

FHSD の病態解明及び新規遺伝子診断法に関する研究

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遺伝生化学分野 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、4番染色体テロメア近傍のD4Z4反復配列の短縮またはヘテロクロマチン制御因子SMCHD1遺伝子の変異を伴う常染色体優性遺伝疾患で、最新の統計報告では10万人に12人の発生率と、進行性筋ジストロフィー症の中でも多いことが知られている。FSHDの原因はD4Z4にコードされるホメオボックス転写因子DUX4の異常発現と考えられており、これにはD4Z4領域の5'側から転写されるlong non-coding RNA (lncRNA)とこれに結合してクロマチン構造を制御するヒストンメチル基転移酵素ASH1が関係する。

我々は、このようなFSHDに関してASH1を中心としたクロマチン、転写制御機構に焦点を当て、病態機構解明、新規分子標的治療薬の開発、新規遺伝子診断法の開発という三つの柱を掲げて研究を進めて来た。

病態機構に関しては、CRISPR/Cas9システムを用いてASH1を始めとするクロマチン構造制御因子を欠損するマウス筋芽細胞株C2C12細胞、2種4系統のASH1ノックアウトマウス、D4Z4トランスジェニックマウス（FSHD疾患モデル動物）を作成した。

治療法に関してはlncRNAに対するLNA (Locked Nucleic Acid) gapmer アンチセンスオリゴ20種を合成し、lncRNA発現ベクター及びD4Z4トランスジェニック細胞を基盤とするアッセイ系を構築した。

また、診断法については患者ゲノムからD4Z4領域を選択的に精製する方法とこれを一分子DNAシーケンサーPacBio RSによってシーケンシング、de novo アセンブリーを行う技術基盤を確立した。

研究分担者氏名	所属機関	職名
横田隆徳	東京医科歯科大学	教授
森岡勝樹	東京医科歯科大学	助教

A. 研究目的

FSHDは、4番染色体テロメア近傍(4q35)にあるレトロ反復配列D4Z4領域のクロマチン構造を基盤とするエピジェネティックな疾患である。健常人では、D4Z4が10コピー以上反復しており、ヘテロクロマチン構造であるのに対し、FSHD患者においては、大部分(95%)はD4Z4の反復数が10コピー未満に短縮しており(1型)、それ以外の患者の一部ではヘテロクロマチン制御因子であるSMCHD1遺伝子の変異が見つかる(2型)。何れにしても、FSHD患者のD4Z4ゲノム領域はヘテロクロマチン

ン構造ではなく転写が活性化されており、その結果最も3'に位置するD4Z4の転写産物にコードされるホメオボックス転写因子DUX4が発現され、さらにその下流にあるPITX1等によって筋萎縮が引き起こされると考えられている(図1)。

FSHDは、顔面の表情筋と上半身から始まる左右差のある筋萎縮が臨床的な特徴で、感音性難聴と網膜血管異常を高頻度に合併する。D4Z4反復が短いほど発症時期が早く重症化するが、他に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。発生率は進行性筋ジストロフィー症の中ではDuchenne/Becker型、筋硬直型について高く、10万人に5人の発生率と言われていたが、昨年の統計報告では12人という予測もある。他の進行性筋ジストロフィー症に比

べ生命予後が良好であることもあり、有病率は筋ジストロフィー症の中で最も高い可能性がある。これまで、米国の FSH Society の他、欧州機関の研究報告が多く、本邦では基礎的研究が立ち遅れていた（図 2）。

FSHD の原因遺伝子は長年不明であったが、D4Z4 の短縮に加え下流の SNP 配列が転写終結シグナルになる 4qA アレル（図 3）でのみ mRNA が安定化され DUX4 蛋白質が発現されることが分かり（図 4）、DUX4 が FSHD 原因遺伝子の有力候補となった経緯がある（Lemmers et al., 2010）。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、クロマチン構造制御因子である ASH1 が患者ゲノムの D4Z4 領域に結合し、DUX4 の転写を活性化することが明らかになっている（Cabianca et al., Cell, 2012）。

ASH1 はヒトに存在する SET ドメインを持つヒストンメチル基転移酵素の一つで（図 5）、我々は、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、我々の研究背景を活かし、FSHD に関して（1）ASH1 と関連するクロマチン構造制御因子による D4Z4 転写制御機構の解明、（2）エピジェネティックな病態機構に着目した分子標的治療薬の開発、（3）放射性同位元素を用いるこれまでの煩雑な遺伝子診断法に代わる新たな診断法を開発を目指している。具体的には、遺伝子操作技術を駆使したクロマチン制御因子のノックアウト、BAC クローンを用いた FSHD 疾患モデルマウスの作成及び D4Z4 反復配列の精製・シーケンス技術の開発、創薬スクリーニングのためのアッセイ系の確立といった研究基盤の構築を目標としている。

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 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 コピー未満に短縮する。その 5' 末端の非欠損領域 NDE(Non-deleted element) から、non-coding RNA が転写されること

により D4Z4 領域の転写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ため、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かどうかを検証するため、NDE を含む 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 及び CRISPR/Cas9 システムによる ASH1 と関連クロマチン制御因子の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。

まず、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。

次いで、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変を試みるために、Church 研究室から譲渡を受けた sgRNA（ガイド RNA）発現ベクターを構築し、Cas9 発現ベクターとともにヒト（K562 慢性骨髄性白血病細胞）及びマウス細胞株（C2C12 筋芽細胞）にエレクトロポレーション（MP-100, Digital Bio 社）によって導入し、ASH1、Suz12、G9a、SMCHD1 遺伝子をそれぞれ単独またはダブルでノックアウトした。

同様に、Cas9 及び ASH1-sgRNA を受精卵前核にインジェクションすることにより、

ASH1 遺伝子のエクソン 2 及び SET ドメインに遺伝子変異を誘導した。

ASH1 遺伝子変異による初期発生への影響を検証するとともに、ASH1 ヘテロ欠損マウスの交配によってホモ欠損マウスが生後 1 日目に致死性であることを見出した。

【D4Z4 トランスジェニックマウスの交配】

FSHD 疾患モデル動物を作成するために、D4Z4 領域 (13.5 コピー) を含む BAC クローンをを用いてトランスジェニックマウスを作成した。BAC クローンのコピー数が異なる 3 つにマウス系統を樹立し、C56BL/6 へのバッククロスを進めるとともに、一部は ASH1 ノックアウトマウスとの交配を行った。

【LNA gapmer の合成】

ジーンデザイン社 (Eziqon 社) のノックダウンオリゴのデザインアルゴリズムを用いて、DBE-T に対する 20 種類の LNA gapmer (ヘテロ核酸) を合成した。また、DBE-T の発現レベルを定量するための Taqman PCR プローブを合成した。

【DBE-T 発現ベクターの作成】

LNA gapmer の活性を *in vitro* で評価するため、3,374bp の DBE-T を CMV プロモータ下にクローニングした発現ベクターを作成した。

【D4Z4 を含む BAC クローンのシーケンシング、de novo アセンブリ、シミュレーション実験】

D4Z4 領域の一部又は全体を含む BAC クローンを BAC PAC Resources (Children's Hospital Oakland Research Institute) より入手し、一分子 DNA シーケンサー PacBio RS によるシーケンシング及び de novo アセンブリを試みた。このライブラリーのインサートの長さは平均 80Kb である。20 μ g の DNA をランダムに断片化 (G-tube) または D4Z4 反復配列の外側で切断する EcoRV で処理し、濃縮 (AMPure)、SMRTbell ライブラリ作成 (Pacific Bioscience) を行い、DNA/Polymerase Binding Kit: P4 または P5、Sequencing reagent: v2.0 (C2 または C3)、SMRT cell; v3 を用いて 1 セル

のシーケンスを行った。

得られたシーケンスデータを用いて、PacBio による HGAP 解析パイプラインによる de novo アセンブリを行った。また、約 15 万リードのシーケンスデータの一部 (100~4 万) をランダムに選び、de novo アセンブリが可能かどうか、またどのような配列情報がアセンブリに影響するかをシミュレーション実験によって検証した。

【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 70~80% 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性条件最適化を行い、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。

【D4Z4 ゲノム領域の精製技術開発】

CRISPR/Cas9 システムにおいて、ヌクレアーゼ活性を欠損する Cas9 (dCas9) に FLAG タグを付けたリコンビナント蛋白質 (FLAG-dCas9) を合成した。また、4 番染色

体と 10 番染色体の D4Z4 相同領域の 3' 末端にある転写集結シグナル周辺(pLAM 配列) で、それぞれ配列が異なる部位に対する選択的ガイド RNA (sgRNA) を合成した。FLAG-dCas9/D4Z4-sgRNA 複合体をマグネットビーズに固相化し、これと 4 番染色体または 10 番染色体の pLAM 配列を含むプラスミド DNA を反応させ、特異的結合を PCR によって検証した。

(倫理面への配慮)

本研究は、本学組換え DNA 実験委員会及び動物実験委員会の承認を得て行っている。FSHD 患者の末梢血検体採集については、本学医学部倫理審査委員会(承認番号 199)及び難治疾患研究所倫理委員会(承認番号 2014-012)の審査を経て承認を得ている。

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。

【ZFN による ASH1 遺伝子ノックアウト】

ASH1 は HOX 遺伝子の発現維持に必要なとされる Trithorax グループ因子の一員で、HOX 遺伝子の発現を抑制する Polycomb グループ因子と拮抗的に作用してクロマチン構造を制御する。FSHD に於いては、ASH1 が D4Z4 の転写活性化因子として、ヘテロクロマチン制御因子 SMCHD1 が抑制因子としてそれぞれ知られているが、D4Z4 における Polycomb 因子の役割は不明である。そこで、ASH1 を中心とするクロマチン制御因子がどのように D4Z4 の転写を制御するか解析するため、まず ASH1 遺伝子ノックアウトを試みた。

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 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が、最終的に ZFN では ASH1 遺伝子ノックアウトは出来なかった。

【CRISPR/Cas9 システムによる ASH1 及びクロマチン構造制御因子ノックアウト細胞株の作成】

平成 25 年始めに CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変技術が報告されたことから、Church 研究室からベクターを取り寄せ、まず Gibson アセンブリ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樹立した。Ash1、Suz12、G9a についてはそれぞれ 12~30 クローン当たり 1 個のホモ欠損細胞を得ることに成功した(図 6)。さらに Ash1 欠損細胞を用いて Suz12 または G9a をノックアウトし、Ash1 + Suz12 及び Ash1 + G9a の組み合わせでホモ複合欠損する細胞株を樹立した。

今後、これらの細胞株へ D4Z4-BAC クローンを導入し、D4Z4 の発現制御機構を解析するとともに、C2C12 細胞分化系におけるクロマチン制御因子の役割を明らかにする予定である。

【CRISPR/Cas9 システムによる ASH1 ノックアウトマウスの作成】

In vivo において ASH1 が D4Z4 の転写をどのように制御するか解析するために、CRISPR/Cas9 システムによる ASH1 ノックアウトマウスの作成と、C57BL/6 へのバッククロス交配を進めた。これまでに、ASH1 のエクソン 2 の 2 箇所(2 箇所)に於ける 4bp 欠損、13bp 欠損、1bp 挿入といういずれもフレームシフトを来すナンセンス変異体を樹立した(図 7)。

ASH1 ヘテロ欠損マウスの交配によって、生後 0 日まではメンデルの法則に従ってホモ欠損マウスが誕生し、マクロ形態学的には胎生期を通じて特に異常を認めないことが分かった(図 8)。また、ASH1 が Trithorax グループの一員であることから頸椎 C1-C2 のホモオティック変形が予想されたが、マイクロ CT 解析では異常所見は認めなかった(図 9)。一方、生後 1 日を経過すると ASH1 ホモ欠損マウスは 1 匹も観察されないことから、生後致死性を示すことが明らかになった(図 10)。現在、組織学的検索を行っている。

ASH1 の SET ドメインはヒストン H3 リジン 36 (H3K36) を特異的にメチル化する (Tanaka et al., 2007)。また、ASH1 をロックダウンすると D4Z4 領域の H3K36 メチル化が低下する (Cabianca et al., 2012)。しかし、H3K36 メチル化が D4Z4 の転写活性化に必要などうかは示されていない。そこで、メチル化活性を持たない ASH1 変異体を作るため、CRISPR/Cas9 システムによる新たなターゲティングを行った。当初、活性中心にあるヒスチジン残基を 1 アミノ酸変異を狙ったが、代わりに補酵素である S-adenosylmethionine (SAM) 結合ポケットを形成する Zn フィンガードメインのシステイン残基 Cys²²²⁰ を欠損する変異体が得られた (図 11-12)。

【D4Z4 トランスジェニックマウスの作成】

まず、D4Z4 配列(13 コピー)を含む BAC クローンが 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、C57BL/6 と交配して germline に入っていることを確認した (図 13)。

現在、ASH1 欠損マウスの一部と D4Z4 トランスジェニックマウスの交配を進めており、今後 D4Z4 転写活性化に ASH1 或いはそのヒストンメチル基転移活性が必須であるかどうかを検証する予定である。

【LNA gapmer の合成】

様々な人工核酸 (オリゴヌクレオチド) によるロックダウン技術の中で、架橋化核酸 (Bridged Nucleic Acid) または LNA (Locked Nucleic Acid) として知られる新しい人工核酸は、二重鎖核酸のリボース立体構造を固定化することにより、標的核酸に対する結合親和性、ヌクレアーゼ耐性、さらに細胞膜透過性を高めるといった特徴を有している。さらに、ロックダウンオリゴの構造を RNA-DNA-RNA というヘテロ核酸にすることにより、中央の DNA 部分が標的 RNA と結合して生じる DNA/RNA ヘテロ二重鎖を RNaseH が切断し、それによって標的 RNA を効率的に分解することが可能になる (図 14)。本研究では、ジーンデザイン社 (Exiqon 社) のデザインアルゴリズムにより、約 3.4Kb となる DBE-T に対して 20 種類の LNA 核酸を合成した。

【DBE-T 発現ベクター】

DBE-T は FSHD 患者細胞でのみ発現する。そこで、DBE-T のロックダウン効率をより簡便に定量するために、DBE-T を CMV プロモータ下にクローニングした発現ベクターを作成した (図 15)。テンプレートとして、PacBio 解析にも用いた BAC クローン PR11-242C3 を用い、シーケンシングによって配列を確認した。DBE-T の一部は GC 含有率が極めて高く、PrimerSTAR GXL DNA ポリメラーゼ (タカラバイオ) によって増幅することを見出すまで時間が掛かってしまった。CMV-DBE-T 発現ベクターを HEK293 細胞に一過性発現させ、RT-PCR によって DBE-T の発現を確認した。

【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。

【D4Z4 を含む BAC クローンのシーケンシングと de novo アセンブリ】

FSHD 疾患モデルマウスに用いた D4Z4 を含む BAC クローンを用いて、一分子 DNA シーケンサー PacBio RS によるシーケンシングを行った。DNA は D4Z4 領域の外側で切断する EcoRV 断片を用い、P4-C2 とそれより長いリードが得られる P5-C3 という二つの反応ケミストリを試みた。シーケンシングの結果、P4-C2 と P5-C3 ケミストリによって得られるリード数、マップされたサブリードの数や精度には大きな違いは無かったが(図 16) HBAP2/3 解析パイプラインでは P4-C2 ケミストリのデータのみ de novo アセンブリによって D4Z4 全体をカバーするコンティグが得られた(図 17)。そこで、P4-C2 と P5-C3 の間でより詳細なリードの比較を行った所、リードの長さの分布には違いが無かったが(図 18) P5-C3 ケミストリで得られた配列は特に In/Del エラーが多いことが分かった(図 19)。

【シーケンスデータを用いたシミュレーション実験】

de novo アセンブリに成功した P4-C3 のデータを用い、ランダムに選んだ 100~4 万リードを用いて de novo アセンブリを行った結果、最小で 1000 リードから 4000 リードあれば、D4Z4 領域のアセンブリが可能であることが分かった(図 20)。即ち、PacBio RS の 1 セル当たりのリード数約 15 万の 1/40~1/150 のデータでアセンブリが可能ということになる。さらに、このシミュレーションにおいてうまくアセンブリされたデータセットとアセンブリされなかったデータセットを比較検討したところ(図 21) 約 15Kb 以上の長さを持つ D4Z4 領域のリードが 1 つ以上含まれることが必須であることが明らかになった。

【D4Z4 ゲノム領域の精製技術開発】

FSHD の遺伝子診断に向けて、現在の放射性同位元素を用いる方法からより簡便で将来的には保険適用も可能な新たな遺伝子

診断法を確立するため、森岡との共同研究によって D4Z4 領域のシーケンシング技術を開発するとともに、患者ゲノムから D4Z4 だけを特異的に抽出する方法を検討した。これまで、PacBio シーケンシングにも使われている Phi29 DNA ポリメラーゼの誘導体を用いて D4Z4 領域の増幅を試みて来たが、本年度はさらに CRISPR/Cas9 システムを応用した新しい精製法を開発した。Cas9 は標的 DNA の PAM 配列(*S. pyogenes* 由来の Cas9 の場合 NGG)を認識し、ガイド RNA と相補的な標的配列を切断する。Cas9 のアミノ酸残基を 2 箇所置換しヌクレアーゼ活性を持たない Cas9 (dCas9)は、同様に PAM 配列を認識しガイド RNA と相補的な DNA と複合体を形成するが、DNA を切断しないため強固に結合する性質を持っている。そこで、FLAG タグの付いた dCas9 と、4 番染色体の D4Z4 配列或いは 10 番染色体の D4Z4 相同領域の配列に特異的なガイド RNA を合成し、それぞれ標的 DNA と選択的に結合するかどうかを検証した。

まず、FLAG-dCas9 (大阪大学藤井穂高氏より譲渡)を pET24a ベクターにサブクローニングし、BL21 ホスト細胞に導入して 30℃ で発現誘導させ、リコンビナント蛋白(1,403 アミノ酸)として精製した(図 22)。4 番と 10 番染色体に特異的なガイド RNA については、それぞれ 3 箇所及び 1 箇所の標的配列をデザインし(特許申請中) in vitro 転写反応によって RNA を合成した抗 FLAG 抗体によってマグネットビーズ(Dynabeads-Protein G)に固相化した FLAG-dCas9 とガイド RNA を反応させ、4 番染色体又は 10 番染色体の配列をサブクローニングした pBS ベクターと反応させた所(図 23) それぞれ予想された標的配列と結合することを確認した。

このようにして精製した D4Z4 断片の大きさを測定するには、PicoGreen 等で DNA を染色し蛍光顕微鏡下に DNA の長さを測定する(図 24)か、または DNA の 5' または 3' 断端の濃度と DNA 量の比を計算することによって DNA の平均長を概算する方法が考えられ、今後の検討課題である。

D. 考察

FSHD のエビジェネティック病態解明に

については、NDE 領域の DNA 断片を用いたプロモーター・ルシフェラーゼレポーターを構築するとともに、D4Z4 トランスジェニックマウスを作成した。クロマチン構造制御因子については、ASH1 とヘテロクロマチン制御因子 Suz12 (Polycomb グループ)、G9a (ユークロマチン抑制因子) をそれぞれ単独または ASH1+Suz12、ASH1+G9a の組み合わせでダブル欠損細胞株を樹立した。現在進めている SMCHD1 と ASH1 のダブルホモ変異体を含め、今後 NDE レポーターや D4Z4-BAC クローンを用いた D4Z4 転写制御機構解析のための重要なツールとなる。

同様に D4Z4 の発現制御機構を *in vivo* で解析するための ASH1 欠損マウスについても、エクソン 2 の二箇所におけるナンセンス変異を 3 種、SET ドメインのシステイン残基を 1 アミノ酸インフレーム欠失する変異体を 1 種、それぞれ確立し、C57BL/6 へのバッククロスを進めている。エクソン 2 の ASH1 ノックアウトマウスは、胎生期から生後 0 日まではメンデルの法則に従って正常に発生し、形態学的異常もホメオティック変異も観察されなかった。しかし、ASH1 ホモ欠損マウスは生後 1 日以降は例外なく観察されなかったことから、ASH1 欠失が生後致死性であることが明らかになった。この知見は、今後 ASH1 の機能を標的とする FSHD の治療薬を検証する際にはその副作用として慎重な検討が必要とされることを意味する。現在、ASH1 が高発現する中枢神経、特に ASH1 と関係の深い MLL の標的遺伝子である PITX2 が発現している視床下部を中心に組織学的検索を行っている。

FSHD の新しい診断法については、2 つの大きな進展があった。まず、PacBio RS によるシーケンシングについて、*de novo* アセンブリに成功したシーケンス情報を用いてシミュレーション実験を行い、PacBio RS の 1 セル当たりのアウトプットの数十分の 1 のデータ量でアセンブリが可能である (即ち遺伝子診断を大幅にコストダウン出来る) ことを示した。さらに、FLAG-dCas9 リコンビナント蛋白質と 4 番染色体または 10 番染色体に特異的なガイド RNA を用いて D4Z4 領域を高度に精製

することが原理的に可能であることを示した。よって、外来患者の末梢血から精製したゲノム DNA を制限酵素処理し、これをマグネットビーズに固相化した dCas9/sgRNA のカラムを通して D4Z4 領域のみ精製し、その DNA 断片の長さを直接測定するというワークフローが完成した。今後、本学の外来患者サンプルを用いた新規診断の検証、国立精神神経研究センターで遺伝子診断が確定している患者のサンプルを用いた信頼性の検証を進める予定である。

E. 結論

本研究は、病態解明、新規治療法の開発、新規診断法の開発という三つの柱を掲げて進めて来たが、その中、病態機構については遺伝子ノックアウト細胞や ASH1 ノックアウトマウス、D4Z4 トランスジェニックマウスといった研究材料の準備がほぼ完成し、これから実際の解析に移行する段階になっている。治療法についても、lncRNA に対する LNA gapmer の合成とアッセイ系 (DBE-T 発現ベクター、D4Z4 トランスジェニックマウス) の確立まで進めることが出来た。診断法については、D4Z4 領域のゲノム DNA 精製からシーケンシングまたは DNA 蛍光染色による長さの測定まで、基本的な条件をクリアすることが出来、三つの課題の中では最も進めることが出来た。今後早期の完成を目指して鋭意努力したい。

これまで、FSHD の診断には放射性同位元素を用いる方法しかなく、特に本邦では確定診断例が少なかった。海外では、これまで 10 万人に約 5 人とされていた FSHD 患者が 12 人という統計報告が昨年出ている。本研究を契機として日本筋ジストロフィー協会に設置された FSHD 分科会においても、臨床医から FSHD を疑われる症例は非常に多い印象があるとの発言もあり、今回作動原理を証明した新しい診断法について、保険適用を目指してさらに必要とされる検出感度と特異性の検証を進めて行きたい。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sequencing and *de novo* assembly of macrosatellite repeats of the FSHD locus. Morioka, MS, Tanaka, Y. (submitted)

De novo assembly of PacBio sequence data by homopolymer contraction method. Morioka, MS, Tanaka Y. (manuscript in preparation)

2. 学会発表

第 37 回日本分子生物学会年会・平成 26 年 12 月 (横浜)・PacBio RS による顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー遺伝子座のシーケンシング (田中裕二郎・森岡勝樹)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

・学内審査中 (FLAG- dCas9 と D4Z4 特異的ガイド RNA による FSHD 遺伝子座の単離法)

・学内審査中 (ホモポリマー縮合による *de novo* アセンブリの効率化)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし