

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07511

研究課題名(和文) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー病態に關与する内在性レトロウイルスの探索

研究課題名(英文) Search for endogenous retroviruses involved in FSHD

研究代表者

三橋 弘明(Mitsubishi, Hiroaki)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号：20466220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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)は患者数が最も多い型の筋ジストロフィーの1つである。FSHDの原因遺伝子DUX4-f1は転写因子として働き、初期胚特異的な遺伝子を活性化することに加え、ERV、MaLRなどの内在性ウイルス様配列からの転写も誘導するが、その全容は明らかになっていなかった。我々はロングリードシーケンサーを用いたDUX4-f1のトランスクリプトーム解析を行い、DUX4-f1によって発現が活性化する転写産物を明らかにした。ERV、MaLRに加え、LINEやAluなどの反復配列や、遺伝子と反復配列の融合転写産物も多数、同定した。本研究の成果は英国科学誌に論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、DUX4-f1によって活性化される内在性ウイルス様配列の多くが明らかとなった。それに加え、LINEやAlu、HSATIIや単純反復配列など、ゲノム上の様々な非コード領域からの転写も誘導されていることが明らかとなった。FSHDの病態機序はまだ不明であり、本研究で同定された転写産物の機能を調べることでFSHD病態の理解がさらに深まるものと期待される。また、近年、DUX4-f1はがんや免疫、ヒトの初期発生においても重要な役割を担っていることが示唆されているため、本研究で明らかにした転写産物の一覧は、がんなどの分野に対しても有用な情報を与えるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is one of the most common types of muscular dystrophy. The causative gene, DUX4-f1, acts as a transcription factor, activating transcription of early embryo-specific genes and endogenous viral elements (EVEs) such as ERVs and MaLRs. However, the full extent of EVEs activated by DUX4-f1 remained unclear. In this study, we performed transcriptome analysis of DUX4-f1 using a long-read sequencer and identified DUX4-f1 induces the expression of repetitive elements such as LINE and Alu as well as ERVs and MaLRs. In addition, we identified many fusion transcripts of genes with repetitive elements. The result of this study was published in a British scientific journal.

研究分野：神経内科学

キーワード：DUX4 FSHD 筋ジストロフィー ロングリードシーケンサー ERV 内在性レトロウイルス

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) は顔、肩、上腕の筋肉が萎縮し、筋力低下を来す指定難病である。患者では4番染色体4q35領域にあるD4Z4リピートの短縮および低メチル化が生じており、筋細胞でD4Z4リピートの末端に存在するDUX4遺伝子の発現が起こる。DUX4遺伝子は本来、骨格筋では発現が抑制されているが、FSHD患者の筋細胞ではDUX4遺伝子の脱抑制が起こり、DUX4-fl タンパク質が産生される(Greco et al., 2020)。DUX4-fl タンパク質は本来、初期胚の4細胞期特異的に発現する転写因子で、ZSCAN4 などヒトの初期発生に重要な遺伝子の発現を活性化する(Hendrickson et al., 2017)。そのため、FSHD患者の筋細胞では、本来、筋細胞では発現しない初期胚特異的遺伝子の発現が起きているが、なぜ筋細胞死や筋萎縮を引き起こすのかは解明されていない(Geng et al. 2012)。近年、DUX4-fl がヒトゲノムの遺伝子領域だけではなく、非遺伝子領域からも転写を促進することが報告された(Young et al., 2013)。ヒトゲノムのうち、遺伝子としてタンパク質を産生する領域は約2%にすぎず、およそ50%は反復配列によって占められている。反復配列は人間の祖先に感染したレトロウイルスなどに由来しており、その配列の特徴から内在性レトロウイルス(ERV)、長鎖散在反復配列(LINE)、短鎖散在反復配列(SINE)などに分類される。これまでにDUX4-fl がERVやサテライトDNAからの発現を活性化することが報告されていた。この知見は、ショートリード次世代シーケンサーによるデータに基づいているが、反復配列はヒトゲノム中に多数存在するため、ショートリード次世代シーケンサーによる解析では、その全容は明らかにできていない可能性が残っていた。

2. 研究の目的

本研究では、転写因子DUX4-fl が骨格筋細胞で発現を誘導する転写産物を明らかにすること、特に遺伝子としてアノテーションされていない反復配列からの転写産物を明らかにし、FSHDの発症メカニズムに迫ることを目的とした。ゲノムに多数存在する反復配列を区別して検出するため、長鎖の塩基配列解析をおこなうことができる、ロングリード次世代シーケンサーを用いて解析をおこなうこととした。

3. 研究の方法

DUX4-fl の発現コンストラクトをヒト筋由来細胞株RD細胞にトランスフェクションし、24時間後にRNAを抽出した。PolyAを含むRNAを精製し、ロングリード次世代シーケンサーPromethION(Oxford Nanopore Technologies社)でRNAの塩基配列を解読した。対照実験として活性を持たないDUX4-sを用いた。得られたデータはヒトゲノムリファレンス配列(GRCh38)にLAST(<https://gitlab.com/mcfrith/last-rna>)を用いてマッピングし、DESeq2を用いて発現変動遺伝子解析を行った。また、dfam及びRepeatMasker、gEVEなどの反復配列のデータベースにアノテーションされている領域からの転写産物のリードカウントを行い、DESeq2によって発現変動のある反復配列由来転写産物を同定した。

4. 研究成果

3回のbiological replicateを行い、6サンプルで平均5.9百万リード(平均長824塩基)を得ることができた。LASTを用いたマッピングでは、平均75%のリードをマッピングすることができた。DESeq2による解析により、DUX4-flを発現する筋細胞において発現が有意に増加する遺伝子群を同定した。そのほとんどは、過去にショートリードシーケンシングによって報告されている初期胚特異的遺伝子であったことから、我々の手法が正しく転写産物を検出できていることが確認された。また、新規な発見として、TAF11L遺伝子群がDUX4-flによって活性化されることが明らかとなった。これはTAF11L遺伝子がゲノム中に複数コピー存在するため、従来のショートリードシーケンシングでは検出されなかったものと推測された。この例から、予想通りロングリードシーケンサーが反復配列の解読に有利であることが示された。また、選択的スプライシングにより複数のアイソフォームを産生する遺伝子については、ロングリード解析により、どのアイソフォームが発現しているかを明確に検出することができた。例としてLEUTX遺伝子にはLEUTX.RとLEUTX.nの2つのアイソフォームが

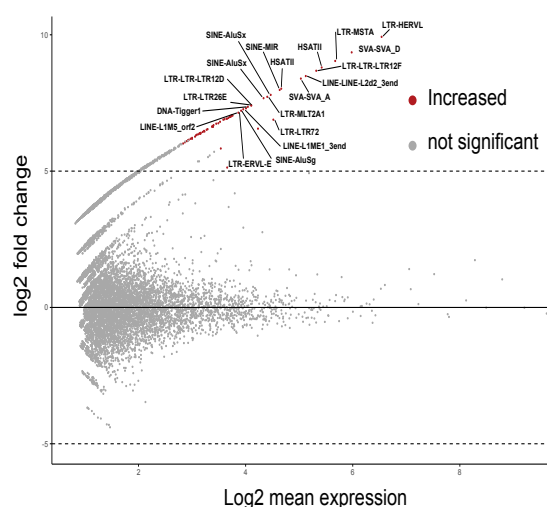


図1. 発現量が変化した反復配列

例としてLEUTX遺伝子にはLEUTX.RとLEUTX.nの2つのアイソフォームが

あるが、DUX4-f1 が活性化するのは LEUTX.n であることが明らかとなった。さらに、dfam、RepeatMasker にアノテーションされている反復配列の有意な発現上昇を同定することができた (図 1)。反復配列には ERV の他に LINE、SINE (Alu 要素)、SVA 因子も含まれており、複数のサテライト DNA からの発現も検出された。サテライト DNA からの転写は量比に偏りはあるが、+鎖と-鎖の両方向からの転写が起きていた。興味深いことに、サテライト DNA や Alu 要素からの転写産物にも polyA tail が含まれていた。この polyA 付加の生物学的な意味については、今後さらなる研究が必要と考えられた。ロングリードシーケンスでは、反復配列由来の転写産物が RNA スプライシングを受けていることも明らかになった。スプライシングは主に、古典的な AG/GT のスプライスドナー/アクセプターが使われていた。また、反復配列と遺伝子がスプライシングによってつながった「融合転写産物」を 245 個検出し、うち 216 個はショートリードシーケンサーでは同定されていないものであった。融合転写産物の中には、UTR のみが変わるものもあったが、開始コドンを含むエクソンがスプライシングで除かれるものもあり、タンパク質レベルでの変化が示唆された。DUX4-f1 を導入した RD 細胞で見られた反復配列の発現が FSHD 患者の細胞でも起きているかを調べるため、FSHD 患者から作製した iPS 細胞を筋細胞に分化させ、qPCR 法で発現を調べた。その結果、少なくとも 2 種類の反復配列が FSHD 患者由来の細胞で発現増加していることが確認された。総合すると、本研究により DUX4-f1 によって活性化される反復配列が過去の報告よりも複雑であることが明らかとなり、それら反復配列の染色体上の座位を特定することができた。DUX4-f1 によって活性化するサテライト DNA からの転写が細胞毒性に関与するという報告もあることから (Shadle et al., 2019)、今回、我々が明らかにした反復配列のリストは FSHD の病態解明に有用な知見になると考えられる。また、DUX4 は初期胚や ES 細胞、ある種のがん細胞にも発現することが報告されているため (Chew et al., 2019)、本研究の結果は再生医療やがん治療にも寄与する可能性も秘めていると考えられる。さらに、世界に先駆けて RNA ロングリードシーケンシングを行うことにより、ロングリード発現解析が従来のショートリードシーケンシングを補う利点を持つことを示すことができた。

<引用文献>

- Greco A, Goossens R, van Engelen B, van der Maarel SM. Consequences of epigenetic derepression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Clin Genet.* 2020;97(6):799-814.
- Hendrickson PG, Dorais JA, Grow EJ, Whiddon JL, Lim JW, Wike CL, Weaver BD, Pflueger C, Emery BR, Wilcox AL, Nix DA, Peterson CM, Tapscott SJ, Carrell DT, Cairns BR. Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons. *Nat Genet.* 2017;49(6):925-934.
- Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell.* 2012;22(1):38-51.
- Young JM, Whiddon JL, Yao Z, Kasinathan B, Snider L, Geng LN, Balog J, Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ. DUX4 binding to retroelements creates promoters that are active in FSHD muscle and testis. *PLoS Genet.* 2013;9(11):e1003947.
- Shadle SC, Bennett SR, Wong CJ, Karreman NA, Campbell AE, van der Maarel SM, Bass BL, Tapscott SJ. DUX4-induced bidirectional HSATII satellite repeat transcripts form intranuclear double-stranded RNA foci in human cell models of FSHD. *Hum Mol Genet.* 2019;28(23):3997-4011.
- Chew GL, Campbell AE, De Neef E, Sutliff NA, Shadle SC, Tapscott SJ, Bradley RK. DUX4 Suppresses MHC Class I to Promote Cancer Immune Evasion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Dev Cell.* 2019;50(5):658-671. e7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mitsuhashi Satomi, Nakagawa So, Sasaki-Honda Mitsuru, Sakurai Hidetoshi, Frith Martin C, Mitsuhashi Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Nanopore direct RNA sequencing detects DUX4-activated repeats and isoforms in human muscle cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三橋里美、中川草、Martin C. Frith、三橋弘明
2. 発表標題 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー病態に關与する内在性レトロウイルスの探索
3. 学会等名 2018年度「先進ゲノム支援」拡大班会議
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三橋 里美 (Mitsuhashi Satomi) (40466222)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授 (12602)	
研究分担者	中川 草 (Nakagawa So) (70510014)	東海大学・医学部・講師 (32644)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	マーティン フリス (Martin Frith) (40462832)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・上級主任研究員 (82626)	
研究協力者	佐々木ー本田 充 (Sasaki-Honda Mitsuru) (60836865)	京都大学・iPS細胞研究所・特別研究員(PD) (14301)	
研究協力者	櫻井 英俊 (Sakurai Hidetoshi) (80528745)	京都大学・iPS細胞研究所・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関