

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659437

研究課題名(和文) エピゲノム変化による筋ジストロフィーの発症機構の解明

研究課題名(英文) Epigenomics and muscular dystrophy

研究代表者

林 由起子 (Hayashi, Yukiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：50238135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノム変化が病態と関わっていることが示唆されている顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーについて、網羅的にDNAのメチル化変化を解析した。その結果、筋症状関連遺伝子群には明らかなメチル化の変化は見いだされなかった。そこで疾患関連ゲノム領域であるD4Z4領域のDNAメチル化の程度をバイサルファイトシーケンス法で直接評価した。その結果、D4Z4領域のDNAメチル化と臨床症状の間には負の相関がみられることを見いだした。本研究は疾患に關与するゲノム領域特異的なDNAメチル化の変化を検討しうる方法を確立したものであり、今後、病態解析を行う上で極めて有用な成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is caused by truncation of 3.3-kb D4Z4 repeats on the chromosome 4q35, which is thought to have close association with epigenomic changes. In this study, we performed genome-wide methylation study by using high dense methylation array, but no specific changes were found between the patients and their healthy parents. Next, we performed specific methylation study of the disease associated genomic region of FSHD. We found negative correlation between clinical severity and DNA methylation. This affected chromosome-specific analysis is useful to elucidate pathogenesis of FSHD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：遺伝学 エピゲノム 細胞・組織 メチル化 筋疾患

## 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、常染色体優性遺伝形式をとる最も頻度の高い遺伝性筋疾患の1つである。単一遺伝子病と異なり、原因遺伝子座が同定されて20年以上経過するも、その具体的な病因が明らかになっていない。FSHDは顔面、肩甲・上肢帯中心の筋障害の他、難聴や網膜異常、知能障害、痙攣などを合併することもある。発症年齢、臨床症状、筋病理所見は同一家系内であっても極めて多彩である。FSHDは第4染色体長腕テロメア(Ch.4q35-ter)に存在する3.3kbのリピート配列(D4Z4)の数が10個以下に減少することが原因となるが、D4Z4の減少がFSHDの発症にどのように関与しているのかは明らかでない。本疾患の発症の一因として、クロマチンの構造変化によりD4Z4内に存在するDUX4遺伝子の発現上昇が生じ、このことが筋障害に関与している可能性が報告された(Science, 2010)。

## 2. 研究の目的

染色体4q35-qterに存在するリピート配列の減少(テロメアの短縮)によって生じるゲノム配列の修飾(エピゲノム)変化の有無をゲノムワイドに解析し、疾患との関連を探索する。同時に遺伝子多型とエピゲノム動向の関連、その変化による遺伝子ならびにタンパク質発現変化と臨床病理学的変化との関連について検討を行うことにより、FSHDの発症機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) これまでに国立精神・神経医療研究センターで遺伝子診断の終了しているFSHD家系について、臨床遺伝情報を再検討し、同一家系内で臨床重症度が異なる例、同一個体で複数の組織が入手可能例などで、D4Z4リピート数の最も少ない家系を抽出した。

(2) ゲノムDNAを調整し、超高密度ゲノムマイクロアレイを用いて、ゲノムワイドなメチル化の変化の解析を行った。

(3) サブテロメアにあるD4Z4リピート近傍のDNAメチル化をバイサルファイトシーケンス法によって直接評価した。

(4) D4Z4リピート数が正常のFSHD(FSHD2)患者について国際共同研究として新規原因遺伝子の探索を行った。

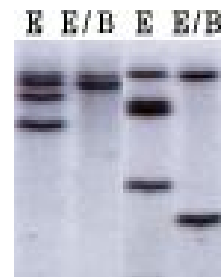
## 4. 研究成果

(1) ゲノムワイドなメチル化解析では、同一個体であっても血液と骨格筋では著しくメ

チル化の部位・程度が異なることが明らかになった。

(2) D4Z4リピート数が同じで臨床重症度に明らかな差のある親子間を選択し、血液から抽出したゲノムDNAを用いてゲノムワイドなメチル化解析を行った結果、筋症状への関与が示唆される遺伝子群にはメチル化に明らかな差は見いだされなかった。

(3) D4Z4リピート近傍の塩基配列は他の複数の染色体上に非常に相同性の高い領域が存在する上、極めてGC含量が高い。そこで疾患責任領域と考えられる4番染色体上のD4Z4リピート領域が、他の染色体上類似配列と比べてきわめて短いことを利用した。まずゲノムDNAを制限酵素処理した後電気泳動し、予測されるサイズの領域を切り出し、直接シーケンス法を用いて4番染色体由来であることを確認した後、バイサルファイトシーケンスを行った。その結果、D4Z4領域のDNAメチル化と臨床症状の間には負の相関がみられ、臨床的に重症の患者はDNAのメチル化が低下していることを見いだした。一方、臨床的に軽度から中程度の患者ではDNAメチル化の程度は多様であった。



切り出し後  
メチル化解析

(4) FSHD2の候補遺伝子について解析を行い、新たな候補遺伝子を見いだした。現在論文投稿中である。

本研究では、同じD4Z4リピート数を有する同一個体、ならびに同一家系であってもゲノムワイドなメチル化修飾は極めて多様であることが明らかとなった。一方、FSHD責任染色体領域に特異的なDNAメチル化の変化を検討しうる方法を確立しえたことは、今後、病態解析を行う上で極めて有用な成果であると考えられる。

## 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14件)

林由起子.筋ジストロフィー.検査と技術.査読なし、41巻、2013、448-453

<https://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=35321>

Sugie K, Hayashi YK, Goto K, Nishino I, Ueno S: Teaching Neuroimages: Unilateral arm and contralateral leg amyotrophy in FSHD: Unusual presentation. *Neurology*. 査読有り、79巻、2012、e46.

DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182617125

Komagamine T, Kawai M, Kokubun N, Miyatake S, Ogata K, Hayashi YK, Nishino I, Hirata K: Selective muscle involvement in a family affected by a second LIM domain mutation of fhl1: An imaging study using computed tomography. *J Neurol Sci*. 318巻、2012、163-167

DOI: 10.1016/j.jns.2012.04.007

林 由起子, 後藤加奈子, 西野一三, 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの最近の進歩. *臨床神経学*, 査読なし、52巻、2012、1154-1157

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/clinicalneuro/52/11/52\\_1154/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/clinicalneuro/52/11/52_1154/_article/-char/ja/)

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. *Clin Epigenetics* 4:e1, 2012.

DOI; 10.1186/1868-7083-4-1

〔学会発表〕(計 8 件)

Hayashi YK, et al: FHL1 Myopathies in Japan. 199th ENMC International Workshop, Naarden, The Netherlands (NH Naarden Hotel), 2013年6月7-9日. オランダ

Sugie K, Hayashi YK et al: A neuroimaging study of asymmetric skeletal muscle involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy. The 11th Annual Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center. 2012年6月6-8日. 京都

林由起子, 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー, 第53回日本神経学会学術大会 2012年5月22-25日. 東京

林由起子, 筋ジストロフィー研究の進歩, 東京医科大学総合研究所主催シンポジウム (第12回医学総合研究所セミナー) 2012年6月26日 東京

林由起子. Translational research of muscular dystrophy in Japan, 釜山大学病院-釜山大学校医学専門大学院 統合学術大會 2012年11月, Korea

〔図書〕(計 4 件)

林 由起子. 筋ジストロフィー. 図説 分子病態学 改訂5版 2014, pp.262-266. 中外医学社

Kubota T, et al. Section 4: Chromatin and Epigenetic Influences on DNA Replication, Chapter: Current Understanding of Epigenomics and Epigenetics in Neurodevelopmental Disorders. In "Epigenomics and Epigenetics". Intech (Open Access Publisher), 2014, ISBN 978-953-51-1363-8

Kubota T, et al. Chapter: Epigenetic Modulation of Human Neurobiological Disorders. In "Epigenetics in human disease". Elsevier, 2012, pp 193-203.

Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Section 4: Chromatin and Epigenetic Influences on DNA Replication, Chapter 13: The Mechanism of Epigenetic Modifications during DNA Replication. In "The Mechanisms of DNA Replication". Intech (Open Access Publisher), 2012 (ISBN 978-953-51-0991-4), pp 333-350.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 由起子 (HAYASHI Yukiko)  
東京医科大学・医学部・医学科・教授  
研究者番号: 50238135

(2) 研究分担者

久保田 健夫 (KUBOTA takeo)  
山梨大学・医学工学総合研究部・教授  
研究者番号: 70293511

(3) 連携研究者

野口 悟 (NOGUCHI, Satoru)  
国立精神・神経医療研究センター神経研

研究所疾病研究第一部 室長  
研究者番号：00370982

西野 一三 (NISHINO, Ichizo)  
国立精神・神経医療研究センター神経研  
究所疾病研究第一部 部長  
研究者番号：00332388

(4)研究協力者

佐藤 秀則 (SATO, Hidenori)  
山形大学第3内科 准教授

佐藤 孝俊 (SATO, Takatoshi)  
東京女子医科大学小児科 医員

石山 昭彦 (ISHIYAMA, Teruhiko)  
国立精神・神経医療研究センター病院  
医長

濱中 公平 (AMANAKA, Kohei)  
国立精神・神経医療研究センター神経研  
究所疾病研究第一部 研究生

後藤加奈子 (GOTO, Kanako)  
国立精神・神経医療研究センター神経研  
究所疾病研究第一部 研究員