

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10773

研究課題名(和文) 蝸牛神経低形成の新規原因候補ZBTB10の内耳発生における機能解析

研究課題名(英文) Molecular functional analysis of ZBTB10, the novel candidate deafness gene associated with cochlear nerve hypoplasia

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では蝸牛神経低形成を伴う難聴患者において、エクソーム解析により新規の難聴原因候補遺伝子ZBTB10を同定し、その解析を行った。ZBTB10は蝸牛神経細胞で発現しており、神経芽腫細胞NB-1の神経突起伸張時にZBTB10発現量が上昇していた。ただしゲノム編集技術により作出したZbtb10mut/+マウスは聴力正常であった。胎仔期14.5日齢(E14.5)時点で変異ホモマウス全例と変異ヘテロマウスの半数が死亡していた。Zbtb10は胎仔生存に重要な役割をもつと予想された。今後、E9.5変異マウスを得、脳・耳胞・生殖細胞系列等を対象とした組織化学的解析を続行し論文にまとめる予定である。

研究成果の概要(英文)：We have identified ZBTB10 as a candidate of novel deafness gene from a patient with cochlear nerve hypoplasia using whole exome analysis. ZBTB10 appeared to be expressed in the cochlear nerve. ZBTB10 expression was increased during nerve elongation of neuroblastoma NB1 cells. Zbtb10mut/+ mouse generated by CRISPR/Cas9 showed normal hearing. Low reproduction rate and anatomical observation suggests that the gene also affect proper function of ovary. All the Zbtb10mut/mut and half the number of Zbtb10mut/+ embryos seemed to be dead by the embryonic day 14.5 (E14.5). Zbtb10 appeared to be critical for early embryogenesis. We are now conducting histochemical study focusing on development of the brain, otocyst, and primordial germ line cells at E9.5. We will accumulate, analyze the data and report the results to the public soon.

研究分野：分子生物学

キーワード：内耳奇形 蝸牛神経 難聴遺伝子 神経芽腫細胞 ゲノム編集 胎生致死

#### 1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1,000 人に 1 人の割合で発症し、原因遺伝子が 70 種類以上同定されているが、奇形を伴う難聴の原因はまだ数種類しか発見されておらず、多くは原因不明である。当研究室では、これまで難聴家系 1,700 家系以上の遺伝子解析を実施してきた。今回、次世代シーケンサーを用いたヒト全遺伝子(エクソーム)解析により、新規の難聴原因遺伝子候補 *ZBTB10* の発見に至った。本研究の成果は内耳発生ならびに内耳奇形発症の分子機序に対する理解を深め、より正確な難聴遺伝子診断法や分子標的療法の開発へとつながることが期待される。

#### 2. 研究の目的

内耳奇形を伴う難聴のほとんどは原因不明である。申請者らは蝸牛神経低形成を伴う難聴患者において、エクソーム解析により新規の難聴原因候補遺伝子 *ZBTB10* を同定し、これが蝸牛神経細胞で発現していることを確認している。本研究は、*ZBTB10* の内耳形態形成における役割を解析することを目的とする。神経突起伸長中の神経細胞および胎仔マウスの発達中内耳に対して本遺伝子の機能阻害実験をおこない、その影響を形態学的・組織化学的な解析を通じて明らかにする。

#### 3. 研究の方法

(1) 神経細胞の突起伸長時における *ZBTB10* の役割の解明を目的とし、RNA 干渉法を用いた発現抑制実験により、神経突起伸長および細胞生存に対する影響を検討する。

(2) マウス内耳発生に対する *ZBTB10* の役割の解明を目的とし、*Zbtb10* 変異マウスを CRISPR-Cas9 法にて作成し、胎仔および生後マウスの内耳形態、および聴力に対する影響、その他表現型を野生型マウスと比較検討する。

(3) 類似症状を伴う難聴患者の *ZBTB10* 遺伝子解析を実施し、内耳奇形を伴う難聴者の 5 家系で本遺伝子を解析し、本遺伝子の変異が疾患と関連するかどうか検討する

#### 4. 研究成果

本研究では蝸牛神経低形成を伴う難聴患者において、エクソーム解析により新規の難聴原因候補遺伝子 *ZBTB10* を同定し、その解析を行った。

(1) *ZBTB10* は蝸牛神経細胞で発現しており、神経芽腫細胞 NB-1 の神経突起伸長時に *ZBTB10* 発現量が上昇していた。shRNA による抑制実験では神経突起伸長に対する有意な変化は見られなかった。

(2) ゲノム編集技術により作出した *Zbtb10*<sup>mut/+</sup> マウスは聴力正常であり、繁殖能力が顕著に低下していた。胎仔期 14.5 日齢 (E14.5) 時点で変異ホモマウス全例と変異ヘテロマウスの半数が死亡していた。*Zbtb10* は胎仔生存に重要な役割をもつと

予想された。

(3) 一方、類似症状を伴う難聴患者 2 家系については、*ZBTB10* 病的変異は見つからず、他の要因による難聴発症が考えられた。

#### 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 14 件)

**High-level heteroplasmy for the m.7445A>G mitochondrial DNA mutation can cause progressive sensorineural hearing loss in infancy**

Kana Matsushima, Atsuko Nakano, Yukiko Arimoto, Hideki Mutai, Kazuki Yamazawa, Kei Murayama, Tatsuo Matsunaga, *Int J Pediatr ORL*. 108 (2018) 125-131 査読あり  
doi: 10.1016/j.ijporl.2018.02.037

**Spontaneous intramural duodenal hematoma as the manifestation of Noonan syndrome**

Kazuki Yamazawa, Yohei Yamada, Tatsuo Kuroda, Hideki Mutai, Tatsuo Matsunaga, Osamu Komiyama, Takao Takahashi *Am J Med Genet A*. 2018 176(2):496-498. 査読あり doi: 10.1002/ajmg.a.38556  
IF(2016): 2.259

**Prevalence of TECTA mutation in patients with mid-frequency sensorineural hearing loss.**

Yamamoto N, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S, Nishi Y, Nakano A, Masuda S, Fujioka M, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 25;12(1):157. 査読あり  
doi: 10.1186/s13023-017-0708-z.

**Homozygous EDNRB Mutation in a Patient with Waardenburg Syndrome Type 1**

Noriko Morimoto, Hideki Mutai, Kazunori Namba, Hiroki Kaneko, Rika Kosaki, Tatsuo Matsunaga. 2017 *Auris Nasus Larynx*, 2018 45(2):222-226. 査読あり  
doi: 10.1016/j.anl.2017.03.022.

**Microbiomes of The Normal Middle Ear and Chronic Otitis Media**

Shujiro B. Minami, Hideki Mutai, Tomoko Suzuki Arata Horii, Naoki Oishi, Koichiro Wasano, Motoyasu Katsura, Fujinobu Tanaka, Tetsuya Takiguchi, Masato Fujii, Kimitaka Kaga. 2017 *Laryngoscope*, 2017 Oct;127(10):E371-E377. 査読あり  
doi: 10.1002/lary.26579. Epub 2017 Apr 11

**WFS1 and GJB2 mutations in patients with**

**bilateral low-frequency sensorineural hearing loss**

Natsuko Kasakura-Kimura, Masatsugu Masuda, Hideki Mutai, Sawako Masuda, Noriko Morimoto, Noboru Ogahara, Hayato Misawa, Hirokazu Sakamoto, Koichiro Saito, Tatsuo Matsunaga. *Laryngoscope* 2017 127(9):E324-E329. 査読あり  
doi: 10.1002/lary.26528.

**Mitochondrial mutations in maternally inherited hearing loss**

Hideki Mutai, Takahisa Watabe, Kenjiro Kosaki, Kaoru Ogawa and Tatsuo Matsunaga. *BMC Medical Genetics*, 2017:18:32 査読あり  
doi: 10.1186/s12881-017-0389-4.

**A novel nonsense mutation in the *NOG* gene causes familial *NOG*-related symphalangism spectrum disorder**

Kenichi Takano, Noriko Ogasawara, Tatsuo Matsunaga, Hideki Mutai, Akihiro Sakurai, Aki Ishikawa, and Tetsuo Himi. *Human Genome Variation*, 2016 3:16023. 査読あり  
doi: 10.1038/hgv.2016.23.

**Frequency and Specific Characteristics of the Incomplete Partition Type III Inner Ear Anomaly in Children with Hearing Loss**

Ayako Kanno, Hideki Mutai, Kazunori Namba, Noriko Morita, Atsuko Nakano, Noboru Ogahara, Tomoko Sugiuchi, Kaoru Ogawa, Tatsuo Matsunaga. *Laryngoscope*, 2017 127(7):1663-1669. 査読あり  
doi: 10.1002/lary.26245.

**A novel frameshift variant of *COCH* supports the hypothesis that haploinsufficiency is not a cause of autosomal dominant nonsyndromic deafness 9.**

Masatsugu Masuda, Hideki Mutai, Yukiko Arimoto, Atsuko Nakano, Tatsuo Matsunaga. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 8;469(2):270-4. 査読あり  
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.106.

**Clinical characteristics of a Japanese family with hearing loss accompanied by compound heterozygous mutations in *LOXHD1*.**

Shujiro B Minami, Hideki Mutai, Kazunori Namba, Koichi Sakamoto, Tatsuo Matsunaga. *Auris Nasus Larynx*. 2016 43(6):609-13. 査読あり  
doi: 10.1016/j.anl.2016.02.010.

**Gene expression profiling of DBA/2J mice cochleae treated with L-methionine and**

**valproic acid.**

Miya F, Mutai H, Fujii M, Boroevich KA, Matsunaga T, Tsunoda T. *Genome Data*. 2015 5:323-5. 査読あり  
doi: 10.1016/j.gdata.2015.06.022.  
eCollection 2015

**A novel frameshift mutation in *KCNQ4* in a family with autosomal recessive non-syndromic hearing loss**

Koichiro Wasano, Hideki Mutai, Chie Obuchi, Sawako Masuda, Tatsuo Matsunaga,. 2015 *Biochem Biophys Res Comm*, 2015 (463) 582-586 査読あり  
Doi:10.1016/j.bbrc.2015.05.099

**High prevalence of *CDH23* mutation in patients with congenital high-frequency recessive or sporadic hereditary hearing loss.**

Kunio Mizutari, Hideki Mutai, Kazunori Namba, Yuko Miyanaga, Atsuko Nakano, Yukiko Arimoto, Sawako Masuda, Noriko Morimoto, Hirokazu Sakamoto, Kimitaka Kaga, and Tatsuo Matsunaga. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2015 13;10:60. 査読あり  
doi: 10.1186/s13023-015-0276-z.

〔学会発表〕(計 9 件)

**臨床検体を用いた中耳細菌叢のメタ 16S 解析**  
務台英樹、鈴木朋子、南修司郎  
NGS 現場の会 第 5 回研究会 2017.5.22-24  
仙台国際センター

**Exome 解析を用いた新規難聴原因遺伝子の探索**

務台英樹 松永達雄  
第 27 回日本耳科学会 2017.11.22-24 パシ  
フィコ横浜会議センター

**臨床像を起点とした遺伝性難聴診療の確立**

松永達雄、加我君孝、務台英樹、奈良清光、  
南修司郎、山本修子、藤岡正人、小川郁  
第 27 回日本耳科学会 2017.11.22-24 パシ  
フィコ横浜会議センター

**TECTA 蛋白の構造解析による新規変異の分子病態予測**

山本修子、難波一徳、務台英樹、森田訓子、  
松永達雄  
第 27 回日本耳科学会 2017.11.22-24 パシ  
フィコ横浜会議センター

**混合難聴の進行により、人工内耳埋め込み術を施行した中耳・内耳奇形・内耳道狭窄の 3 症例の検討**

利國桂太郎、南修司郎、山本修子、和佐野浩  
一郎、務台英樹、松永達雄、加我君孝

第 27 回日本耳科学会 2017.11.22-24 パシ  
フィコ横浜会議センター

**Whole Exome Sequencing to Discover Novel  
Genes Associated with Hearing Loss**

Hideki Mutai, Yukihide Momozawa, Yoichiro  
Kamatani, Michiaki Kubo, Tatsuo Matsunaga  
2018 41th annual midwinter meeting,  
Association for Research in  
Otolaryngology, Feb9-14, 2018

**Apoptosis is Associated with Decreased  
BDNF Signal in the Spiral Ganglion of *Otof*  
-deficient Mouse**

Kazunori Namba, Hideki Mutai, Tatsuo  
Matsunaga  
2018 41th annual midwinter meeting,  
Association for Research in  
Otolaryngology, Feb9-14, 2018

**Exome 解析を用いた症候群性難聴に対する原  
因遺伝子同定の試み**

務台英樹、仲野敦子、有本友希子、松永達雄  
日本耳科学会総会、第 25 回、2015 年 10 月 7  
- 10 日、長崎ブリックホール

**Microbiomes in the normal middle ear and  
chronic otitis media**

Minami S, Mutai H, Suzuki T, Horii A, Oishi  
N, Katsura M, Wasano K, Tanaka F, Takiguchi  
T, Fujii M. 2016 Association for Research  
in Otolaryngology 39<sup>th</sup> Midwinter Meeting Feb  
20-24, Manchester Grand Hyatt, San Diego,  
CA, USA

〔図書〕(計 1 件)

**中耳細菌叢のメタ 16S 解析 南修司郎、務台  
英樹 in: 実験医学別冊 NGS アプリケーシ  
ョン 今すぐ始める!メタゲノム解析 実  
験プロトコール 編:服部正平 2016 羊土  
社 ISBN978-4-7581-0197-4**

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

務台 英樹 (MUTAI Hideki)

国立病院機構東京医療センター臨床研究  
センター・聴覚平衡覚研究部・研究員

研究者番号：60415891

(2) 研究分担者

難波 一徳 (NAMBA Kazunori)

国立病院機構東京医療センター臨床研究  
センター・聴覚平衡覚研究部・研究員

研究者番号：60425684

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：