

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09364

研究課題名(和文) 加齢性難聴発症率の性差の原因となる新規遺伝子同定

研究課題名(英文) Identification of novel genes responsible for sex differences of age-related hearing loss

研究代表者

安田 俊平 (YASUDA, Shumpei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：50534012

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)：BALB/cマウスの亜系統であるBALB/cAマウスは早期に高音域特異的加齢性難聴を発症するが、BALB/cByJマウスは発症抵抗性を持つ。調査の結果、BALB/cAの発症感受性は、複数の責任遺伝子により制御されており、かつ少なくとも1つがX染色体上に位置する事が示された。また、発症は外有毛細胞の異常に起因する可能性が示唆された。X染色体上の加齢性難聴発症責任遺伝子は未報告であるため、新規遺伝子の探索のためF2個体を使用したX染色体マッピングおよびシングルセルRNA-seqによる外有毛細胞の遺伝子発現比較を実施し、亜系統間で発現が異なる遺伝子を候補遺伝子としてピックアップした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの加齢性難聴は、その発症要因の1つとして遺伝的要因が報告されているが、その責任遺伝子はほとんど報告されておらず、発症の性差についても同様である。研究代表者は、ヒトで特定の難しい発症責任遺伝子の同定を目的に、研究用マウスを使用した責任遺伝子の探索を進めている。本研究では、加齢性難聴の発症責任遺伝子であり、発症に性差をもたらす可能性のある遺伝子の候補を初めてピックアップすることができた。これは、発症の性差を考える上で、また、責任遺伝子を同定し、加齢性難聴の発症予防および治療に活かすための重要なステップであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：BALB/cA mice, a sub-strain of BALB/c mice, develop early-onset high frequency-specific age-related hearing loss (ARHL), while BALB/cByJ mice, another sub-strain of BALB/c mice, are resistant to the ARHL. Preliminary studies indicate that the susceptibility of BALB/cA to the onset of ARHL is caused by multiple responsible genes, at least one of which is located on the X chromosome. Since the genes responsible for the onset of ARHL on the X chromosome have not been reported, we performed X chromosome mapping using F2 individuals and single-cell RNA-seq to compare gene expression in outer hair cells to search for responsible genes. The genes with different expression among the sub-strains were selected as candidate genes.

研究分野：マウス遺伝学

キーワード：加齢性難聴 マウス シングルセルRNA-seq 外有毛細胞 順遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの難聴は主に先天性難聴と加齢性難聴に大分される。先天性難聴では発症に性差が認められるものがあり、それらは X 染色体に発症原因が存在し、これまでに 5 遺伝子が同定されている (Hereditary Hearing loss Homepage)。一方、加齢性難聴にも性差が認められており、その発現には遺伝的要因が示唆されている (Gates et al., 1999) もの、未だに連鎖する遺伝子座、原因となる変異の同定には至っていない。

研究代表者は、予備実験により BALB/c マウスの亜系統の聴力を調査し、亜系統間で高音域の加齢性難聴の発症感受性に差異が認められること、また、差異が認められた BALB/cA および BALB/cByJ の交配実験の結果から、その発症責任遺伝子の少なくとも 1 つが X 染色体上に位置していることを示した。これまでに、ヒトおよびマウスで X 染色体上に加齢性難聴発症責任遺伝子は同定されていないことから、この発症責任遺伝子は加齢性難聴発症に性差をもたらす新規の遺伝子である可能性が高い。さらに、発症感受性を示す BALB/cA マウスでは ABR (聴性脳幹反応) 閾値の上昇と同時に DPOAE (歪成分耳音響放射) レベルの低下が認められることから、その発症が外有毛細胞の異常に起因する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者が予備実験で発見した、マウスにおいて加齢性難聴の発症に性差をもたらす可能性のある遺伝子を同定することを目標として、X 染色体上の加齢性難聴発症責任遺伝子を同定することを目的として実施した。また、その際、亜系統間の差異が常染色体上の遺伝子の影響も受けている可能性がある事、さらに、マウス加齢性難聴発症の主な要因であるカドヘリン 23 (*Cdh23*) の *ahl* アレル (c.753A) がモディファイアーとして働いている可能性がある事などから、常染色体マッピングの準備および BALB/cA および BALB/cByJ への野生型 *Cdh23* (c.753G) のノックイン (KI) も本研究の追加目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス系統

本研究は、BALB/c 系統の亜系統である BALB/cA および BALB/cByJ マウスを使用した。

(2) 聴力測定

マウスの聴力評価は、左耳について ABR (聴性脳幹反応) 閾値および DPOAE (歪成分耳音響放射) レベルの測定により実施した。

(3) ゲノムマッピング

マッピングに使用した個体は、BALB/cByJ メスと BALB/cA オスを交配させて樹立した F₁ マウスの交配により作製した F₂ 個体であり、3 ヶ月齢で左耳への 32 kHz 刺激音に対する ABR 閾値および 32 kHz の f₂ 刺激音に対する DPOAE レベルを調査した。X 染色体上の多型マーカーは、BALB/cA および BALB/cByJ マウスの全ゲノムシーケンスにより検出されたマイクロサテライトおよび SNP 多型を利用して樹立した。X 染色体マッピングは、これらのマーカーを用いて、電気泳動またはダイレクトシーケンスにより実施した。また、F₁ マウスのオスを BALB/cByJ メスに戻し交配させて N₂ 個体を作製し、その聴力は 3 ヶ月半齢で F₂ 個体と同様に評価した。

(4) シングルセル解析

シングルセル解析は、BALB/cA および BALB/cByJ から蝸牛感覚上皮組織を摘出し、各マウス 5~6 個体分の組織をプール後に細胞を分離後、Fluidigm の IFC アレイ (Single-Cell mRNA Seq HT IFC, 10-17 μm) を使用して細胞を単離し、1 細胞あたり 30 万リードを目標に実施した。得られたリードは、CLC Genomics Workbench version 21 を用いてマウスリファレンス配列 (*Mus musculus* GRChm38) にマッピングし、遺伝子発現データを Seurat version 4.0 (Hao et al., 2021) で解析し、解析結果を用いて各マウスの外有毛細胞のみをピックアップした。外有毛細胞の遺伝子発現の亜系統間比較は、Strand NGS version 3.4 を用いて実施した。

(5) カドヘリン 23 (*Cdh23*) のゲノム編集の樹立

Cdh23^{ahl} アレルを野生型に KI した BALB/cA および BALB/cByJ 系統は、各亜系統にゲノム編集技術を用いて作製された KI 個体を元の亜系統に戻し交配して作製した F₁ 個体を交配させて樹立した。*Cdh23* のジェノタイプリングは Miyasaka et al. (2016) に従った。

4. 研究成果

(1) ゲノムマッピング

X 染色体上の多型マーカーは、マイクロサテライトマーカーを 20.4 Mb、59.6 Mb、129.1 Mb、134.8 Mb および 151.9 Mb の位置に、SNP マーカーを 71.6 Mb、104.3 Mb、141.7 Mb および 154.9

Mb の位置にそれぞれ樹立した。F₂ 個体は合計メス 111 個体およびオス 153 個体について聴力評価を実施したが、聴力データを踏まえ、X 染色体マッピングにはオスのみを使用することとした。これらのオスの中から、ABR 閾値が 80 を超える個体を難聴発症個体、40 未満の個体を正常聴力個体としてマッピングを実施した結果、59.6 ~ 134.8 Mb の領域にターゲット遺伝子が位置する事が推察された (図 1)。しかしながら、全ゲノムシーケンスの結果、この領域内でアミノ酸置換が存在するタンパク質が認められなかったことから、加齢性難聴の発症にはタンパク質の構造変異ではなく遺伝子の発現量などが影響している可能性が示唆された。

また、F₁ マウスの聴力測定結果は、常染色体上にも早期の加齢性難聴を引き起こす責任変異が存在すること、また、その責任変異が顕性である事を示唆した。そこで、X 染色体を BALB/cByJ 由来に固定した N₂ 個体を作製し、その聴力を 3 ヶ月半齢で評価した結果、常染色体に位置する責任変異が単一では無いことが示唆された。今後、常染色体上の SNP マーカーを利用して全ゲノムマッピングを実施する予定である。

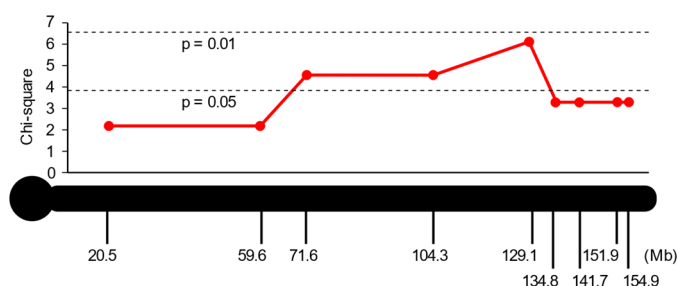


図 1 : X 染色体マッピングの結果。

(2) シングルセル解析

当初は、聴力の低下が認められる 3~4 ヶ月齢の個体を使用する予定であったが、成獣では解剖による蝸牛感覚上皮組織の摘出が困難であったため、本研究では生後 1 日齢のマウスを使用することとした。BALB/cA および BALB/cByJ の生後 1 日齢個体の蝸牛感覚上皮組織からは、それぞれ 350 個および 371 個の細胞が回収された。シングルセルの回収率は非常に高く 9 割前後であった。RNA-seq の結果を基に、ミトコンドリア遺伝子の発現量が 10% を超える細胞は低品質であるとして解析から排除し、解析には合計 656 細胞を使用した。遺伝子発現パターンを Seurat version 4.0 (Hao et al., 2021) で解析した結果、No. 0~8 の 9 つのグループが認められた (図 2)。

Myosin VIIA (*Myo7a*) および Myosin XV (*Myo15*) の発現パターンからは、グループ 5 と 8 が有毛細胞と考えられ、また、グループ 5 で外有毛細胞特異的に発現する oncomodulin (*Ocm*) の発現が認められることから、グループ 5 が外有毛細胞、グループ 8 が内有毛細胞であると考えられた (図 2)。また、本研究により、生後 1 日齢マウスの蝸牛感覚上皮組織では、Gastrin-releasing peptide (*Grp*) が外有毛細胞特異的に、Calcium-binding protein 2 (*Cabp2*) が内有毛細胞特異的に発現している事が示された (図 3)。

最終的に、BALB/cA および BALB/cByJ マウスの外有毛細胞をそれぞれ 20 個および 15 個回収することができた。これらの細胞を用いて、Strand NGS version 3.4 により BALB/cA と BALB/cByJ 間の外有毛細胞での遺伝子発現を比較検討した結果、X 染色体上にマッピングされた領域中に、BALB/cByJ マウスにおいて BALB/cA マウスより 2 倍以上発現量が多い遺伝子が 22 個、発現量が少ない遺伝子が 11 個認められた。また、常染色体上では、BALB/cByJ マウスにおいて BALB/cA マウスより 10 倍以上発現量が多い遺伝子が 11 個、発現量が少ない遺伝子が 7 個認められた。以上の結果から、これら遺伝子が、BALB/cByJ マウスの高音域特異的な加齢性難聴発症抑制機能を持つ責任遺伝子の候補としてリストアップされた。

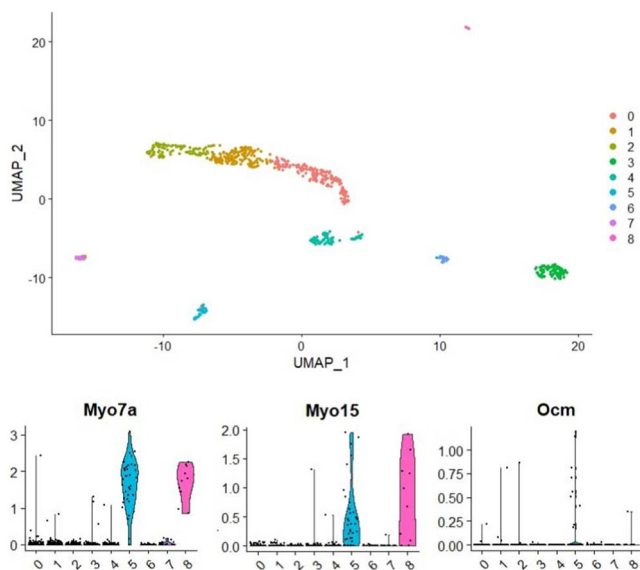


図 2 : UMAP および各グループの遺伝子発現。

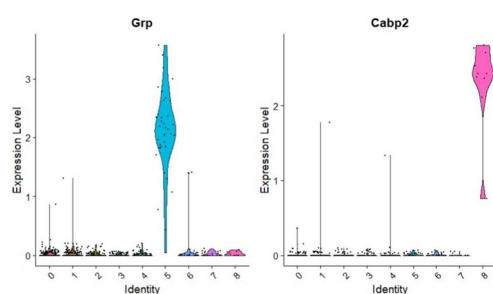


図 3 : 外有毛細胞および内有毛細胞特異的に発現している遺伝子。

(3) *Cdh23* のゲノム編集

C57BL/6 や BALB/c マウスなどでは、カドヘリン 23 (*Cdh23*) の *ahl* アレル (*Cdh23^{ahl}*) の c.753G>A 変異により異常スプライシングが誘導され、正常アレルの発現量の減少により加齢性難聴を発症することが知られている (Noben-Trauth et al., 2003; Yasuda et al., 2020)。また、*ahl* アレルは、加齢性難聴発症のモディファイアーとしても報告されていることから (Miyasaka et al., 2016)、本研究のターゲットとなった遺伝子との相互作用を調査するために、ゲノム編集を用いて *ahl* アレルを野生型に修正した BALB/cA および BALB/cByJ マウスの樹立を試みた。樹立した BALB/cA-*Cdh23^{753G/G}* マウスの聴力を BALB/cA マウスと比較した結果、32 kHz 音刺激に対する ABR 閾値が有意に低下していることが認められた。BALB/cByJ マウスについては、ノックインに成功し、現在系統化中である。今後は、これらのマウスを用いて、ターゲット遺伝子と *Cdh23* との相互作用について検証する予定である。

引用文献

- Gates et al. (1999) Genetic associations in age-related hearing thresholds. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 125, 654-659.
- Hao et al. (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data. Cell 184, 1-15.
- Miyasaka et al. (2016) 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.
- Noben-Trauth et al. (2003). Association of cadherin 23 with polygenic inheritance and genetic modification of sensorineural hearing loss. Nat. Genet. 35, 21-23.
- Yasuda et al. (2020) c.753A>G genome editing of a *Cdh23^{ahl}* allele delays age-related hearing loss and degeneration of cochlear hair cells in C57BL/6J mice. Hear. Res. 389, 107926.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shumpei P. Yasuda, Yuta Seki, Sari Suzuki, Yasuhiro Ohshiba, Xuehan Hou, Kunie Matsuoka, Kenta Wada, Hiroshi Shitara, Yuki Miyasaka, Yoshiaki Kikkawa	4. 巻 389
2. 論文標題 c.753A>G genome editing of a Cdh23ahl allele delays age-related hearing loss and degeneration of cochlear hair cells in C57BL/6J mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heares.2020.107926	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田俊平, 関 優太, 松岡邦枝, 吉川欣亮
2. 発表標題 BALB/c垂系統を用いた新規難聴遺伝子の探索
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

難聴プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/mammal/ 難聴の遺伝的要因と発症機構の解明 http://www.igakuken.or.jp/project/detail/mammal.html
--

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	吉川 欣亮 (KIKKAWA Yoshiaki) (20280787)	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 (82609)	

6. 研究組織（つづき）

	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	設楽 浩志 (SHITARA Hiroshi) (90321885)	公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術支援センター・主席基盤技術研究職員 (82609)	

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