

報告番号	甲 ㊦ 第	号	氏 名	小 島 敬 史
主 論 文 題 名				
Cell death-inducing cytotoxicity in truncated KCNQ4 variants associated with DFNA2 hearing loss (常染色体優性遺伝形式の遺伝性難聴DFNA2に関連するKCNQ4短縮型バリエントにおける細胞死の解析)				
(内 容 の 要 旨)				
Kv7.4は主として外有毛細胞に発現し、ホモ四量体で形成される電位依存型カリウムチャンネルであり、それをコードするKCNQ4は優性遺伝形式を取る非症候性感音性難聴DFNA2 (Deafness, Autosomal Dominant: DFNA) の原因遺伝子である。主として後天発症の進行性難聴を呈し、病原性メカニズムとしてチャンネル機能異常が考えられている。2021年10月の時点で70以上のKCNQ4バリエントが報告されているが、個々のバリエントに対する基礎生物学的裏付けは遅々として進まず、治療法も確立されていない。ホモ4量体を形成するのに必要なC末端のAssembly Domain (A-domain) を欠く短縮型バリエントにおいては、複合体が形成されないため優性阻害効果が起こらないはずにもかかわらず重度難聴を呈する症例や、劣性遺伝家系の報告といった従来の病態解釈では説明が困難な症例も存在する。また、<i>kcnq4</i>マウスモデルにおいてチャンネル機能異常では説明出来ない有毛細胞の脱落が観察されることから、チャンネル機能異常以外の病態があることが予想されてきた。 KCNQ4の難聴発症病態に迫る<i>in vitro</i>研究を行うにあたり、次に示す3つのA-domainを有しない短縮型バリエントに着目した。p.Q71fs (c.211delC) は進行性の軽度から中等度難聴の原因として日本を含む東アジアで最も頻度の高いバリエントで、N末端細胞質内ドメインのみであることから細胞膜ターゲットが不可能でありハプロ不全モデルとして選択した。p.W242X (c.725G>A) は高度から重度難聴の原因として報告されており、イオンの通過するチャンネル部分のバリエントであることから、優性阻害効果モデルとして選択した。p.A349fs (c.1044_1051del8) はヘテロでは難聴は示さず、ホモで高度から重度難聴の原因となる劣性遺伝の形質を持つことが報告されており、劣性遺伝モデルとして選択した。 ドキシサイクリン濃度依存的に目的タンパク質を発現させるHEK293T (Human Embryonic Kidney: HEK) 細胞由来の安定細胞株を構築し、Whole cell patch clamp法および共免疫沈降法による評価の結果、本研究の対象となる短縮型バリエントはいずれも単独ではチャンネルを構成することができず、さらに優性阻害効果によるチャンネル機能障害を起こすことができないことが示された。次にプレートリーダーを用いてリアルタイムに細胞死を観察したところ、HEK293T細胞や野生型と比較し、短縮型バリエントではドキシサイクリンの濃度依存的な強さで細胞死が観察された。細胞死の程度は難聴の程度と関連を認めた。細胞死の経路として、小胞体ストレスを介したアポトーシスが起きていることが示唆された。さらに既存の化合物ライブラリーを用いて薬物スクリーニングを行った結果、オートファジー誘導物質やアポトーシス阻害物質により細胞死の減衰を認めた。 KCNQ4短縮型バリエントによる難聴発症メカニズムは、従来考えられていた優性阻害効果もしくはハプロ不全ではなく、直接的細胞毒性によってアポトーシスが誘導されていることである可能性を示した。さらに、オートファジー誘導物質は本病態に対する治療候補役であることが示唆された。				