ush1g/Sans* in mice causes early-onset progressive hearing loss, which is recovered by reconstituting the strain-specific mutation in *Cdh23*. *Hum Mol Genet*, 25, 2045-2059, 2016. 査読有
DOI: 10.1093/hmg/ddw078

〔学会発表〕(計11件)

吉川欣亮: *Lrrc30* の発現量増加はマウス加齢性難聴の発症を抑制する. 第 65 回日本実験動物学会総会. 2018.
吉川欣亮: Usher 遺伝子群の内耳有毛細胞の感覚毛維持における相互作用. 蛋白研セミナー「網膜感覚研究のフロンティア」. 2018. (招待講演)
吉川欣亮: 近交系の聴力差の遺伝的要因を探る. 2017 年度遺伝研研究会「マウスとラットで拓く新しい比較実験動物学」. 2017. (招待講演)
安田俊平: B6-MSM コンソミックマウスを用いた新規加齢性難聴関連遺伝子の探索. 第 30 回モロシヌス研究会. 2017.
安田俊平: マウス 12 番染色体上に存在する新規加齢性難聴修飾遺伝子の探索. 第 64 回日本実験動物学会総会. 2017.
鈴木沙理: カドヘリン 23 の c.753 遺伝子型が異なる C57BL/6J マウス間の加齢に伴

う聴力表現型の比較. 第 64 回日本実験動物学会総会. 2017.

Yasuda SP: Intersubspecific replacement across a broad genomic region of chromosome 12 reduces symptoms of early-onset high-frequency hearing loss in C57BL/6J mice. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016.

Kikkawa Y: Heterozygous mutation of *Ush1g/Sans* in mice causes early-onset progressive hearing loss, which is rescued by reconstituting the strain-specific mutation in *Cdh23*. Inner Ear Biology Workshop 2016. 2016.

Yasuda SP: *hfh14*, a novel locus on mouse chromosome 12 affects early-onset, high frequency hearing loss. Inner Ear Biology Workshop 2016. 2016.

宮坂勇輝: マウスの遺伝的背景に潜む聴覚表現型を修飾する 1 塩基置換. 日本遺伝学会第 88 回大会. 2016. (招待講演)

宮坂勇輝: *Ush1g* ヘテロマウスの聴覚障害は *Cdh23* の 1 塩基置換により回復する. 第 63 回日本実験動物学会総会. 2016.

吉川欣亮: 成熟内耳における *Lrrc30* の高発現とマウス加齢性難聴抑制効果の関連. 第 29 回モロシヌス研究会. 2015.

〔図書〕(計2件)

Yasuda SP, Miyasaka Y, Kikkawa Y: An Excursus into Hearing Loss. IntechOpen, pp. 3-23, 2018. 査読有

DOI: 10.5772/intechopen.72469

Kikkawa Y, Miyasaka Y: Monographs in Human Genetics –Genetics of Deafness–. Karger Publishers, pp. 97-109, 2016. 査読有
DOI: 10.1159/000444568

〔その他〕

ホームページ

<http://www.igakuken.or.jp/mammal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号: 20280787

(2) 研究分担者

設楽 浩志 (SHITARA, Hiroshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・主席基盤技術研究職員
研究者番号: 90321885

高田 豊行 (TAKADA, Toyoyuki)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号: 20356257

宮坂 勇輝 (MIYASAKA, Yuki)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30778098
(平成28年度より研究分担者)

(3) 連携研究者
関 優太 (SEKI, Yuta)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・研究員
研究者番号：10615636

安田 俊平 (YASUDA, Shumpei)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・主任研究員
研究者番号：50534012

(4) 研究協力者
小原 央 (OBARA, Yo)

鈴木 沙理 (SUZUKI, Sari)