

201224116A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーのエピジェネティック病態解明と革新的治療法の開発

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 田中 裕二郎

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーのエピジェネティック病態解明と 革新的治療法の開発	----- 1
田中裕二郎	
(資料) DUX4 遺伝子プロモーター活性の解析	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 7
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 8

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの エピジェネティック病態解明と革新的治療法の開発

研究代表者 田中 裕二郎 東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授

研究要旨

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (Facioscapulohumeral muscular dystrophy, FSHD) は、進行性筋ジストロフィーの中で三番目に多く、約2万人に一人が発症する。第4番染色体テロメア近傍のD4Z4反復配列の短縮に伴ってdux4ホメオボックス遺伝子が異常発現することが原因のひとつと考えられている。2012年に我々のグループから、dux4の活性化にクロマチン制御因子ASH1が関わるということが明らかにされた。本研究は、ASH1によるdux4遺伝子活性化の分子機構に焦点をあて、FSHDの病態解明とそれに基づく治療法の実現を目指している。また、簡便な診断法を開発することにより、本邦に於けるFSHD患者の早期発見・早期治療への道を開くことも重要な課題とする。

A. 研究目的

FSHDは、Duchenne/Becker型、筋硬直型について頻度が多い進行性筋ジストロフィーで、第4番染色体テロメア近傍のレトロ反復配列(D4Z4)の短縮を伴う常染色体優性遺伝疾患である。臨床像が多様で左右差があることから、重症化に寄与する未知の要因も示唆されている。有効な治療法は未だ確立されていない。米国のFSH Societyの他、欧州機関の研究報告が多く(資料図1)、本邦の国立精神・神経センター神経研究所から遺伝子診断法の研究や、他の医療機関等から症例研究など貴重な報告がある。

FSHDの原因遺伝子は長年不明であったが、D4Z4(資料図2)の短縮に加え下流のSNP配列が転写終結シグナルになる患者でのみDUX4蛋白質が発現されることが分かった(資料図3)、ホメオボックス転写因子であるDUX4がFSHD原因遺伝子の有力候補となった経緯がある。一方FSHD患者でDUX4遺伝子の転写が活性化している原因については、Gabelliniら(伊)と申請者との共同研究により、クロマチン制御因子であるASH1が患者由来のゲノムでのD4Z4領域に結合し、DUX4の転写を活性化することが最近解明されている(Cabianca et al., Cell, 2012)。

申請者はASH1遺伝子を世界に先駆けて

単離し、抗体や発現ベクター等独自の研究基盤を持っている(Tanaka et al., Gene, 2007; Tanaka et al., BBRC, 2008; Tanaka et al., PLoS One, 2011)。本研究ではFSH Societyの2010年の提言から次の優先課題を検証する。

(1) DUX4プロモーターの調節:ASH1を含むtrithoraxグループ因子による活性化、及びヘテロクロマチン関連因子による抑制という二面から検証する。

(2) DUX4下流標的遺伝子:DUX4を発現する筋芽細胞は細胞死が誘導されるため、一過性にDUX4の発現を誘導できる系を用いて、システムズ解析により筋細胞死に関わるDUX4の下流標的を同定する。

(3) DUX4プロモーターの選択的阻害剤:ASH1・MLLの発現またはヘテロクロマチン関連因子のノックダウンによって活性化されたDUX4プロモーター・レポーター細胞を用いて、DUX4の転写抑制化合物を探索する。

(4)FSHDの分子診断:これまでFSHDの確定診断にはSouthern BlotやMolecular Combing法などの煩雑な検査が必要となる反面、病理学的には特異的所見に乏しいことから、臨床的には特徴的症状から診断されることが多かった。そこで、より簡便な分子診断法を開発することにより、本邦に於けるFSHD患者の早期発見・

早期治療への道を開きたい。

B.研究方法

【dux4 遺伝子のプロモーター活性解析】

FSHD 患者では第 4 番染色体テロメア近傍の D4Z4 反復配列が正常の約 100 コピーから 10 コピー以下に短縮する。その 5' 末端の非欠損領域 NDE(Non-deleted element)から、ASH1 等を介して non-coding RNA が転写されることにより dux4 遺伝子が活性化されると考えられている。これまでに我々は *trxG* に属する ASH1 と MLL が協調的に Hox 遺伝子プロモーターを活性化することを明らかにしている。NDE の転写においても同様に *trxG* 因子の相互作用が存在するのどうかを検証するため、NDE を含む約 1Kb の DNA 断片を CMV minimal promoter (miniP) を含むルシフェラーゼ・ベクター (pGV-B2) にクローニングした。

【ZFN による ASH1 遺伝子ノックアウト】

FSHD 治療のために例えば *ash1* 遺伝子や *dux4* 遺伝子の機能を抑制した場合、筋細胞分化がどのような影響を受けるかは重要な問題である。そこで、ヒト筋芽細胞で ASH1 をノックアウトするために Zinc Finger Nuclease (ZFN) 型 DNA 切断酵素を合成し、4 種について活性を測定した (東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・野村渉准教授との共同研究)。まず、*in vitro* 翻訳系を用いて合成した ZFN 酵素蛋白質とヒト *ash1* 遺伝子由来の DNA 断片を用いて切断活性を測定した。更に ZFN 酵素をマルトース結合ドメインと結合したリコンビナント蛋白質を作成し、それぞれの DNA 結合力と DNA 切断活性の関係を定量した。次いで、ZFN を哺乳類細胞発現ベクターにクローニングし、ヒト *ash1* 遺伝子由来のホモロジー配列の間に Puromycin 耐性遺伝子を含むターゲティングプラスミドと共に HeLa 細胞、293T 細胞、K562 細胞、Jurkat 細胞 (いずれもヒト由来がん細胞株) に導入して、*ash1* 遺伝子の変異誘導効率を検討した。

【リコンビナント Phi29DNA ポリメラーゼの合成】

FSHD の遺伝子診断には、D4Z4 反復配列長 (10 コピー以下) に加え、3' 末端の

転写終結配列を決定することが必要である。しかも D4Z4 は GC 含有率が 72.6% と極めて高く、現在入手可能な DNA 酵素の中では唯一 Phi29DNA ポリメラーゼが、ヒトゲノムの中から D4Z4 領域を増幅できる可能性がある。Phi29 に DNA 結合ドメインを融合した合成酵素 (Phi29H) がさらに高い DNA 合成活性を有することが報告されているため、我々は Phi29 のコドン最適化した上、発現ベクター (pET24a) にクローニングし、リコンビナント蛋白質の合成と可溶化条件最適化を行い、さらに His タグによって精製した。

【NanoDrop 蛍光分光光度計による超微量ヒストン修飾酵素活性の定量】

dux4 遺伝子がエピジェネティックな制御を受けるという事実は、ヒストン修飾酵素阻害剤が FSHD の治療手段となることを意味している。我々は既に FRET 標識ペプチドとリジルエンドペプチダーゼを用いたヒストン修飾酵素活性定量法を開発しているが (未発表)、特にヒストン修飾酵素に選択制を持つ低分子化合物阻害剤のハイスループットスクリーニング系 (平成 26 年度を予定) を構築するため、新たに NanoDrop 蛍光分光光度計を導入し、従来から約 100 分の 1 にスケールダウンした超微量測定法の条件検討を行った。

C.研究結果

【dux4 遺伝子のプロモーター活性解析】

NSD-miniP レポーターが ASH1 と MLL によって Hox プロモーターと同程度に活性化されることを確認した。

【ASH1 遺伝子ノックアウト】

ash1 遺伝子のエクソン 3 近傍の塩基配列を標的とする ZFN 酵素ペア (ヘテロダイマーとして作用する) を 4 種作成した。*in vitro* で、それぞれ ZFN 酵素の DNA 切断活性が異なっており、これが DNA 結合力と相関することを明らかにした。一方 *in vivo* では未だ *ash1* 遺伝子改変を検出できていないため、ZFN 塩基配列のコドン最適化を行い、哺乳類細胞での ZFN 蛋白質の発現量が増加することまで確認した。

【リコンビナント Phi29DNA ポリメラーゼの合成】

Ni-NTA カラムに結合させた Phi29H・

His タグ蛋白質を imidazole によって溶出し、極めて純度の高いリコンビナント酵素を作成することに成功した。

【NanoDrop 蛍光分光光度計による超微量ヒストン修飾酵素活性の定量】

K27 メチル化ペプチドと脱メチル化酵素を用いたモデル系で、脱メチル化反応を行い、1-2 μ l で定量性に優れた測定系を構築した。

D. 考察

本研究の初年度の課題として最も重要な **dux4** 遺伝子の NDE 領域のプロモーター活性を確認することが出来た。**dux4** は *in vitro* で **ASH1** に反応することが確認された遺伝子としては **Hox** 遺伝子以外では始めてのものである。**ASH1** はヒストン H3 リジン 36 (**K36**) 選択的なメチル化活性を持ち、ゲノムの **ASH1** 結合部位は **K27** と排他的関係にあることがこれまでの我々の研究から明らかになっている (未発表)。NDE レポーターを用いることにより、今後 NDE に於ける **ASH1** 反応配列の決定、**K36**・**K27** を中心とするエピジェネティック制御因子による転写制御機構の解明を通して、**FSHD** に於ける **dux4** 異常発現の分子機構の理解が進むと期待される。

ヒト細胞での **ASH1** 遺伝子ターゲティングには、まだ技術的課題が残されている。ホモロジー・アームを長くする、DTA によるネガティブ・セレクションを加えるといった検討を行なっているが、今後 **FSHD** 患者由来の初代培養筋芽細胞で **ASH1** 遺伝子をノックアウトするには更に困難が予想される。場合によっては、ノックダウンによるアプローチも並行して検討するべきかも知れない。

FSHD の遺伝子診断に向けて、**Phi29H** リコンビナント酵素の合成に成功したので、今後ヒトゲノムから **D4Z4** 領域を増幅するための条件検討を行う予定である。ただし **FSHD** の責任領域である第 4 番染色体は、第 10 番染色体にも極めて相同性の高い領域が存在し、その他にも **D4Z4** 配列と相同性の高い断片がヒトゲノムには複数存在するので、その中から如何に第 4 番染色体を選択的に増幅するかが課題となる。一方、ロング・リードに最適化された **PacBio** シー

ケンサーを用いて **D4Z4** 反復配列の *de novo* アセンブリを行うための解析アルゴリズムの開発も、並行して進める必要がある。

FSHD の治療法の一つとして、エピジェネティック制御因子の選択的阻害剤が考えられる。そのために、低分子化合物のハイスループットスクリーニングに適した超微量ヒストン修飾酵素活性測定法を開発した。ただし、分子センサーとしてのリジルエンドペプチダーゼのヒストン修飾感受性を更に改善するなどの課題も残されているので、基質となる **FRET** 標識ペプチドの合成も合わせて今後進めていく予定である。

E. 結論

本研究の目的である **FSHD** の病態解明、診断法及び治療法の開発に向けて、それぞれ NDE レポーターの構築、リコンビナント DNA 合成酵素 (**Phi29H**) の産生、エピジェネティック制御因子の選択的阻害剤スクリーニングの為の基盤確立に成功した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
第 35 回日本分子生物学会年会
平成 24 年 12 月 (福岡)
Regulation of DUX4 gene expression by ASH1 in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Tanaka Y., Cabianca DS, Gabellini D.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
学内審査中 (ヒストン修飾酵素活性測定法)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 FSHD研究のトレンド

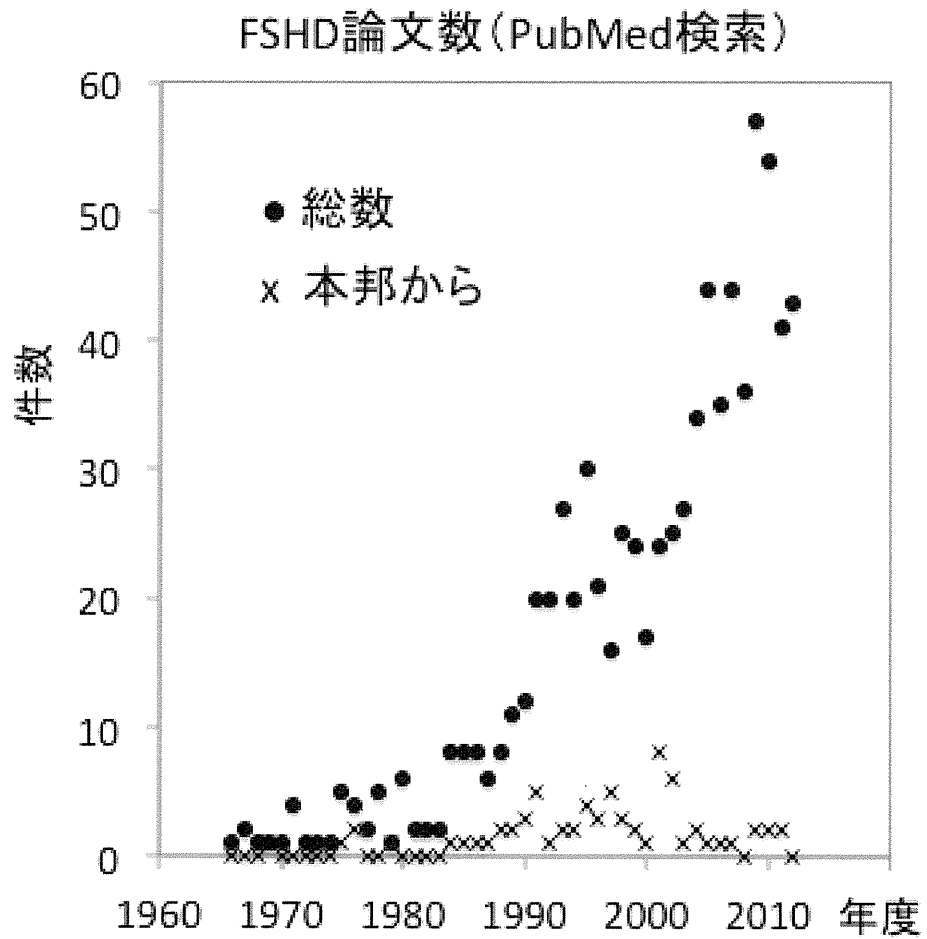


図2 D4Z4反復ユニットの基本構造

ダブルホメオボックス蛋白質(dux4)をコードする。

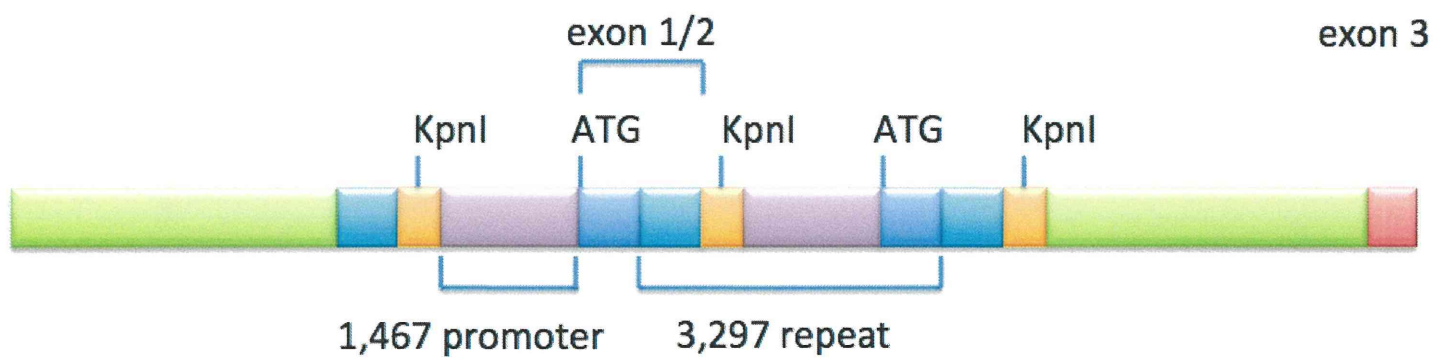
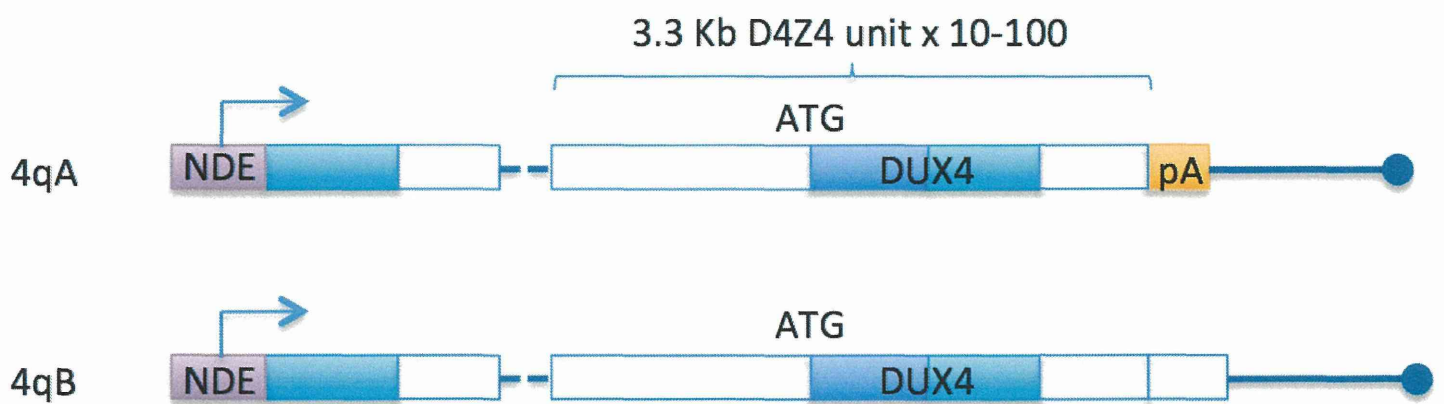


図3 D4Z4の構造と3'領域のポリモルフィズム

D4Z4の短縮に加え、4qAアレルのみ発症する。



研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし

研究成果の刊行物・別刷

該当なし

