

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18393

研究課題名(和文) マウス進行性難聴発症に作用する機能ゲノム多型の同定

研究課題名(英文) Identification of the functional genomic polymorphisms affecting mouse progressive hearing loss

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではミオシンVI (Myo6) の変異アレルをもつksvヘテロマウス (ksv/+) の早発・進行性難聴を促進するC57BL/6J (B6) マウスの遺伝的背景に存在する機能ゲノム多型を明らかにすることを目的に遺伝子座マッピングを行った。難聴発症を促進する遺伝子座の一つは第10番染色体のカドヘリン23 (Cdh23) にマップされた。そこでB6マウスの難聴発症原因であるCdh23のc.753Aアレルを野生型c.753Gアレルに置換した結果、難聴の表現型は軽減された。しかし、その効果は完全ではなく、B6マウスの遺伝的背景にはksv/+の難聴発症を修飾する他のゲノム多型が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The early-onset progressive hearing loss (ePHL) in heterozygotes of the wild-type and ksv allele of Myosin VI gene (Myo6) was accelerated by genetic background effect of C57BL/6J (B6) mice. To identify a polymorphism(s) associated with the ePHL, we performed a genetic mapping approach using a backcross progeny with MSM/Ms mice. This approach discovered that ePHL strongly associates with cadherin 23 gene (Cdh23), which is associated with the onset of hearing loss, on chromosome 10. We confirmed that c.753G>A genome editing of Cdh23 reduce the symptoms of ePHL in ksv/+ mice. However, the ePHL were not completely rescued by the genome editing; therefore, this result suggests that the other polymorphisms accompanying the genetic background of B6 mice contribute the severity and acceleration of ePHL in ksv/+ heterozygous mice.

研究分野：哺乳類遺伝学

キーワード：遺伝学 実験動物学 ミオシンVI ゲノム多型 有毛細胞 難聴 ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

難聴は、ヒトの代表的な感覚器障害である。発症要因の1つである遺伝的要因の影響は強く、約50%の患者は遺伝子異常によって発症することが推定され、これまでに100を超える遺伝子座で発症原因遺伝子が同定されている (Hereditary Hearing loss Homepage, 2014年10月時点)。本研究の標的分子であるミオシンVI遺伝子 (Myosin VI: MYO6) は優性および劣性の難聴原因遺伝子であり、変異アレルをヘテロでもつ患者は機能獲得あるいはハプロ不全等の優性効果により共通して後天性の進行性難聴を発症し、変異アレルをホモにもつ患者は劣性の重度難聴を発症する (Melchionda et al. *Am J Hum Genet.* 2001, Hilgert et al. *Eur J Hum Genet.* 2008, Oonk et al. *Hear Res.* 2013 など)。

研究代表者は自然発症によって単離された行動異常・完全難聴を生じる劣性のマウス突然変異体 Kumamoto shaker/walzer (*ksv*) マウスの発症原因が *Myo6* のエクソン-イントロン境界部位の突然変異に伴うプライミング異常であることを明らかにした。その変異により *ksv* ホモマウスは MYO6 タンパク質の発現量が大幅に減少し、音の受容に必要な感覚細胞である内耳有毛細胞の感覚毛が融合・巨大化する。加えて、*ksv/+*ヘテロ個体は早発の進行性難聴を発症することも明らかとなり (図1A) *ksv/ksv* ホモ個体と

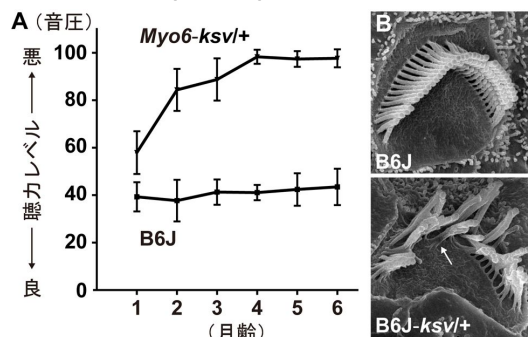


図1. 野生型 (B6J) および *ksv/+*ヘテロ個体の加齢に伴う聴力推移 (A) と感覚毛形態 (B)。矢印は *ksv/+*ヘテロ個体で観察された融合した感覚毛を示す。

比べて軽度ではあるが、一部融合した感覚毛が観察された (図1B)。一方、C57BL/6J (B6J) の遺伝的背景をもつ *ksv/ksv* ホモ個体と日本産野生由来の MSM/Ms (MSM) 系統との交配家系において、*ksv/+*ヘテロ個体の難聴発症が抑制されることが明らかとなった。MSM 由来のアレル効果を検証するため、予備実験として交配個体を作製し、聴力測定を行った結果、戻し交配個体の聴力にはばらつきが生じたことから、*ksv/+*ヘテロ個体の難聴発症は *Myo6* 変異アレルの優性効果に加え、B6J および MSM 系統の一方または双方のゲノムに *ksv/+*ヘテロ個体の難聴発症に作用する機能ゲノム多型が存在することが明らか

となった。

### 2. 研究の目的

本研究は、*ksv/+*ヘテロマウスをモデルとし、*MYO6* 変異によるヒト優性の進行性難聴の発症メカニズム解明を目指し、第一の目的として、順遺伝学的手法により B6J および MSM の遺伝的背景に存在する機能ゲノム多型を同定し、その効果を検証することとした。第二の目的は、同定した多型の効果を実証するため、ヒトにおいて優性効果が報告されている多型をゲノム編集により導入したノックインマウスを作製し、同定した機能ゲノム多型効果を検証することとした。

### 3. 研究の方法

(1) *ksv* アレルヘテロ接合体の難聴発症に作用する機能ゲノム多型の同定

機能ゲノム多型を同定するための戻し交配個体群は (MSM × B6J-*Myo6<sup>ksv/ksv</sup>*) F<sub>1</sub> に *Myo6<sup>ksv/ksv</sup>* を交配することにより得た。表現型となる聴力閾値は聴性脳幹反応 (ABR) を測定することにより得た。聴力閾値に關与する QTL は戻し交配個体の各遺伝子型を判定後、R/qtl プログラムを使用して検出した。

(2) 候補機能ゲノム多型の難聴発症修飾効果の検証

QTL 解析により検出したゲノム多型の難聴修飾効果は、*Myo6<sup>ksv/ksv</sup>* と、検出された機能ゲノム多型 (カドヘリン 23 (*Cdh23*) の c.753G>A) を野生型に置換したゲノム編集個体との交配より得られたコンパウンドヘテロ個体の表現型を調査することにより検証した。

(3) 新規機能ゲノム多型の同定および検証のための家系作製およびゲノム編集マウスの樹立

新規機能ゲノム多型の同定のため、(MSM × B6J-*Myo6<sup>ksv/ksv</sup>*, *Cdh23<sup>753G/G</sup>*) F<sub>1</sub> に B6J-*Myo6<sup>ksv/ksv</sup>*, *Cdh23<sup>753G/G</sup>* を交配した戻し交配個体群を作製した。加えて、難聴発症に關わる機能ゲノム多型の修飾効果を検証するためのツールを得るため、ヒトにおいて優性の難聴発症が報告されている *MYO6* ミセンス変異 p.Cys442Tyr (Melchionda et al. *Am J Hum Genet.* 2001) に着目し、CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集でノックイン (KI) マウスを作製し、樹立したマウスの変異アレルホモおよびヘテロ個体の ABR および耳音響放射 (DPOAE) 検査により聴力レベルを調査し、免疫染色による有毛細胞の感覚毛形態観察を実施した。

### 4. 研究成果

(1) *Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスの難聴発症を修飾するゲノム多型の同定

MSM と *Myo6<sup>ksv/ksv</sup>* を交配することにより得られた F<sub>1</sub> に *Myo6<sup>ksv/ksv</sup>* を戻し交配した個体群を作製し、*Myo6<sup>ksv/+</sup>* を選抜後、ABR の閾値を測定した結果、それらマウスの聴力閾値は正常～重度難聴に分布した。従って、B6J の遺伝的背景には *Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスの表現型を修飾する遺伝因子の存在が示唆された。また、戻し交配個体の遺伝子型に基づく QTL 解析を実施した結果、高い LOD スコアは第 10 番染色体に検出され (図 2)、その領

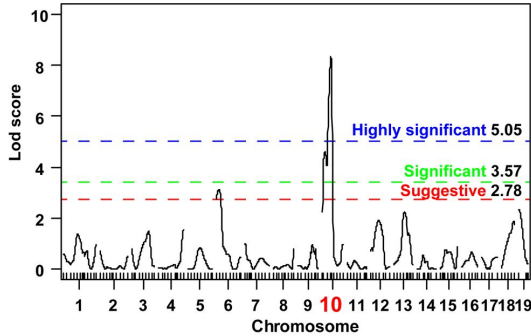


図2. 4 kHzのABR閾値を指標としたQTL解析。第10番染色体に最も高いLodスコアが検出され、*Myo6-ksv/+* マウスの難聴発症を修飾する機能ゲノム多型が存在することを示唆する。

域には加齢性難聴の原因となる *Cdh23<sup>ahl</sup>* 遺伝子座が存在していた (Johnson et al. *Hear Res.* 1997, Noben et al. *Nat Genet.* 2003)。*Cdh23<sup>ahl</sup>* は B6J を含む多くの近交系マウスが保持し、それは複数の難聴モデルマウスの聴力を低下させることも報告されている。実際に、我々の研究グループはゲノム編集によって *Cdh23<sup>ahl</sup>* の実体である 753 番目のアデニンをグアニンに置換させたゲノム編集個体の聴力が回復することを確認している (Miyasaka et al. *Hum Mol Genet.* 2016)。従って、*Myo6<sup>ksv/+</sup>* ヘテロマウスが発症する進行性難聴を修飾する主要な要因は B6J マウスの遺伝的背景に存在する *Cdh23* の多型 (c.753G>A) であることが示唆された。

#### (2) *Cdh23-c.753G>A* 多型の難聴発症修飾効果の検証

*Cdh23-c.753G>A* の *Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスにおける聴力閾値への影響を検証するため、本研究は *Myo6<sup>ksv/ksv</sup>* マウスと *Cdh23<sup>c.753G/G</sup>* ゲノム編集マウス間の交配により得られた両遺伝子の変異アレルをヘテロでもつマウスの聴力表現型を調査した。ABR による聴力測定を 2 ヶ月齢のコンパウンドヘテロで実施した結果、調査した 4, 8, 16 および 32 kHz のすべての周波数音の ABR 閾値は *Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスと比較して明確に低下し、すなわち聴力障害の回復を示した (図 3)。さらに、2 ヶ月齢で感覚毛融合を生じる *Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスとは異なり、両アレルヘテロ個体の感覚毛形態は野生型と類似していた。これらの結果から、*Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスにおける難聴は *Cdh23* の多型によって重篤化することが強く示唆された。しかしながら、その効果は完全ではなく、*Cdh23* の多型をもつ *Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスは聴力

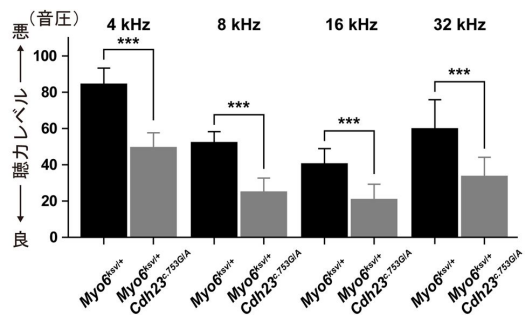


図3. *Myo6-ksv/+* マウスと *Myo6-ksv/+; Cdh23c.753G/A* マウスの2ヵ月齢の各周波数音における聴力比較。\*\*\* $P < 0.001$ 。

障害を生じることが明らかとなった。本研究で測定した 4, 8, 16 および 32 kHz の周波数音における聴力は生後 8 ヶ月齢においては中～高度難聴のレベルに達し、感覚毛形態の異常を示唆するデータも得られた。*MYO6* および *CDH23* の相互作用は検証できなかったものの、これらの結果から、*ksv* 変異および *Cdh23* 多型が存在することで *ksv/+* ヘテロマウスの難聴発症が早期化されることが明らかとなった。加えて、B6J の遺伝的背景には *Cdh23<sup>c.753G>A</sup>* 以外の難聴発症を修飾する機能ゲノム多型が存在することが推察された。

#### (3) *Myo6<sup>ksv/+</sup>* マウスの難聴発症に作用する新規機能ゲノム多型を同定するための戻し交配個体群の表現型解析

*ksv* 変異および *Cdh23* のゲノム多型によって *ksv/+* ヘテロマウスが早発の進行性難聴を発症することに加え、*Cdh23<sup>c.753G>A</sup>* 以外のゲノム多型が存在することが示唆された。そこで我々は、(MSM × B6J-*Myo6<sup>ksv/ksv</sup>*, *Cdh23<sup>753G/G</sup>*) F<sub>1</sub> に B6J-*Myo6<sup>ksv/ksv</sup>*, *Cdh23<sup>753G/G</sup>* を交配した戻し交配個体群の作製を試みた。得られた F<sub>1</sub> および 26 頭の戻し交配個体群の ABR を測定した結果、F<sub>1</sub> は 6 ヶ月齢まで ABR 閾値の上昇を示さなかったものの、同月齢の戻し交配個体群は 4 kHz でばらつきが認められた。以上の結果から、B6J の遺伝的背景には *Cdh23* のゲノム多型の他に *ksv/+* ヘテロ個体の難聴発症に作用する機能ゲノム多型が存在することが実証された。現在、QTL 解析を実施するための個体群作製の準備をしている。

#### (4) *Myo6<sup>p.Cys442Tyr</sup>* マウスの樹立

検出されたゲノム多型の難聴発症修飾効果を検証するためのツールとなるモデルマウスを作製するため、CRISPR/Cas9 システムを介した KI ゲノム編集を行った。その結果、我々はヒト難聴を生じる変異を模倣した *MYO6<sup>p.Cys442Tyr</sup>* マウスの作製に成功した。次に、樹立した変異アレルホモおよびヘテロ個体の聴力レベルを ABR および DPOAE で調査した。ホモ接合体は 2 ヶ月齢で重度難聴を発症し、調査した 4, 8, 16 および 32 kHz のすべての周波数音で野生型に比べて顕著な聴力低下が認められ、DPOAE もほぼ検出されなかった。また、同月齢のヘテロ個体は 4

および 32 kHz の周波数音の ABR において中～高度難聴が示唆され、DPOAE においても野生型と比べて有意な聴力低下が認められた。次に、有毛細胞の表現型を免疫染色により観察した結果、ホモおよびヘテロ個体ともに外有毛細胞の部分的な脱落を示し、ホモ個体では感覚毛融合を示唆するデータも得られた。さらに、MYO6 の有毛細胞における局在を調査した結果、ホモおよびヘテロ個体ともに異常局在が認められた。これらの研究成果は、先行研究のキネティクス解析により示唆されている MYO6<sup>p.Cys442Tyr</sup> 変異によるミオシンモーター機能の低下を支持することに加え (Sato et al. *J Biol Chem.* 2004) 樹立した MYO6<sup>p.Cys442Tyr</sup> マウス系統が同定した機能ゲノム多型の効果を検証するための有用なツールとなりうることを期待できた。現在、*Cdh23*<sup>753G/G</sup> マウスとの交配による両アレルヘテロ個体の樹立を試みている。

#### <引用文献>

Hereditary Hearing loss Homepage [Internet]. 2018 Available from: <http://hereditaryhearingloss.org> [Accessed: 2018-06-09]

Melchionda et al: MYO6, the human homologue of the gene responsible for deafness in Snell's waltzer mice, is mutated in autosomal dominant nonsyndromic hearing loss. *Am J Hum Genet*, 69, 635-640, 2001.

Hilgert et al: A splice-site mutation and overexpression of MYO6 cause a similar phenotype in two families with autosomal dominant hearing loss. *Eur J Hum Genet*, 16, 593-602, 2008.

Oonk et al: Progressive hereditary hearing impairment caused by a MYO6 mutation resembles presbycusis. *Hear Res*, 299, 88-98, 2013.

Noben et al: Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. *Nat Genet*, 35, 21-23, 2003.

Sato et al: Human deafness mutation of myosin VI (C442Y) accelerates the ADP dissociation rate. *J Biol Chem*, 279, 28844-28854, 2004.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Seki Y, Miyasaka Y, Suzuki S, Wada K, Yasuda SP, Matsuoka K, Ohshiba Y, Endo K, Ishii R, Shitara H, Kitajiri SI, Nakagata N, Takebayashi H, Kikkawa Y: A novel splice site mutation of myosin VI in mice leads to stereociliary fusion caused by disruption of actin networks in the apical region of inner ear hair cells. *PLoS One*, 12, e0183477, 2017.

DOI: 10.1371/journal.pone.0183477. 査読有

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. DOI: 10.1093/hmg/ddw078. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

関 優太 他: マウスにおけるミオシン VI のスプライス部位変異は蝸牛有毛細胞の頂部領域におけるアクチンネットワーク破綻に起因した感覚毛融合へと導く. 第 64 回日本実験動物学会総会. 2017.

関 優太 他: Myosin VI 変異ヘテロ接合体が発症する進行性難聴の病態. 第 63 回日本実験動物学会総会. 2016.

関 優太 他: Myosin VI 変異体の感覚毛 - 細胞間融合プロセスと機能低下型アレルに起因した難聴発症. 第 12 回北海道実験動物研究会総会・学術集会. 2015.

関 優太 他: Myosin VI 新規機能低下型アレルの解析で明らかとなった感覚毛 - 細胞間融合プロセスとハプロ不全. 第 29 回モロシヌス研究会. 2015.

[その他]

ホームページ

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

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

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

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