

2013/7082A

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 田中 裕二郎

平成26(2014)年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
顔面肩甲骨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	
1. ASH1 による FSHD 遺伝子座の活性化モデル	
2. ASH1 遺伝子ノックアウト	
3. Suz12 遺伝子ノックアウト	
4. G9a 遺伝子ノックアウト	
5. D4Z4 トランスジェニックマウス	
6. PacBio RS による D4Z4 シーケンシング	
7. D4Z4 のターゲット・リシーケンシング	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 8
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 9

## 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、主に第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* ホメオボックス転写因子が異常発現することが原因と考えられている。一部の FSHD 患者ではヘテロクロマチン制御因子 *smchd1* の変異が存在することからも、クロマチン構造の異常が病態基盤にある可能性が高い。本研究の目的は、2012年に我々が報告したヒストンメチル基転移酵素 ASH1 による D4Z4 遺伝子座の転写制御についてその分子作用機序を明らかにし、これを標的とする新たな治療法を開発すること、またこれまで複雑な手技を必要としていた FSHD の遺伝子診断について次世代シーケンサーを用いたより簡便な方法を開発することである。本年度は、D4Z4 のプロモーター・レポーターの解析、CRISPR/Cas システムによる ASH1 及びヘテロクロマチン制御遺伝子のノックアウト技術の開発、D4Z4 トランスジェニックマウスモデルの作成、PacBio RS 一分子 DNA シーケンサーによる D4Z4 反復配列のシーケンシング及びアセンブリを行った。

### A. 研究目的

FSHD は、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、進行性筋ジストロフィー症の中で三番目に頻度が高い。筋萎縮に左右差があること、家族内でも臨床像にばらつきがあることが他の筋ジストロフィーと異なる特徴で、重症化に寄与する未知の要因も示唆されている。10万人に約5人の発症率であることから、数千人規模の潜在的患者が予想されるが、海外からの報告に比べ本邦での臨床研究は立ち遅れているのが現状である。

FSHD の患者では D4Z4 の反復数が 10 コピー以下に短縮しているか (1 型) 又はヘテロクロマチン制御因子 SMCHD1 に変異が存在する (2 型) ことから (Lemmers et al., Nat. Genet., 2012)、FSHD の病態の本質はクロマチン制御機構の破綻である可能性が高い。何れの患者でも D4Z4 領域の 3' 側にある SNP 配列が転写終結シグナルになることが発症に必須であることから、D4Z4 にコードされるホメオボックス転写因子 DUX4 の発現及び蛋白質生成が FSHD における筋萎縮の原因と考

えられる (Lemmers et al, Science, 2010)。このような経緯から、DUX4 及びその下流標的遺伝子である PITX1 が FSHD の分子治療標的となる可能性があり、現在世界的に治療法開発が進められている。

一方我々は、2012年にイタリアの FSHD 研究グループとの共同研究により、DUX4 遺伝子の転写活性化にはヒストンメチル基転移酵素 ASH1 が選択的に関与していることを報告している (Cabianca et al., Cell, 2012)。特に、ASH1 の D4Z4 領域への結合には D4Z4 の上流から転写される non-codingRNA(ncRNA)が関わっている可能性がある (資料1)。申請者はマウス ASH1 遺伝子を世界に先駆けてクローニングし、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)。これらの実績を踏まえ、我々は ASH1 を中心とするクロマチン制御因子に焦点を当てた FSHD の基礎研究を推進している。

本年度の研究目的は、(1) 病態解明：ASH1 及びヘテロクロマチン制御因子による D4Z4 転写制御機構の解明、(2) 治療薬

開発のための細胞スクリーニング系の確立、  
(3) 次世代シーケンサーによる FSHD の  
遺伝子診断法の確立の 3 つに要約される。

## B. 研究方法

【D4Z4 の 5' 上流を含むレポーターの構築】  
前年度の研究から更に 5' 上流の NDE  
(Non-deleted element) に伸展したレポー  
ターを作成した。

【CRISPR/Cas システムによる ASH1 及び  
ヘテロクロマチン制御因子のノックアウト】  
Church 研究室から譲渡を受けた gRNA  
(ガイド RNA) 発現ベクター及び Cas9 発現  
ベクターを用い、ヒト又はマウス細胞で  
ASH1、Suz12、G9a 遺伝子をノックアウト  
した。また、CRISPR/Cas 法により ASH1  
遺伝子ノックアウトマウスを作成した。

【D4Z4 トランスジェニックマウスの作成】  
D4Z4 領域を含む BAC クローンを新たに  
入手し、これをマウス受精卵前核に注入す  
ることによりトランスジェニックマウスを  
作成した。

【D4Z4 を含む BAC クローンのシーケンシ  
ング及びアセンブリ】

D4Z4 領域全体を含む BAC クローンを新  
たに入手し、一分子 DNA シーケンサー  
(PacBio RS) によるシーケンシングを行  
い、de novo アセンブリ、ターゲット・リ  
シーケンシング法によるアセンブリを試み  
た。

## C. 研究結果

【D4Z4 の 5' 上流を含むレポーターの解析】  
D4Z4 の 5' 上流の NDE に伸展したレポ  
ーターと ASH1 及び MLL 発現ベクターを  
HeLa 細胞にトランスフェクションし、  
D4Z4 プロモーターの転写活性化を確認し  
た。

【CRISPR/Cas システムによる ASH1 及び  
ヘテロクロマチン制御因子のノックアウト】  
前年度まで Zinc Finger Nuclease (ZFN)  
を用いた遺伝子ノックアウトを試みたが、  
細胞内で ASH1 遺伝子に変異を導入するこ  
とは出来なかった。さらに TALEN を用い  
た方法も検討したが、ベクター構築が困難  
でこの方法も断念した。平成 25 年初めに  
CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子操作  
法が報告されたため、次にこの方法を検討

した。ベクターを Church 研究室から取り  
寄せ、まず Gibson アセンブリ法によって  
標的部位を含む 21bp の特異的配列を  
gRNA(ガイド RNA) 発現ベクターに組み込  
んだ。さらに遺伝子特異的 gRNA と Cas9  
発現ベクターをエレクトロポレーションに  
よってヒト白血病細胞 K562 またはマウス  
筋芽細胞 C2C12 に導入し、限界希釈法に  
よってクローンを単離、ゲノム DNA から  
PCR によって標的遺伝子を増幅しシーケ  
ンシングによって変異を確認した。K562  
または C2C12 いずれの細胞においても、薬  
剤選択なしに ASH1 (K562, C2C12)、Suz12  
(C2C12)、G9a(C2C12) 遺伝子の変異を含む  
クローンを確認した。さらにクローンによ  
っては両アレルにフレームシフト変異を有  
するものがあり、ホモ・ノックアウト細胞  
を樹立することにも成功した(資料 2-4)。

マウスに関しては、C2C12 に用いたのと  
同じ gRNA を受精卵前角細胞に注入するこ  
とにより、ASH1 遺伝子エクソン 2 に変異  
を導入することに成功した。これが  
germline に入っていることが、C57BL/6  
への交配によって確認された(資料 2)。

さらに ASH1 のヒストンメチル基転移活  
性部位である SET ドメインに酵素活性を  
不活化するヒスチジン-アルギニン点変異  
を導入するため、Cas9、gRNA に加え 126bp  
の変異配列を含むオリゴヌクレオチドをマ  
ウス受精卵前核に注入したところ、生まれ  
た 2 匹のうち 1 匹に目的の点変異が含まれ  
ることを確認した。

【D4Z4 トランスジェニックマウスの作成】

D4Z4 配列 (13 コピー) を含む BAC ク  
ローンを新たに入手し、これが D4Z4 領域  
の 5' 末端 (プロモーター) 及び 3' 末端  
(polyA シグナル) を含むことを確認した。  
次いで、この BAC クローンをマウス受精  
卵前核に注入し、トランスジェニックマウス  
を作成した。ゲノム DNA の PCR により、  
BAC クローンを含むマウス 3 ラインを同  
定し、現在 C57BL/6 と交配して germline  
に入っているかどうかを検討している(資  
料 5)。

【D4Z4 を含む BAC クローンのシーケンシ  
ング及びアセンブリ】

前年度までに、D4Z4の5'末端の一部(D4Z4を3.5コピー)を含むBACクローンをPacBio RSによってシーケンスすることに成功していたが、新たにD4Z4全体を含むBACクローンを入手し、リード長がさらに伸長したP4-C2及びP5-C3ケミストリによるシーケンシングを行った。何れの方法でも、30Kbを超える長いリードが得られ、P4-C2ケミストリについてはPacBioのHGApアルゴリズムを用いてde novoアセンブリに成功した(資料6)。P5-C3データはHGApアルゴリズムではde novoアセンブリ出来なかったため、D4Z4のコンセンサス配列からなるテンプレートを作成し、ターゲット・リーシーケンシングを行ったところ、13コピーと予想される反復数に一致したピークを確認することが出来た(資料7)。

#### D. 考察

D4Z4 遺伝子座のクロマチン構造を制御する分子機構を解明するには、ASH1 と関連ヘテロクロマチン制御因子の役割をそれぞれ明らかにすることが重要である。本年度は、D4Z4 のプロモーター・レポーターを構築するとともに、CRISPR/Cas システムによってASH1、Suz12、G9a 遺伝子をそれぞれ細胞株或いはマウスにおいてノックアウトする技術を確認することが出来た。これは、これまでのshRNAによる遺伝子ノックダウンに比べ明らかなアドバンテージがあると考えられる。クロマチン構造は正の因子(ASH1)と負の因子(Polycombグループ)により細胞内で動的に制御されていると考えられており、それぞれの因子がどのようなバランスで制御されているのかを明らかにすることがASH1によるD4Z4の転写制御機構を明らかにする上で重要なポイントである。特に筋細胞分化モデルとして広く用いられているC2C12細胞でこれらの因子をノックアウト出来たので、今後はC2C12の筋細胞分化モデルを用いてASH1とヘテロクロマチン制御因子による筋細胞分化の制御を解析するとともに、D4Z4レポーターを用いてその転写制御機構を検証する予定である。

FSHDの遺伝子診断に関しても、着実な進歩があった。D4Z4全体を含む新たな

BACクローンを用いてPacBio RSの改良されたプロトコルによって30Kbを超える非常に長いリード配列を得ることに成功したばかりでなく、de novoアセンブリ又はコンセンサス配列を用いたターゲット・リーシーケンシングによるアセンブリが原理的に可能であることを初めて示すことが出来た。今後、実際の患者細胞を用いて、D4Z4遺伝子領域を選択的に増幅することが出来れば、次世代シーケンス法によってFSHDの遺伝子診断が可能になると期待される。

FSHDの治療に関しては、現在世界的には転写因子であるDUX4の下流でPITX1が病態発生に関わる有力候補として同定されるなど(Geng, Dev. Cell, 2012)、DUX4を治療標的に見据えた研究が展開されている。しかし、DUX4が極めて低いモザイク状の発現パターンを示すこと、DUX4以外の遺伝子(FRG1)に関わる可能性があることから、FSHDの発症機序は必ずしも明らかではなく、治療戦略としてはD4Z4領域の不適切なクロマチン構造そのものがより効果的な標的と考えられる。我々は、これまでD4Z4領域のクロマチン構造制御に焦点を当てた研究を進めてきたが、FSHDの治療法としてはD4Z4へのASH1の結合に関与するncRNAを標的とする方法が特異性が高いと考えられる。そこで、DNA/RNAヘテロ核酸技術で実績のある本学医学部脳神経病態学分野横田隆徳教授との共同研究を立ち上げ、最終年度はD4Z4領域から転写されるncRNAに対するノックダウンベクターを開発する予定である。

#### 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、それぞれレポーターの構築、ASH1及びヘテロクロマチン制御因子のノックダウン技術の確立、D4Z4領域のシーケンシング及びアセンブリの原理的証明に成功した。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

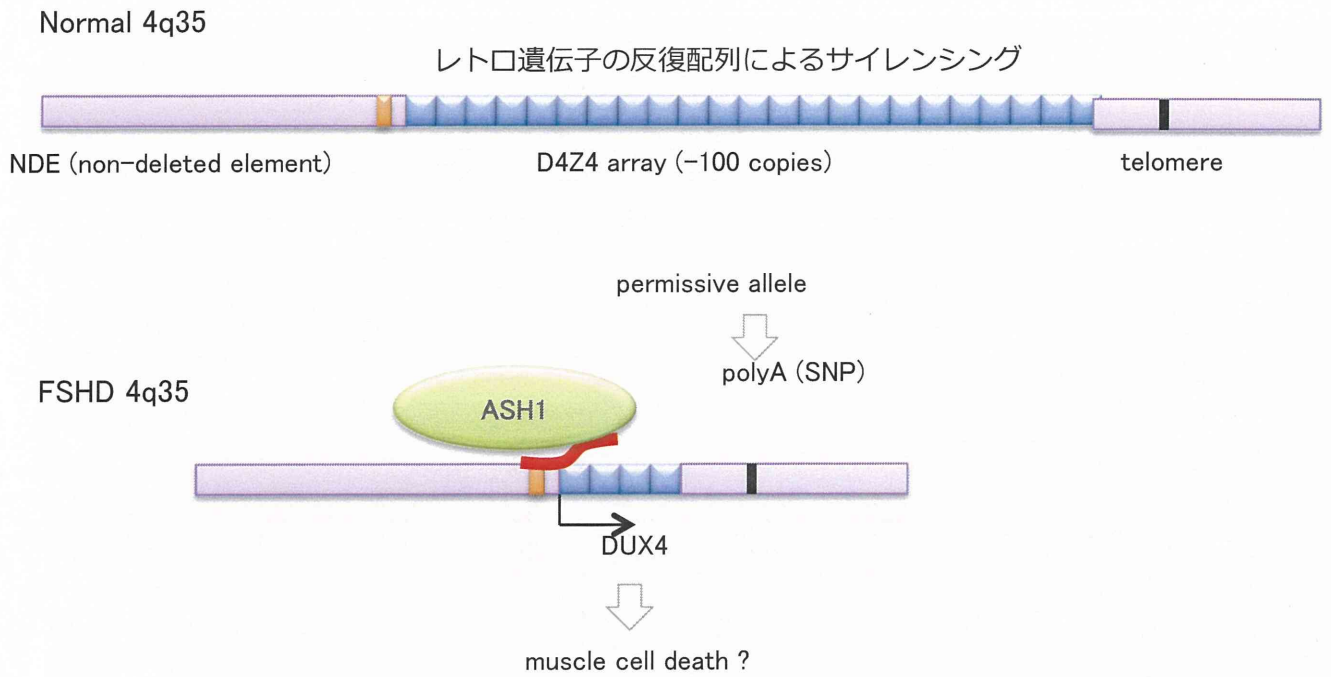
#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
第36回日本分子生物学会年会  
平成25年12月(神戸)  
一分子シーケンシングによるヒトゲノム  
反復配列のマッピング(田中裕二郎)

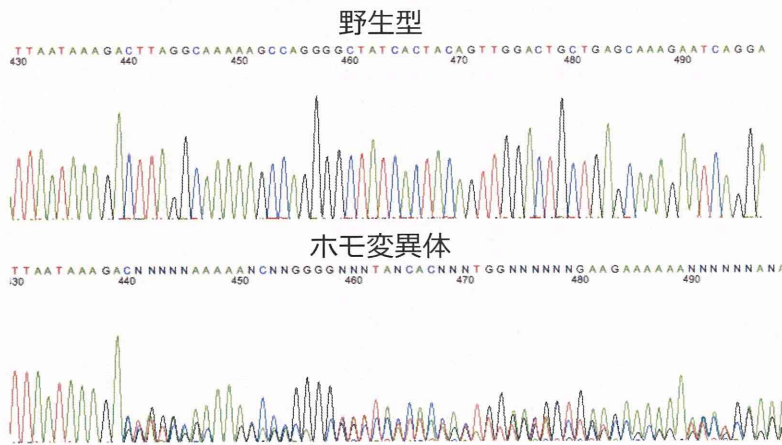
#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

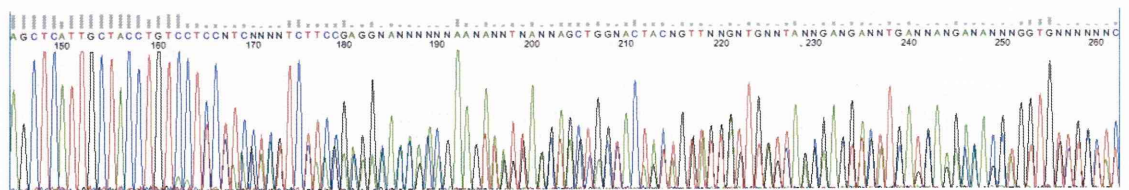
資料1 ASH1によるFSHD遺伝子座の活性化モデル



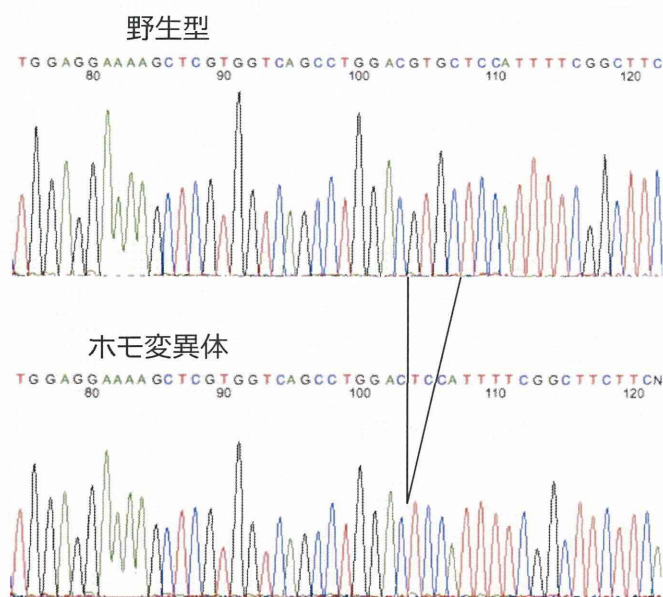
資料2 C2C12細胞 : Ash1遺伝子複合ホモ変異体



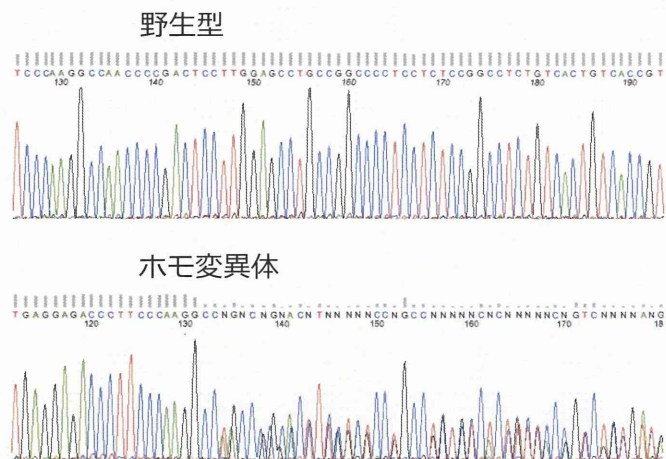
Ash1遺伝子ノックアウトマウス (C57BL/6とのF1)



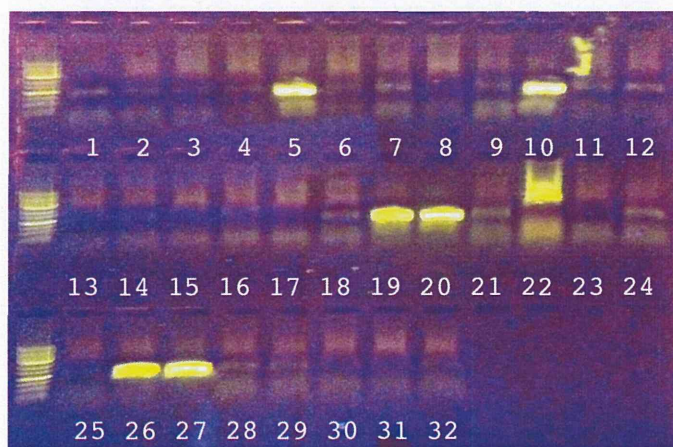
資料3 C2C12細胞 : Suz12遺伝子ホモ変異体 (4bp欠損)



資料4 C2C12細胞 : G9a遺伝子複合ホモ変異体

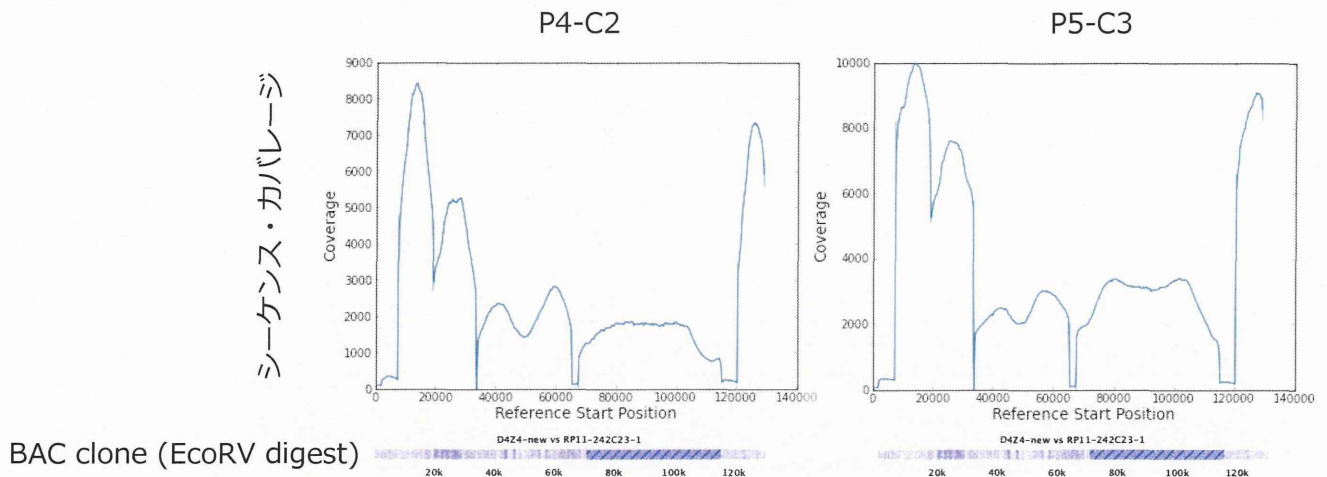


資料5 D4Z4トランスジェニックマウスのスクリーニング結果

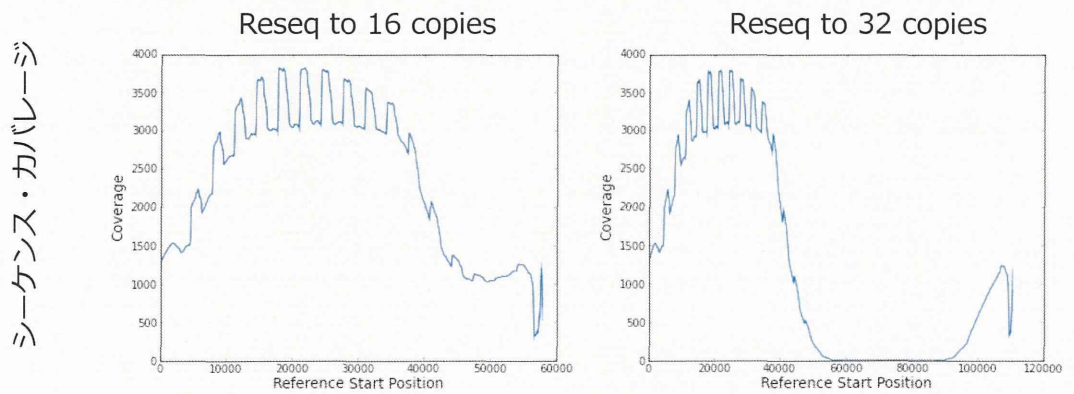




資料6 PacBio RSによるD4Z4 BACクローンのシーケンシング結果



資料7 P5-C3ケミストリ：ターゲット・リシーケンシング



厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書

該当なし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし。

