

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	
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（Faciocapulothoracic 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 クローンをを用いて PacBio RS の改良されたプロトコルによって 30 Kb 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) が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

## 研究成果の刊行に関する一覧表

該当なし。