

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09336

研究課題名(和文)新規難聴遺伝子候補SLC12A2の細胞・動物モデルを用いた分子病態解析

研究課題名(英文)Molecular, Cellular, and in vivo analysis of SLC12A2, a novel candidate of deafness gene

研究代表者

務台 英樹(MUTAI, Hideki)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局等・研究員

研究者番号：60415891

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)：代表者らが同定した新規難聴原因遺伝子SLC12A2の分子病態を明らかとするため、細胞・動物モデルにより解析した。

SLC12A2産物は、イオン共輸送体として内リンパ組成の恒常性維持に必須である。本研究では1)細胞培養系を用い、SLC12A2変異体がイオン透過性を消失することを明らかにした。2)SLC12A2のexon21スプライス変異のスプライシングに対する影響を評価した。3)exon21領域にSlc12a2変異をもつ遺伝子改変マウスをゲノム編集技術により2系統作出し、一部の解析を開始した。

なお本研究成果によりSLC12A2は難聴原因DFNA78として登録された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLC12A2は、私たちが日本人難聴患者の遺伝子解析から同定した新規難聴原因候補である。本研究の成果により、SLC12A2が真の難聴遺伝子として認識され検査対象に追加されることで、難聴者の原因判明率の向上と、その知見をもととした適切な医療・療育の提供が期待できる。

SLC12A2の病的変異候補は、興味深いことに、すべてexon 21上ミスセンス変異あるいはexon 21のスプライス変異である。この部位の分子機構は未知であり、本研究および継続研究により、本遺伝子の詳細な機能が明らかとなり、学術的発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to analyze molecular dysfunction of variants of SLC12A2, a novel deafness gene that were identified in our group.

SLC12A2 encodes Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransporter 1 and plays critical roles in the homeostasis of K⁺-enriched endolymph. All SLC12A2 candidate pathogenic variants mapped to exon 21 or its 3'-splice site. In this study, all the 3 projects achieved the goals successfully; 1) In vitro functional analysis demonstrated that Cl⁻ influx was significantly decreased in all SLC12A2 variants studied. All variants were properly translocated to plasma membrane, suggesting proper protein folding without degeneration; 2) The in vitro assay system of exon 21 splicing was established; 3) Two mouse strains with each variant of Slc12a2 knocked in were generated by genome editing. Analysis of the KI mice are now ongoing in details.

SLC12A2 is now known as deafness gene DFNA78.

研究分野：耳科学

キーワード：難聴 原因遺伝子 スプライシング 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児約 500 人に 1 人の割合で発症し、その半数以上が遺伝性難聴とされている。研究代表者らは、原因不明の難聴患者家系に対する全エクソーム解析を実施し、新規原因遺伝子候補として *SLC12A2* を同定した。本遺伝子は Na⁺、K⁺、2Cl⁻ 共輸送体として、蝸牛血管条辺縁細胞で発現し細胞内イオンを取り込み、内リンパ腔へ K⁺ を放出する K⁺ チャネルと連携して内リンパ組成の恒常性維持に必須である。*Slc12a2*-ko マウスが難聴を呈する一方で、ヒト遺伝性難聴原因としての報告は今までなく、かつ予想される遺伝形式が動物モデルと異なるため、検出された 3 変異の分子機能には詳細な検証が必要である。3 変異はいずれも機能不明の一領域 (exon21) 上あるいはスプライス変異であることから、この領域の遺伝子機能に対する重要性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規難聴遺伝子候補 *SLC12A2* の変異による分子機能変化を、細胞および動物モデルの解析を通じて明らかにし、本遺伝子が優性遺伝性難聴の原因となる可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、1) *SLC12A2* 変異体の *in vitro* 分子機能解析ならびに細胞内局在の検討、2) *SLC12A2* exon21 変異体のスプライシング活性評価、3) *Slc12a2* 変異をもつ遺伝子改変動物モデルの作成と表現型解析を計画した。

1) *SLC12A2* 変異体の *in vitro* 分子機能解析ならびに細胞内局在の検討

: 細胞内 Cl⁻ 濃度により蛍光強度が変化する改変 YFP を N 末端に融合した *SLC12A2* 発現ベクターに各遺伝子変異を導入し、HEK293T 細胞を形質転換し安定的発現細胞系を構築する。細胞内への Cl⁻ 流入速度を測定し変異体と正常型間で比較する。 : で構築した細胞培養系において、組み換え *SLC12A2* の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察する。

2) *SLC12A2* exon21 スプライス変異のスプライシングに対する影響評価

SLC12A2 exon21 を含むゲノム領域を増幅し、スプライシング活性測定用ベクターに挿入し、HEK293T 細胞に導入する。転写された mRNA を RT-PCR で検出し、exon21 が各変異の影響でスプライシングにより除外されるかどうかを電気泳動法、塩基配列決定等により確認する。

3) *Slc12a2* 変異をもつ遺伝子改変動物モデルの作成と表現型解析

患者で検出されたスプライス変異と同等の突然変異をもつ遺伝子改変マウスを CRISPR/Cas9 システムを用いて作成する。ガイド RNA 設計、exon21 領域の変異導入 ssDNA、発現ベクターの調整を代表者が実施し、受精卵へのインジェクション作業を外部委託する。変異を持つ産仔をスクリーニングし、交配によりオフターゲット効果の可能性を減弱した後に聴力測定と蝸牛組織の形態、表現型の遺伝形式を解析する。

4. 研究成果

1) *SLC12A2* 変異体の *in vitro* 分子機能解析ならびに細胞内局在の検討

: 組換え *SLC12A2* 正常型発現細胞で観察された Cl⁻ 流入は、組み換え *SLC12A2* 変異体発現

細胞では著しく減少し、mock 発現細胞との有意差がなかった。すなわち各変異により SLC12A2 のイオン輸送機能が著しく阻害されていることが明らかになった。(図 1 左)

: 組み換え SLC12A2 正常型、各種 SLC12A2 変異体どちらも、HEK293T 細胞の細胞膜に局在し、細胞内でのタンパク質産生と移行には、exon 21 領域は影響を及ぼさないと考えられた(図 1 右)

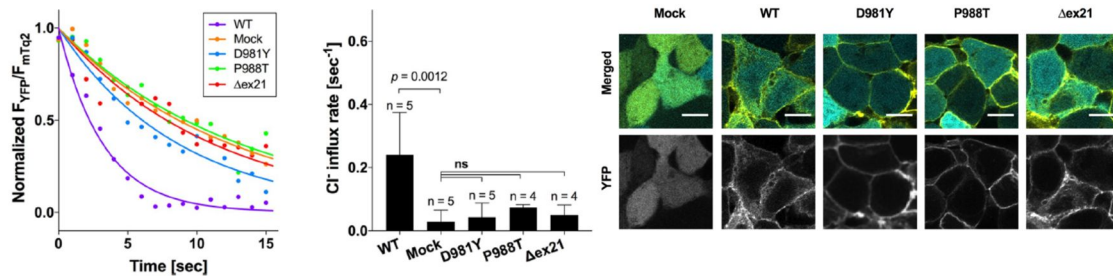


図 1 (左) SLC12A2 正常型と変異体における Cl⁻ 流入速度の計測。(右) SLC12A2 正常型と変異体の細胞膜への局在。

2) SLC12A2 exon21 スプライス変異のスプライシングに対する影響評価

スプライシング評価用ミニジーンを構築し、スプライス変異により exon21 が完全にスキップされることを RT-PCR で確認した(図 2 AB)。

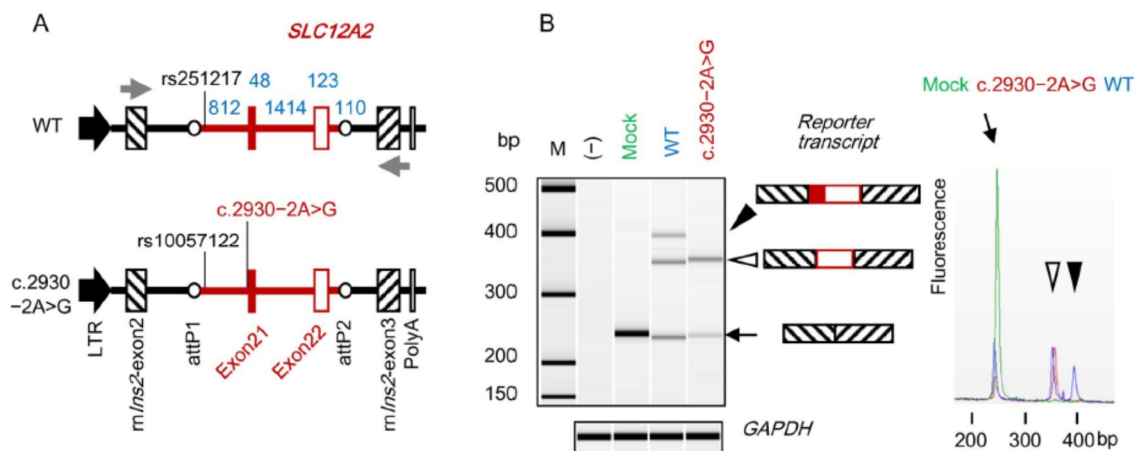


図 2 (A) スプライシング評価用ミニジーンの様式図。(B) スプライス変異により転写産物から exon21 がスキップすることの RT-PCR による確認。

3) Slc12a2 変異をもつ遺伝子改変動物モデルの作成と表現型解析

CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により 330 個のマウス受精卵に対し患者と等価の変異を導入し、これらから患者で検出されたものと同等と考えられる変異を導入した 2 系統を選択し、近交系マウスに継代維持することに成功した。2 系統ともに繁殖効率が低く、この原因の一旦は、Slc12a2 がほぼ全ての臓器で発現し、特に外分泌器官の一である前立腺などで高発現することから、それら臓器の機能が減弱していることに起因すると予想している。現在変異ホモ・ヘテロ個体について聴力測定を実施し、また内耳を中心に組織化学的解析を開始している。

なお、本研究成果は国際学術誌 PlosGenetics において発表し (2020 Plos Genet 16: e1008643)、遺伝性疾患原因 DFNA78 として登録された (2020 年 11 月 3 日、OMIM:619081)。日本人の難聴患者家系を用いた研究で、現行の厳密な基準により原因として登録されたのは初である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mutai H, Wasano K, Momozawa Y, Kamatani Y, Miya F, Masuda S, Morimoto N, Nara K, Takahashi S, Tsunoda T, Homma K, Kubo M, Matsunaga T	4. 巻 16
2. 論文標題 Variants encoding a restricted carboxy-terminal domain of SLC12A2 cause hereditary hearing loss in humans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS GENETICS	6. 最初と最後の頁 e1008643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008643	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 該当する
1. 著者名 Wasano K, Takahashi S, Rosenberg SK, Kojima T, Mutai H, Matsunaga T, Ogawa K, Homma K	4. 巻 41
2. 論文標題 Systematic quantification of the anion transport function of pendrin (SLC26A4) and its disease-associated variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hum Mut	6. 最初と最後の頁 316-331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.23930	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 該当する
1. 著者名 Shujiro B Minami, Kiyomitsu Nara, Hideki Mutai, Noriko Morimoto, Hirokazu Sakamoto, Tetsuya Takiguchi, Kimitaka Kaga, Tatsuo Matsunaga	4. 巻 704
2. 論文標題 A clinical and genetic study of 16 Japanese families with Waardenburg syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 86-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2019.04.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hideki Mutai, Fuyuki Miya, Hiroaki Shibata, Yasuhiro Yasutomi, Tatsuhiko Tsunoda, Tatsuo Matsunaga	4. 巻 8
2. 論文標題 Gene expression dataset for whole cochlea of Macaca fascicularis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-33985-9	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 Kyoko Kitao, Hideki Mutai, Kazunori Namba, Noriko Morimoto, Astuko Nakano, Yukiko Arimoto, Tomoko Sugiuchi, Sawako Masuda, Yasuhide Okamoto, Noriko Morita, Hirokazu Sakamoto, Tomoko Shintani, Satoshi Fukuda, Kimitaka Kaga, Tatsuo Mastunaga	4. 巻 Epub
2. 論文標題 Deterioration in Distortion Product Otoacoustic Emissions in Auditory Neuropathy Patients with Distinct Clinical and Genetic Backgrounds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ear and Hearing	6. 最初と最後の頁 Epub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/AUD.0000000000000586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noriomi Suzuki, Hideki Mutai, Fuyuki Miya, Tatsuhiko Tsunoda, Hiroshi Terashima, Noriko Morimoto, and Tatsuo Matsunaga	4. 巻 18
2. 論文標題 A case report of reversible generalized seizures in a patient with Waardenburg syndrome associated with a novel nonsense mutation in the penultimate exon of SOX10	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Pediatrics	6. 最初と最後の頁 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12887-018-1139-2	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 Daichi Shigemizu, Fuyuki Miya, Shintaro Akiyama, Shujiro Okuda, Keith Boroevich, Akihiro Fujimoto, Hidewaki Nakagawa, Kouichi Ozaki, Shumpei Niida, Yonehiro Kanemura, Nobuhiko Okamoto, Shinji Saitoh, Mitsuhiro Kato, Mami Yamasaki, Tatsuo Matsunaga, Hideki Mutai, Kenjiro Kosaki, and Tatsuhiko Tsunoda	4. 巻 8
2. 論文標題 IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23978-z	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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 務台英樹、松永達雄
2. 発表標題 壺長類蝸牛における高発現遺伝子群の探索
3. 学会等名 第29回日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永達雄、奈良清光、務台英樹、細谷誠、小川郁、加我君孝
2. 発表標題 国際研究チームによる164難聴遺伝子・疾患の組み合わせに対する臨床的妥当性の評価
3. 学会等名 第29回日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本陽介、奈良清光、和佐野浩一郎、南修司郎、務台英樹、松永達雄
2. 発表標題 極めて希少な遺伝子の病原性バリエントが原因として疑われた難聴の1家系
3. 学会等名 第29回日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎泰士、和佐野浩一郎、松永達雄、務台英樹、奈良清光、平賀良彦
2. 発表標題 NLRP3遺伝子に原因variantを同定したクリオピリン関連周期熱症候群症例の長期聴力経過の検討
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永達雄、奈良清光、務台英樹、井上沙聡、山本修子、和佐野浩一郎、南修司郎、加我君孝
2. 発表標題 病的意義不明GJB2遺伝子バリエントの解釈への国際共同研究による挑戦と成
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuko Katoh-Fukui, Hideki Mutai, Maki Fukami
2. 発表標題 Multiple defects observed in postnatal Cbx2cterm/cterm mice
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Noguchi, Masato Fujioka, Naoki Oishi, Hideki Mutai, Kiyomitsu Nara, Tatsuo Matsunaga, Kaoru Ogawa, Koichiro Wasano
2. 発表標題 Investigating the effects of exonic and intronic variants of NF2 on pre-mRNA splicing
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 43rd Mid Winter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuo Matsunaga, Hideki Mutai, Kiyomitsu Nara, Koichiro Wasano, Shujiro Minami, Kimitaka Kaga
2. 発表標題 Elucidation of Genetic Background and Phenotypic Features in Patients with Hereditary Hearing Loss to Improve Diagnosis and Care
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 43rd Mid Winter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichiro Wasano, Takashi Kojima, Satoe Takahashi, Hideki Mutai, Tatsuo Matsunaga, Kazuaki Homma
2. 発表標題 Investigating the effects of exonic single nucleotide variants of SLC26A4 on pre-mRNA splicing
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 43rd Mid Winter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 務台英樹、和佐野浩一郎、奈良清光、松永達雄
2. 発表標題 Exome解析により同定された新規難聴原因候補SLC12A2変異とその機能解析
3. 学会等名 第28回日本耳科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 務台英樹、和佐野浩一郎、桃沢幸秀、鎌谷洋一郎、宮冬樹、奈良清光、角田達彦、本間和明、久保充明、松永達雄
2. 発表標題 Whole Exome Sequencingにより同定された新規難聴原因候補SLC12A2とその変異
3. 学会等名 第63回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 務台英樹、和佐野浩一郎、桃沢幸秀、鎌谷洋一郎、宮冬樹、奈良清光、高橋里枝、角田達彦、本間和明、久保充明、松永達雄
2. 発表標題 3家系より同定された新規難聴原因候補SLC12A2と変異の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Katoh-Fukui, Hideki Mutai and Maki Fukami
2. 発表標題 Multiple defects observed in postnatal Cbx2 ^{cterm} /cterm mice
3. 学会等名 2nd INFRAFRONTIER / IMPC Stakeholder Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideki Mutai, Koichiro Wasano, Yukihide Momozawa, Yoichiro Kamatani, Fuyuki Miya, Sawako Masuda, Noriko Morimoto, Kiyomitsu Nara, Satoe Takahashi, Tatsuhiko Tsunoda, Kazuaki Homma, Mitsuaki Kubo, Tatsuo Matsunaga
2. 発表標題 Identification of SLC12A2 as a candidate of deafness gene in human
3. 学会等名 42nd Annual Midwinter Meeting, Association for Research in Otolaryngology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 務台英樹、和佐野浩一郎、松永達雄
2. 発表標題 難聴原因遺伝子候補SLC12A2モデル動物の作成
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松永達雄、和佐野浩一郎、務台英樹、南修司郎、加我君孝
2. 発表標題 視覚聴覚二重障害の医療向上への取り組み～難病プラットフォームによる全国多施設レジストリ～
3. 学会等名 第30回日本耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shujiro Minami, Satomi Inoue, Kiyomitsu Nara, Hideki Mutai, Tatsuo Matsunaga
2. 発表標題 Clinical and molecular characterization of a Japanese patient with auditory neuropathy spectrum disorder associated with m.7471dupC heteroplasmy
3. 学会等名 第65回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuo Matsunaga, Nobuko Yamamoto, Hideki Mutai, Kazunori Namba, Fumiyuki Goto, Kaoru Ogawa
2. 発表標題 Phenotypic presentation of DFNA11 at diverse stages of development and aging
3. 学会等名 第65回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>先天性難聴の新たな原因遺伝子を発見 - 新生児の難聴の原因診断、早期医療へ - https://kyodonewsprwire.jp/release/202002267270 先天性難聴の新たな原因遺伝子を発見 https://research-er.jp/articles/view/88239 先天性難聴の新たな原因遺伝子を発見 https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20200629.html</p>

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
連携研究者	和佐野 浩一郎 (Wasano Koichiro) (40528866)	独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・999・室長 (82643)	

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