

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16869

研究課題名（和文）ペンドリン変異に対する機能解析に基づいた遺伝子型表現型相関の解明と薬剤開発

研究課題名（英文）Study of genotype-phenotype correlation and drug development by functional characterization for pendrin variant

研究代表者

和佐野 浩一郎 (Wasano, Koichiro)

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）・聴覚・平衡覚研究部・室長

研究者番号：40528866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：日本人から同定されたペンドリン変異を中心に51種の変異について陰イオン輸送能の定量およびスライシングに関する検討を行い、条件の安定化の完了により信頼性の高い測定系が完成し、論文として報告した。その測定系を応用して薬剤スクリーニングを施行し、有望な薬剤を同定した。さらにその測定系を応用しNKCC1 (SLC12A2遺伝子)の機能解析法を開発し、SLC12A2遺伝子変異による難聴家系に関する報告に基礎的検討の裏付けを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の遺伝子解析技術の進歩により多くの遺伝子バリエーションが発見されるが、そのバリエーションが難聴の原因なのかどうかの判断は非常に難しい場合がある。今回の研究で開発した解析法では効率的にバリエーションの機能への影響を定量することが可能であることから、どのバリエーションがどのように疾患に関わっているのかを定量化することができる基礎的データを構築することができた。

研究成果の概要（英文）：We developed an experimental approach to efficiently quantify the pathogenic effects of disease-associated genetic variants with a focus on SLC26A4, which is essential for normal inner ear function. Alterations of this gene are associated with both syndromic and nonsyndromic hereditary hearing loss with various degrees of severity. We established HEK293T-based stable cell lines that express pendrin missense variants in a doxycycline-dependent manner, and systematically determined their anion transport activities with high accuracy in a 96-well plate format using a high throughput plate reader. Based on the method, we also developed an experimental approach to quantify the function of wild-type and variant of NLCC1 (SLC12A2 gene).

研究分野：耳鼻咽喉科学、聴覚、難聴遺伝学

キーワード：遺伝性難聴

### 1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は出生児 1000 人に 1 人の割合で発症する、先天性疾患の中で最も高頻度に発生する疾患の 1 つであり、その半数以上は遺伝子変異が関連する遺伝性難聴とされている。世界中の研究機関で原因遺伝子の解明が進められており、日本国内においては東京医療センターおよび信州大学が中心となって先天性難聴の患者や遺伝性難聴の疑いのある患者に対しての臨床研究として遺伝子検査を行い難聴関連の大規模な遺伝子情報のデータベースを構築してきた。平成 24 年に先天性難聴患者に対する遺伝子検査が保険収載され難聴患者に対する遺伝子検査が普及したことにより、保険による検査項目(2017 年現在 19 遺伝子 154 変異)では検出できなかった場合に上記臨床研究へ参加する患者が急増し、本邦において遺伝性難聴の原因となる可能性の高い遺伝子・変異が続々と報告されている。しかし、タンパクの細胞内局在や機能の解析などによる各変異に伴う病因性の検討は遅々として進んでいない。変異を導入した細胞に対する蛍光顕微鏡や電気生理的な技術、放射性同位元素を用いた検討が必要であり、一つ一つの検討に人的・時間的が必要であることから、効率よくタンパク機能を評価することのできる方法の開発が急務とされてきた。

遺伝性難聴の全原因遺伝子の中で最も頻度が高いのは Connexin26(*GJB2*)の変異に伴うものであり、大部分の患者は非進行性の難聴であるため聴力の正確な評価に続く補聴器や人工内耳といった聴覚補完が診療の中心として確立されている。一方で 2 番目に多いペンドリン(*SLC26A4*)の変異に伴う難聴は、先天性難聴に加えて変動を繰り返しながら難聴が進行する疾患であるが、遺伝子型・表現型相関(genotype-phenotype correlation)が明らかにされていないため、難聴の重症度・進行スピードや甲状腺腫合併の有無を予測することができない。また、変動時の治療法および進行を防ぐための治療法も未確立であり、遺伝子型・表現型相関の解明および治療法の開発が重要である。

### 2. 研究の目的

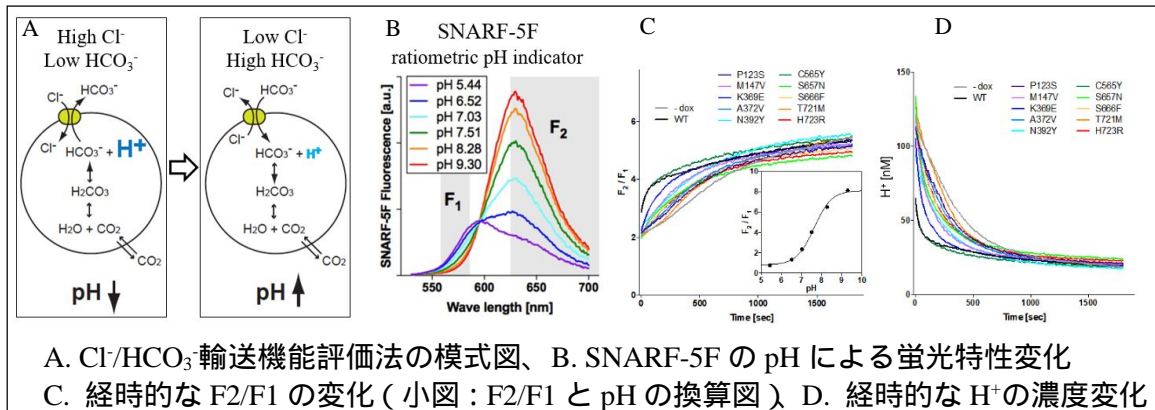
ペンドリンは 1 価の陰イオン ( $\text{Cl}^-$  と  $\text{I}^-$  および  $\text{HCO}_3^-$ ) の交換輸送体である。発現部位は多臓器に渡るが、その変異に伴う症候は内耳と甲状腺に限られ、甲状腺腫を合併する Pendred 症候群と難聴のみの DFNB4 とに分類され、両病態ともに常染色体劣性遺伝性疾患である。まず「背景」に記載した理由からペンドリン(*SLC26A4*)に焦点を当てて、効率よく変異タンパクのイオン交換機能を評価できる方法を開発し、安定的に運用したい。その方法を用いて様々な変異の検討を行うことで、日本人より同定されたペンドリンの遺伝子型を抽出し各変異タンパク機能を定量、その結果とペンドリン変異患者の表現型を比較し、遺伝子型・表現型相関を明らかにしたい。さらに変異を導入した細胞に対する様々な薬剤による機能回復効果を検証する。すでに認可されている薬剤を優先的に対象とし薬剤スクリーニング系を樹立する。これにより患者への治療法開発へとつなげたい。

### 3. 研究の方法

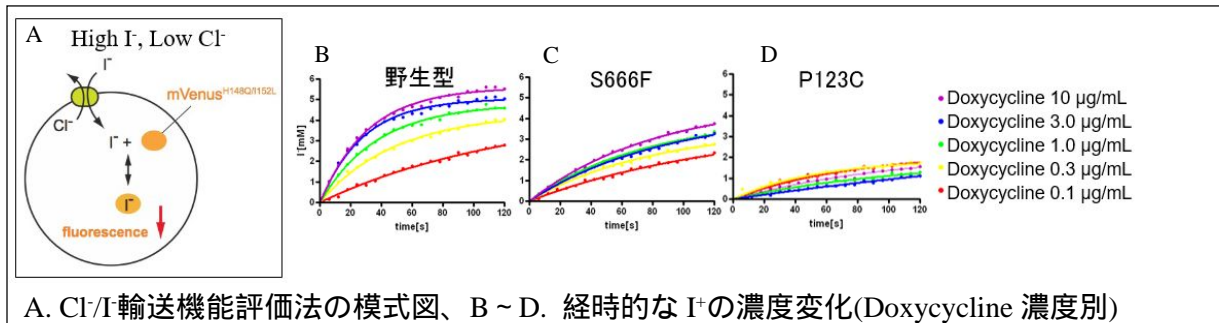
まず同定された変異に関する情報を元に PCR primer を設計し mutagenesis を行う。作成した変異ペンドリンに発現マーカーとして蛍光タンパク(mTurquoise2)をつけた DNA を sleeping beauty system\*を利用して、HEK293T 細胞に導入し変異ペンドリンを発現する stable cell line を作成する。Doxycycline にて変異ペンドリンの発現誘導を行った細胞を用いて機能解析を行う。

\*Sleeping beauty system: Transposon を用いた核 DNA への遺伝子導入法。Doxycycline により発現誘導を行う pSBtet および継続的に発現する pSBbi の 2 種類を使用。

i)  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ : 細胞外より細胞内に輸送された  $[\text{HCO}_3^-]$  が  $[\text{H}^+]$  と結合することによる pH の変化を pH indicator (SNARF-5F)の蛍光を plate reader を用いて経時的に測定し、ペンドリンの  $[\text{HCO}_3^-]$  輸送機能を測定する。



ii) Cl<sup>-</sup>/I<sup>-</sup> : [I<sup>-</sup>] と結合することにより蛍光強度が減弱する蛍光タンパク (mVenus<sup>H148Q/I152L</sup>) を細胞内に発現させ、細胞外から細胞内に輸送された [I<sup>-</sup>] 濃度変化を mVenus の蛍光を plate reader を用いて経時的に測定することで定量し、[I<sup>-</sup>] 輸送機能を測定する。



#### 4. 研究成果

日本人から同定されたペンドリン変異を中心に 51 種の変異について検討を行い、条件の安定化の完了により信頼性の高い測定系が完成した。スプライシングに関する検討を追加し、論文として報告した。過去に日本人から報告されているバリエーションの大部分を網羅しており、遺伝子型表現型相関を明らかにするための基礎的データを構築することができた。さらに薬剤スクリーニングを行い、治療法開発つながらる有望な薬剤を同定することができた。

さらにその測定系を応用し NKCC1 (SLC12A2 遺伝子) の機能解析法を開発し、SLC12A2 遺伝子変異による難聴家系に関する世界初の報告に基礎的検討の裏付けを行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wasano Koichiro, Takahashi Satoe, Rosenberg Samuel K., Kojima Takashi, Mutai Hideki, Matsunaga Tatsuo, Ogawa Kaoru, Homma Kazuaki	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 2019年
3. 雑誌名 Human Mutation	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 Tsunami Nobuyoshi, Wasano Koichiro, Kawasaki Taiji, Sasaki Shun ichi, Ogawa Kaoru	4. 巻 4
2. 論文標題 Thyroid lobe size predicts risk of postoperative temporary recurrent laryngeal nerve paralysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 708 ~ 713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.321	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 Kuwabara Makoto F., Wasano Koichiro, Takahashi Satoe, Bodner Justin, Komori Tomotaka, Uemura Sotaro, Zheng Jing, Shima Tomohiro, Homma Kazuaki	4. 巻 293
2. 論文標題 The extracellular loop of pendrin and prestin modulates their voltage-sensing property	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9970 ~ 9980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.001831	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

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 和佐野浩一郎, 松永達雄
2. 発表標題 エクソン上の点変異に伴うペンドリンのスプライシング異常に関する検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
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, 細谷誠, 和佐野浩一郎, 南修司郎, 加我君孝
2. 発表標題 ClinGen Hearing Loss Working Groupによる難聴遺伝子バリエーション評価のガイドライン
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
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遺伝子バリエーションの解釈への国際共同研究による挑戦と成果
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和佐野浩一郎, 小島敬史
2. 発表標題 有毛細胞におけるKCNQ4の機能と遺伝子バリエーションによる難聴の病態解明
3. 学会等名 第64回日本聴覚医学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Wasano
2. 発表標題 Systematic quantification of the anion transport function of pendrin and its disease-associated variants
3. 学会等名 15th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019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 (ARO) 43rd Midwinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和佐野 浩一郎
2. 発表標題 難聴患者から検出される遺伝子バリエーションの評価について
3. 学会等名 第15回静岡めまい難聴研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和佐野 浩一郎
2. 発表標題 難聴のPrecision Medicine -遺伝子診断から遺伝子治療へ-
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Wasano
2. 発表標題 The Pathological Mechanism of Sensorineural Hearing Loss Caused by KCNQ4 Mutations
3. 学会等名 ARO 42nd annual Midwinter meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Wasano
2. 発表標題 A Three-state Kinetic Model for Prestin
3. 学会等名 ARO 42nd annual Midwinter meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和佐野浩一郎
2. 発表標題 ベンドリン (SLC26A4) 変異に対する機能解析をもとにした病因性の検討
3. 学会等名 第28回日本耳科学会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和佐野浩一郎
2. 発表標題 ベンドリン (SLC26A4) 変異に対する効率的な機能解析法の開発
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和佐野浩一郎
2. 発表標題 外有毛細胞モーターたんぱく質 プレスチンのキネティックメカニズム
3. 学会等名 第63回日本聴覚医学会・学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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