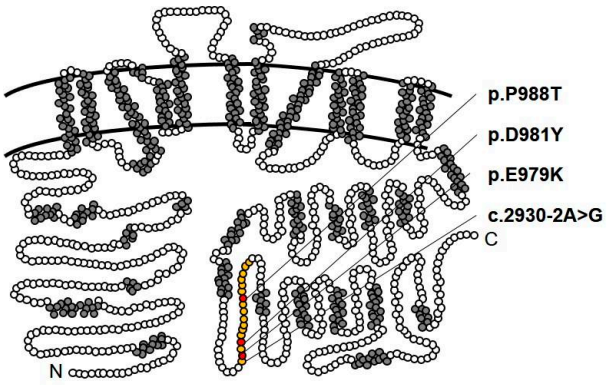
68　難聴原因候補*SLC12A2*の動物モデル等を用いた病態解析	松永　達雄

【目的】本研究の目的は、私たちが同定した新規難聴原因候補 *SLC12A2* 変異による難聴発症の分子機序を動物モデル・細胞モデルを用いて詳細に解析することである。聴覚は内耳蝸牛による音刺激の感知と脳への神経伝達によって行なわれ、関連する遺伝子の突然変異は遺伝性難聴を引き起こす。500～1,000 人の新生児に一人は聴力に問題があるとされ、そのうち半数以上の原因が遺伝子変異である。難聴遺伝子検査は本邦で保険収載されているが原因判明率は 3～4 割にとどまる。私たちはこの診断効率を高めるため、新規難聴遺伝子同定を目的とし、全遺伝子（エクソーム）解析その他の解析も含め、新規難聴遺伝子候補 *Slc12a2* を 4 家系で同定し、発表してきた（Mutai et al., 2020 PlosGenet）。本遺伝子は Na^+、K^+、$2Cl^-$共輸送体として、蝸牛内リンパ液組成の恒常性維持に必須であることが知られる。4 変異はいずれも特定のエクソン領域に集中し（図）、その一つはエクソンをスキップした転写産物を発現させる変異であった。興味深いことにこのエクソンスキップ型転写産物は脳では内在性に発現するが蝸牛では強く抑制されている。また各変異を導入した変異体のイオン輸送能は有意に低下していた。本研究ではモデルマウスの聴力等の表現型解析を実施した。また、遺伝子の組織特異的スプライシング調節機構の解析実験を立案し、実験系の確立に成功したので報告する。

【方法】第一に、CRSPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて作出した *Slc12a2* 変異導入マウスより 2 系統を選択し、聴力等の表現型を解析した。第二に、エクソン 21 組織特異的スプライシングのメカニズムの検証とエクソン 21 スキップ阻害剤の薬剤スクリーニングに有用な、ルシフェラーゼレポーターを用いたスプライシング活性アッセイ系を構築し、細胞培養系によりその有用性を検討した。

【結果】第一に、A：エクソン 21 のスキップを引き起こすと考えられる、難聴患者と等価と予想される変異を持つマウス、および B：エクソン 21 のスキップまたは遺伝子機能消失をもたらすと考えられる、エクソン 21 中フレームシフト変異を持つマウスの計 2 系統を選択した。A マウス系統は繁殖効率が非常に低く、現在解析を続行中である。B マウスは変異ホモマウスで聴性脳幹反応の閾値の著しい上昇がみられ、また前庭機能障害に特徴的な行動異常が観察された。この表現型は従来報告されていた *Slc12a2* 欠損マウスの報告とほぼ同等であった。第二に、レポーター遺伝子ルシフェラーゼ中に人工的に *Slc12a2* のイントロン 20 全長約 2.5 kb を挿入した発現ベクターの構築に成功した。これが実際にスプライシングにより、正常ルシフェラーゼと同等な活性をもつルシフェラーゼが発現すること、難聴患者で同定された変異を持つイントロン 20 存在下ではルシフェラーゼ活性が 100 分の 1 以下に低下することを確認した。本遺伝子の組織特異的スプライシングのメカニズムを解析するための有用なツールが開発されたのみならず、当該変異を原因とする難聴の治療薬候補のハイスループット・スクリーニングアッセイ系構築への重要な進展が達成された。

SLC12A2 タンパク質模式図と病的変異のエクソン 21 への集積



68. 難聴原因候補 *SLC12A2* の動物モデル等を用いた病態解析

松永　達雄

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

Key words：遺伝性疾患，難聴，動物モデル，スプライシング，ハイスループット・スクリーニング

緒　言

聴覚は内耳蝸牛による音刺激の感知と脳への神経伝達によって行なわれ、関連する遺伝子（現在 100 種類以上が知られる［1］）の突然変異は遺伝性難聴を引き起こす。500～1,000 人の新生児に一人は聴力に問題があるとされ、そのうち半数以上の原因が遺伝子変異である。私たちは 4,000 例以上の難聴者に対する遺伝子解析を実施し、その結果を臨床診断に活用してきた［2］。難聴遺伝子検査は本邦で保険収載されているが原因判明率は 3～4 割にとどまる。私たちはこの診断効率を高めるため、新規難聴遺伝子同定を目的とし、300 例以上の全遺伝子（エクソーム）解析を実施してきた。この結果、難聴遺伝子に絞った解析（パネル解析）もあわせ、新規難聴遺伝子候補 *Slcl2a2* を 4 家系で同定し、この成果を 2020 年に報告した［3］。本遺伝子は Na^+、K^+、$2Cl^-$共輸送体として、蝸牛内リンパ液組成の恒常性維持に必須であることが知られる。4 変異はいずれも特定のエクソン（エクソン 21）領域に集中し、その一つはエクソン 21 をスキップした転写産物を発現させる変異であった。興味深いことにこのエクソン 21 スキップ型転写産物は脳では内在性に発現するが蝸牛では強く抑制されている。また各変異を導入した変異体のイオン輸送能は有意に低下していたことをすでに明らかにしている。*Slc12a2* 欠損マウスが難聴を呈する［4～6］一方で、ヒト遺伝性難聴原因としての報告は今回が初であり、かつ予想される遺伝形式（優性遺伝）が既報（劣性遺伝）と異なることから、このエクソン 21 関連変異には、いわゆるドミナント・ネガティブ効果があると予想した。

本研究では、*Slcl2a2* を原因とする難聴の発症分子機序を明らかとするため、エクソン 21 周辺に難聴患者で見つかったものと同等あるいは類似の変異を持つマウスモデルを選択し、その聴力測定を実施した。次に、将来の薬剤治療候補のハイスループット・スクリーニングを可能とする、ルシフェラーゼレポーターを用いたエクソン 21 スプライシング活性のアッセイ系を構築したので報告する。

方　法（or 方法および結果）

1. *Slc12a2* 変異導入マウス系統の選択と聴力測定

CRSPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた *Slc12a2* のエクソン 21 アクセプター部位をターゲットとした変異導入マウスの作出自体は、共同研究者の務台がすでに実施している。*Slc12a2* 変異導入マウスの選択にはサンガーシーケンスおよび制限酵素 XbaI を用いた簡便スクリーニング法を併用した。近交系の FVB/NJ と最低 1 世代戻し交配し、変異ヘテロのオスメスを交配した。聴力測定には聴性脳幹反応（ABR）方を用いた。

2. ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしたスプライシング活性アッセイ系の構築

鋳型には、サイトメガロウィルスプロモーターを持つ、ルシフェラーゼ遺伝子 *LUC2CP*（イントロンなし）発現ベクターを Addgene より購入し用いた。*Slcl2a2* のイントロン 20 領域（約 2.5 kb）は、c.2930-2A>G 変異を持つ難聴患者およびその家族の血液由来ゲノム DNA より PCR にて増幅した。イントロン 20 領域を *LUC2CP* の特定の箇所に、In-FusionHD キット（Takara BIO 社）を用いて挿入し、スプライシング活性アッセイ系用の発現ベクターを構築した。各種発現ベクターは HEK293T（蝸牛組織と同様に、エクソン 21 スキップが著しく抑制されている細胞）に、コントロールとして Nanoluc 発現ベクターと共にリポフェクション法にて導入し、導入 2 日後に Dual Luc アッセイキットにより発光強度を検出した。測定には Promega 社の GloMAX Explorer を用いた。

結果および考察

1. *Slc12a2*変異導入マウス系統の選択と聴力測定

A：難聴患者と等価でエクソン 21 のスキップを引き起こすと考えられる、アクセプターサイトに塩基置換変異を持つマウス、およびB：エクソン 21 のスキップまたは遺伝子機能消失をもたらすと考えられる、アクセプターサイトからエクソン 21 にかけて欠損（フレームシフト）変異を持つマウスの計 2 系統を選択し、繁殖実験に供した。A の変異マウスについては繁殖効率が変異ヘテロのオスメス共に低く、生殖細胞への影響が推測された。さらに、一部のマウスは一回戻し交配した時点でもゲノムモザイクであることが判明した。現在、2 回戻し交配の実施に加え、他の近交系マウスとのハイブリッドマウスを作製し、雑種強勢による繁殖効率の上昇と変異ホモマウスを得るべく飼養中である。一方、B の変異マウスは変異ホモマウスが得られ、6〜7 週齢時点で著しい聴力閾値上昇が観察された（図 1）。これらマウス個体の一部もしくは全部について、前庭機能障害を反映する行動解析、組織学的解析、遺伝子発現解析を追加で実施中である。変異ヘテロのマウスは本当に聴力以外にも一切表現型に変化がないのか？これはヒトとマウスの動物種差なのか、それとも難聴患者で同定された変異と、本マウスモデルにおける変異のもたらす、スプライシングに対する影響の違いなのか？過去の文献で *Slc12a2* 遺伝子の重要な役割が報告された脳脈絡叢、唾液腺、小腸などの各臓器・組織にも注目し、今後さらに厳密な検討を進めていく予定である。さらに、新生仔マウスの蝸牛らせん神経節を用いた電気生理学的実験系を確立した。

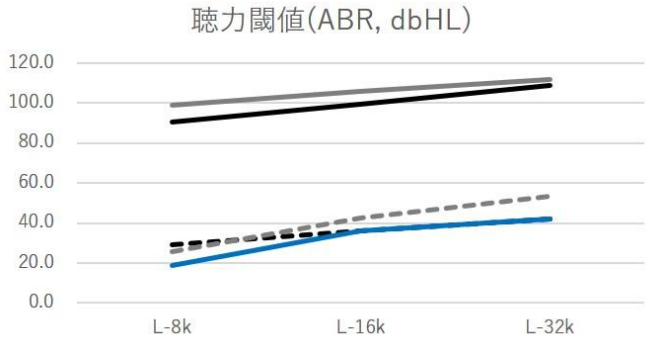


図 1. *Slc12a2*変異導入マウスの聴力像

Slc12a2 遺伝子変異ホモ（黒実線：オス、灰色実線：メス）およびヘテロ（黒点線：オス、灰色点線：メス）について、8 kHz（低音領域）から 32 kHz（高音領域）にかけての聴力閾値を測定した。野生型マウス（青実線）と変異ヘテロマウス間で有意差はみられないが、変異ホモマウスでは有意な閾値の上昇がみられた（$p<0.001$、one-way Anova-TukeyKramer）。変異ホモマウスの多くは測定限界を超えていた。オスメス間では、ややメスで閾値が上昇する傾向がみられたが、現在のN 数では、有意差はみられなかった。

2. ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしたスプライシング活性アッセイ系の構築

スプライシングアッセイには、定量的 RT-PCR 等を用いた地道な細胞分子生物学的解析が実施されるが［3］、より簡便な分子機序の解析、また薬剤開発のためのハイスループット・スクリーニングアッセイ系を構築するためには高感度で簡便なアッセイ系の開発が必須である。私たちは試行錯誤を経て、レポーター遺伝子として、細胞内でのタンパク質半減期が短いタイプのルシフェラーゼ遺伝子（Luc2CP）を用い、特定の位置に *Slcl2a2* イントロン 20 全長（約 2.5 kb）を挿入したベクターを構築することに成功した。イントロン 20 中に変異がない場合は、前半・後半に分断されたルシフェラーゼ遺伝子が正しくスプライシングされ、通常通り発現し活性が検出されることが判明した。一方、難聴患者で見つかったアクセプターサイトの変異（c.2930-2A＞G）導入により、スプライシング異常が起き、正常ルシフェラーゼ遺伝子が著しく阻害され、活性が正常ルシフェラーゼの 100 分の 1 以下に低下した（図 2）。本アッセイ系は基礎生物学としての組織特異的スプライシングの分子機構を解析するのに有用であると同時に、この活性を上昇させることを指標とした、本遺伝子を原因とする難聴治療薬候補の探索に活用できると考えられた。

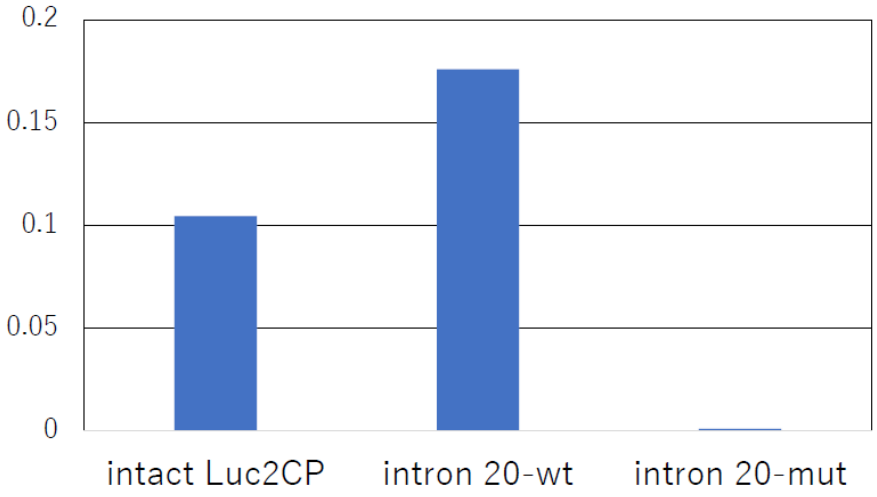


図 2. *Slcl2a2*-エクソン 21 スプライシングレポーターアッセイ用ベクター
イントロン 20 中に変異がない場合（intron 20-wt）は、イントロンの入っていないルシフェラーゼ発現ベクター（intact Luc2CP）と同様に、高度に発現し活性が検出された。一方、難聴患者で見つかったアクセプターサイトの変異 （c.2930-2A＞G）の導入（intron 20-mut）では正常ルシフェラーゼ遺伝子が著しく阻害され、活性が正常ルシフェラーゼの 100 分の 1 以下に低下することが測定された。

共同研究者・謝辞

本研究は共同研究者の務台英樹が主導的に計画・立案・実行した。また共同研究者の鷹合は、マウスのらせん神経節を用いた電気生理学的実験系を確立した。さらに、東京医療センター臨床研究センターの和佐野浩一郎先生、同臨床遺伝センターの山澤和樹先生らのご支援もいただき、薬剤スクリーニングに必須のマイクロプレートリーダー（Promega 社）の機器選定と購入が可能となった。ここに御礼申し上げる。

文　献

1） http://hereditaryhearingloss.org
2） 松永 達雄 遺伝学的診療の進め方 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 2018;90(8):598 DOI: 10.11477/mf.1411201774
3） 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. Variants encoding a restricted carboxy-terminal domain of *SLC12A2* cause hereditary hearing loss in humans. PLOS GENETICS (2020): 16(4): e1008643. PMID: 32294086 DOI: 10.1371/journal.pgen.1008643
4） Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T.Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. Nat Genet. 1999 Jun;22(2):192-5. PMID: 10369265 DOI: 10.1038/9713
5） Dixon MJ, Gazzard J, Chaudhry SS, Sampson N, Schulte BA, Steel KP. Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene Slc12a2 results in deafness in mice. Hum Mol Genet. 1999 Aug;8(8):1579-84. PMID: 10401008 DOI: 10.1093/hmg/8.8.1579
6） Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, Gawenis LR< Kramer J, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, Cardell EL, Shull GE. Mice Lacking the Basolateral Na-K-2Cl Cotransporter Have Impaired Epithelial Chloride Secretion and Are Profoundly Deaf. J Biol Chem. 1999 274:26946-55. PMID: 10480906 DOI: 10.1074/jbc.274.38.26946