

平成 30 年 4 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19477

研究課題名(和文) 転写因子DUX4の異所性発現が発生に与える影響と筋ジストロフィー病態への関与

研究課題名(英文) Functional analysis of DUX4 and its effect on development.

研究代表者

三橋 弘明 (Mitsuhashi, Hiroaki)

東海大学・工学部・講師

研究者番号：20466220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)は最も患者数の多い遺伝性筋疾患の1つであるが、その分子病態は十分に理解されていない。近年、DUX4遺伝子が原因で発症すると考えられている。本研究では、DUX4遺伝子のcDNAを様々に改変し、DUX4の細胞毒性に必要なドメインを明らかにした。また、DUX4の細胞毒性が転写活性に依存することも明らかにし、競合阻害が有効であることを示した。さらに、DUX4遺伝子のDNA配列を解析する新たなシーケンズ技術の可能性も示した。

研究成果の概要(英文)：Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is one of the most common muscular dystrophies. However, its molecular pathology is not well understood. In recent years, it has been revealed that DUX4 is a causative gene of FSHD. In this study, we generated a series of DUX4 mutant cDNAs to reveal the functional domain necessary for the cytotoxicity of DUX4. We also revealed that the cytotoxicity of DUX4 depends on its transcriptional activity and showed that competitive inhibition is effective to alleviate the cytotoxicity. Furthermore, we also showed the possibility of a new sequencing technology to analyze DNA sequence of DUX4 gene within D4Z4 repeats.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋ジストロフィー FSHD DUX4

1. 研究開始当初の背景

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)は常染色体優性の遺伝形式をとる、最も患者数の多い筋ジストロフィーの1つであり、社会的にも重要な疾患である。患者では顔、肩、上腕の筋肉に顕著な筋力低下が見られるほか、網膜症や難聴も頻繁に合併し、重篤な症例では精神遅滞やてんかんの合併も見られる。FSHDの遺伝学的な原因は、第4番染色体に存在する遺伝子をコードしない反復配列D4Z4リピートの短縮にある。近年、D4Z4リピートが周囲の遺伝子発現を抑制するシスエレメントとして働くことがわかり、リピートの短縮によりFSHD患者では近傍の遺伝子DUX4が脱抑制され、骨格筋で異所性の発現が起きていることが明らかとなった。我々はDUX4 cDNAをクローニングし、ゼブラフィッシュ胚に発現させると筋障害を示すことを明らかにしていたが、DUX4が細胞毒性を生じるメカニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、DUX4が細胞毒性を生じるメカニズムを明らかにするため、DUX4のドメイン構造と毒性の関係を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

DUX4遺伝子からはDUX4-flとDUX4-sと呼ばれるスプライシングバリエーションが転写されるが、DUX4-flのみが細胞毒性を持つ。そこで、DUX4-flとDUX4-sのドメイン構造を比較し、DUX4-flに特有のC末端配列に着目して、分子生物学的手法によりDUX4変異体を17種類作製し、それぞれの細胞毒性と転写活性、細胞内タンパク質分解に与える影響を検討した。さらに、DUX4-flの細胞毒性を阻害する方法についても検討をおこなった。また、細胞毒性に重要なドメインのDNAシーケンスを解読するための新たなシーケンス技術の開発にも取り組んだ。

4. 研究成果

DUX4-flおよびDUX4-s cDNAをもとに、分子生物学的手法を用いて17種類の変異型DUX4発現コンストラクトを作製した。変異型DUX4は、2カ所あるDNA結合部位に変異を導入したものの、DUX4-flに特異的なC末端領域を様々に欠失させたもの、中央領域を欠失させたもの、DUX4-sにVP16転写活性ドメインを融合させたもの、DNA結合領域をPAX3やGAL4のDNA結合領域と交換したものである。これらをヒト由来の培養細胞であるHeLa細胞に発現させたところ、DUX4-flに特有のC末端側の配列が細胞毒性に重要であることが明らかとなった。DUX4のC末端欠失変異体をモデル動物であるゼブラフィッシュ胚に発現させたところ、ヒト培養細胞と同様の結果を得たことから、

DUX4による細胞毒性および毒性を発揮するメカニズムは種を越えて保存されている可能性が示唆された。また、DUX4変異体の転写活性をDUX4標的遺伝子の1つであるZSCAN4遺伝子の発現量をqPCRで測定することによって評価した。その結果、毒性のない変異体は転写活性も低いことが明らかとなった。したがって、DUX4-flは転写活性依存的に細胞毒性を発揮することが示唆された。さらに詳細にDUX4の一次配列と細胞毒性、転写活性の関係を調べたところ、C末端の約80アミノ酸残基と2つのDNA結合ドメインがあれば細胞毒性および転写活性には十分であることがわかった。反対にC末端領域の20アミノ酸残基が欠失するだけで毒性および転写活性が大幅に減弱すること、2つのDNA結合部位のうち1つでも変異が生じると毒性および転写活性がほぼなくなること明らかとなった。DUX4変異体による転写活性についてさらに一般性を確認するため、ボストン大学と共同研究をおこないDUX4結合配列を用いたluciferase assayで検討した。その結果、ZSCAN4のqPCR解析と非常によく相関した結果を得た。また、細胞毒性の分子経路としてカスパーゼの活性化をとともうアポトーシスを考え、カスパーゼ3/7の活性測定をおこなった。その結果、先の細胞死の測定とカスパーゼの活性化も非常によく相関した。よってDUX4依存的な細胞死にはカスパーゼの経路が関与していることが示唆された。さらに、DUX4変異体の転写活性、細胞毒性と相関して、細胞内のユビキチン化タンパク質量が増加することも明らかとなり、DUX4の毒性とタンパク質分解系との関連も示唆された。

これらの研究からDUX4の細胞毒性と転写活性の間に非常に強い相関があることが明らかとなった。したがって、DUX4の転写活性の抑制が将来の治療法開発研究の標的となる可能性が示唆された。また、DUX4の毒性と転写活性を担う約20アミノ酸残基の領域を特定したことから、この領域を阻害することでDUX4による毒性を抑制できる可能性があると考えられる。

次に、DUX4の毒性を阻害する方法についての検討をおこなった。DUX4は核に局在するが、DUX4変異体の免疫染色より、その局在はN末端側ドメインに依存していることが示唆された。そこで、DUX4 cDNAに核外移行シグナルを融合し、DUX4の核内移行を抑制して細胞毒性の軽減を検討したが、この方法ではほとんど細胞毒性を抑えることはできなかった。したがって、DUX4の局在変化による治療法を目指す場合は、完全なDUX4の核内移行阻害が必要であると考えられた。異なるDUX4-fl阻害の手法として、競合阻害実験をおこなった。先の実験より、DUX4-flはDNAに結合してはじめて細胞毒性を発揮することがわかっている。そこで、作製した種々のDUX4変異体をDUX4-flと

HeLa 細胞に共発現し、DUX4 変異体による競合阻害が起きるかを検討した。その結果、DUX4 変異体のうち、DNA 結合能力を持つが、転写活性を失っているものについては、共発現により DUX4-fl の毒性を軽減することがわかった。したがって DUX4-fl の DNA 結合を妨げる競合阻害剤を開発することができれば、FSHD の治療法になる可能性があると考えられた。

ここまでの研究結果から、DUX4-fl に特異的な C 末端領域が細胞毒性に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、その領域に欠失が生じると DUX4-fl の毒性が軽減することがわかった。このことは、ヒトゲノム DNA 上で、DUX4-fl 特異的な C 末端領域に多型や変異が存在した場合、DUX4-fl の毒性に個人差が生まれる可能性を示唆している。実際、FSHD では病気の重症度に個人差が大きいことが知られているが、その理由はわかっていない。我々はこの謎を解くためにはヒトゲノム上の DUX4 遺伝子の配列を多数解読し、遺伝学的なアプローチをおこなう必要があると考えた。しかし、現在、DUX4 遺伝子の配列をシーケンス解析することは容易ではない。その理由は DUX4 遺伝子と同じ配列が 4 番染色体に 1~100 回繰り返し存在する D4Z4 リピート内に存在するためである。この問題を解決するため、我々は近年開発されたロングリードシーケンサーであるナノポアシーケンサーを用いたシーケンスを試みた。ナノポアシーケンサーでは 1 リード数十 kbp という非常に長い DNA 断片をシーケンスすることが可能である。我々は D4Z4 が 13 個含まれた BAC クローンを解析し、99.8% という高い精度で配列を解読することに成功した。したがって、ナノポアシーケンサーを応用をさらに研究することにより、今後、FSHD 家系の D4Z4 配列を比較解析することが可能になるのではないかと考えられた。

DUX4-fl は DNA に結合して標的遺伝子の発現を活性化することにより細胞死が導かれるが、DUX4-fl の DNA 結合ドメインと相同性の高い転写因子として PAX3 が知られている。PAX3 は骨格筋や神経系の発生に重要な遺伝子であるため、DUX4-fl の発現が発生時期に PAX3 標的遺伝子群の発現を攪乱しているのではないかと考えた。そこで、PAX3 と DUX4 のキメラ遺伝子を作製し、ゼブラフィッシュ胚に発現させることで、胚発生への影響を検討した。その結果、DUX4-fl を発現させた場合は骨格筋に主な障害が見られたが、PAX3-DUX4 キメラの発現では目の発生に主な障害が見られた。このことから、DUX4-fl は PAX3 とは異なる独自の遺伝子経路の活性化により筋障害を引き起こしている可能性が示唆された。どのような遺伝子経路が活性化しているかについては今後、詳細に調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. **Mitsuhashi H***, Ishimaru S, Homma S, Yu B, Honma Y, Beermann ML, Miller JB. Functional domains of the FSHD-associated DUX4 protein. *Biol Open*. 2018 Apr 26;7(4) bio033977. doi:10.1242/bio.033977.

***Corresponding author**

2. Mitsuhashi S, Nakagawa S, Takahashi-Ueda M, Imanishi T, Frith MC, **Mitsuhashi H**. Nanopore-based single molecule sequencing of the D4Z4 array responsible for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Sci. Rep.* 2017 7: 14789. doi:10.1038/s41598-017-13712-6

[学会発表](計 9 件)

1. Satomi Mitsuhashi, **Hiroaki Mitsuhashi**, Mahoko Ueda, So Nakagawa, Tadashi Imanishi, and Martin C. Frith. Nanopore-based single molecule sequencing of the D4Z4 array responsible for facioscapulohumeral muscular dystrophy. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, 18 Sep 2017, Poster presentation
2. 石丸 悟史、本間 優希、**三橋 弘明**. DUX4 遺伝子の毒性に必要な領域の特定. 第 40 回日本分子生物学会年会、兵庫県神戸市、2017 年 12 月 6 日 ポスター発表
3. 上田 真保子、三橋 里美、**三橋 弘明**、今西 規、中川 草. 細胞融合にかかわる内在性レトロウイルス由来遺伝子の同定. 第 40 回日本分子生物学会年会、兵庫県神戸市、2017 年 12 月 8 日 ポスター発表
4. 三橋里美、中川草、上田真保子、今西規、**三橋弘明**、Martin C. Frith. ナノポアシーケンサーを用いた D4Z4 リピート配列の解析 第 62 回日本人類遺伝学会、兵庫県神戸市、2017 年 11 月 16 日 ポスター発表
5. **三橋弘明**、石丸悟史、本間優希. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー原因遺伝子 DUX4 の毒性に必要な領域の特定 第 3 回日本筋学会学術集会、東京都小平市、2017 年 8 月 4 日 ポスター発表
6. **三橋弘明**. 病気のメカニズム 筋ジストロフィーの標準的医療普及のための調査研究班 市民公開講座「知っておきたい顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー」大阪府大阪市 2017 年 6 月 18 日 口頭発表
7. **三橋弘明**. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー原因遺伝子 DUX4 の機能解析. 第 4 回骨格筋生物学研究会、長野県松本市、

2016年3月6日 口頭発表

8. **Mitsuhashi H**, Louis M. Kunkel. Zebrafish model of human muscular dystrophy. 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会 ワークショップ 2W9-5「小型魚類解体新書」, 兵庫県神戸市, 2015年12月2日 招待講演
9. 米沢凌、**三橋弘明**、石浦章一. FSHD 原因遺伝子であるDUX4のC末ドメインによる細胞毒性の解析. 第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会 兵庫県神戸市, 2015年12月2日、ポスター発表

〔図書〕(計 2件)

1. **三橋弘明**. 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの治療法開発の現状. **月刊 難病と在宅ケア** 2018年3月号 Vol.23 No.12, 23-27
2. 三橋里美、中川草、上田真保子、今西規、Martin C Frith、**三橋弘明**. リピート数が関与する疾患の診断に向けて. **実験医学** 2018年1月号 Vol.36 No.1, 44-48

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三橋 弘明 (Mitsuhashi, Hiroaki)
東海大学・工学部生命化学科・講師
研究者番号：20466220