

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430053

研究課題名(和文)筋強直性ジストロフィーにおけるCTGリピート不安定性の病態研究

研究課題名(英文) Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability

研究代表者

櫻井 英俊 (SAKURAI, Hidetoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：80528745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋強直性ジストロフィー1型(DM1)患者由来iPS細胞を用いて、原因となるDMPK遺伝子のCTGリピート伸長の解析を行った。成果としてDM1-iPS細胞におけるリピート伸長は未分化細胞維持培養時に顕著にみられ、分化誘導時にはあまり認められないことが分かった。またDM1-iPS細胞から分化させた神経、心筋、骨格筋細胞において、患者で認められるのと同様のスプライシング異常が起きること、そしてDMPK遺伝子近傍にエピジェネティックな異常が存在することが明らかとなり、DM1患者由来iPS細胞が疾患モデルに有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is caused by expanded CTG repeats in DMPK gene. The expanded CTG repeats are unstable and can increase the length of the gene with age, which worsens the symptoms. In order to investigate the repeat instability, DM1 patient-derived iPSCs were generated and differentiated into cardiomyocytes, neurons and myocytes, and we precisely analyzed the CTG repeat lengths of the cells. Our DM1-iPSCs showed a gradual lengthening of CTG repeats in all cell lines depending on the passage numbers of undifferentiated cells. However, the average CTG repeat length did not change significantly after differentiation into different somatic cell types. We also evaluated the chromatin accessibility in DM1-iPSCs using ATAC-seq. The chromatin status in DM1 cardiomyocytes was closed at the DMPK locus as well as at SIX5 and its promoter region, whereas it was open in control. These findings may help clarify the role of repeat instability in the CTG repeat expansion in DM1.

研究分野：筋疾患学

キーワード：病態再現 患者由来iPS細胞 筋強直性ジストロフィー CTGリピート伸長

## 1. 研究開始当初の背景

筋強直性ジストロフィー1型(Myotonic dystrophy type 1, DM1)は、常染色体優性遺伝形式をとる疾患で、ミオトニーを主として筋萎縮、不整脈、糖尿病、神経障害、白内障などを合併する全身疾患である。原因遺伝子として DMPK 遺伝子の 3'UTR に存在する CTG リピートが、正常では 35 回程度までであるのに対し、100 回以上に異常伸長しているために発症することが分かっている。

CTG リピート数と重症度は相関することが知られており、~200 リピートでは軽症、1000 リピート前後では成人発症の中等症、1500 リピート以上では先天性の重症になるとされている。世代間で変異アレルが受け継がれる際、あるいは同一患者であっても組織・臓器により、リピート数が増加することが知られている。症状の強い心筋や骨格筋ではリピート数が多く、小脳や血液では少ないという報告がなされている(Castel et al. Hum. Mol. Genet. 2011)が、CTG リピートが特定の組織で伸長するメカニズムは分かっていない。

申請者はこれまでに、テトラサイクリン応答性に骨格筋分化制御因子である MyoD を強制発現させることによって、ヒト iPS 細胞から効率よく再現性高く骨格筋へと分化誘導する方法を開発した。この方法は患者由来の iPS 細胞にも応用可能であり、三好型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞から分化させた骨格筋細胞を用いて、筋細胞膜の修復遅延という三好型筋ジストロフィーの病態再現にも成功した(Tanaka et al. PLOS ONE, 2013)。この成果は患者由来 iPS 細胞からでは世界で初めて筋疾患の病態再現に成功した報告となった。

未だ有効な治療法が無く基礎検討が必要な他の遺伝性筋疾患に対して、我々の研究成果を応用して治療法開発に結び付けたいと考え、優性遺伝疾患で比較的患者の多い DM1 へのアプローチを着想した。DM1 の病態解析は、我々の開発した骨格筋細胞を用いる意義が十分にあり、しかも全身疾患であるため骨格筋細胞だけでなく神経細胞や心筋細胞などの解析も同時に必要であるため、多分化能を持つ iPS 細胞を起点に研究する意義が十分にある。

## 2. 研究の目的

(1)未分化 iPS 細胞から特定組織への分化時に CTG リピートの不安定性が変化するか？

DM1 患者成体内において、心筋や骨格筋といった症状の強い組織においては CTG リピート数が増大しているが、同一の iPS 細胞から同時に分化誘導を行った時、分化組織特異的にリピート数が変化するかどうかを明らかにする。少なくとも骨格筋・心筋・神

経の 3 つの系統への分化誘導を行い、3 つの組織での差異を解析する。

(2)老化(継代の進行)による分化時の変化はあるのか？

DM1 では増大した CTG リピートから mRNA が転写され、その巨大 mRNA がスプライシングに関わる因子の制御機構を乱すために、多くのタンパクで異常スプライシングが起きて発症する。しかし発成人例の発症年齢は 30 歳前後であり、老化の与える影響も報告されている。老化を完全に模倣しているわけではないが、継代つまり細胞分裂を多く繰り返した iPS 細胞においての CTG リピート数の不安定性を解析する。2013 年、DM1 患者由来 iPS 細胞を継代すると CTG リピート数が増加するという報告がなされたが(Du et al. Hum. Mol. Genet. 2013)、解析に通常の PCR 法を用いており、検出しやすい短いレポートのみを増幅している可能性が高く、やや信頼性に欠けるデータであるため、我々は精度の高い Sp-PCR 法で解析を行う。また継代の進んだ iPS 細胞から各組織への分化誘導を行った場合に、特定組織における不安定性が増大するのかも解析し、老化による影響が分化時にもあるのかどうかを明らかにする。

(3)そのメカニズムはどうなっているのか？

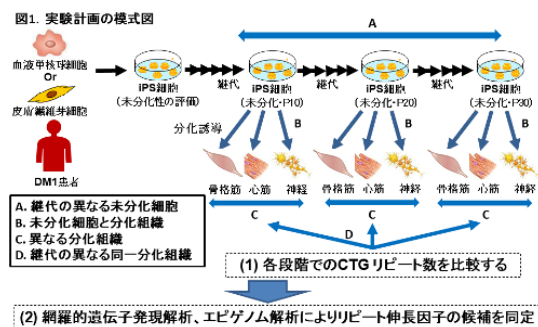
特定組織への分化時におけるリピートの不安定性が検出できれば、そのメカニズムに迫る研究を進める。既報では諸説が乱立している状態であるが、この研究課題では RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析と、DMPK 遺伝子周辺のエピジェネティックな修飾解析を行い、リピートの不安定性を引き起こす因子の候補を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 各段階での CTG リピート数評価

ゲノムの CTG リピート数を評価するにあたり、細胞間でのリピート数の揺らぎが問題となり、通常のゲノム DNA でのサザンブロッティングではスメア状にしか解析できないため定量性が乏しくなる。また通常の PCR によるバンド検出においても、増幅されやすい短いバンドが主に検出され、リピート数の伸長したゲノムではやはりスメア状にしか解析できない。その問題点を解決するため、Small-pool PCR (Sp-PCR) と呼ばれる手法を用いることが、CTG リピート数評価のスタンダードな方法となっている。ごく僅かのゲノム DNA を含んだ PCR 解析を 1 クローンにつき 50 サンプル程度行い、感度の良いサザンブロッティングでバンドを検出し、そのバンドサイズのばらつきを統計処理して解析するという手法である(Nakamori et al. Neuromuscular disorders, 2009)。3 患者から 2 クローンずつ iPS 細胞を樹立し、合計 6 クローンについてまず未分化時の CTG リピー

ト数を評価し、同じ継代数で骨格筋・心筋・神経の3つの系統への分化誘導した後のCTGリピート数を評価し、3つの組織での差異を解析する。次に未分化状態で継代を続けていった際のCTGリピート数について、およそ10継代ごとに未分化iPS細胞のCTGリピート数を評価し、初期、中期、後期の3段階でリピートが伸長するかどうかを解析する。さらに、それぞれの継代数での骨格筋・心筋・神経分化誘導も実施し、継代が進んだ際の分化時のCTGリピート数の挙動も評価する(図1)。



## (2) 網羅的遺伝子発現解析、エピゲノム解析によりリピート伸長因子の候補を同定

CTGリピート伸長が再現された分化系・評価系において網羅的遺伝子発現解析およびエピゲノム解析を行う。京都大学iPS細胞研究所では連携研究者の渡辺博士が管理者を務めるゲノム・エピゲノム解析コアファシリティが稼動しており、一連の解析はこのファシリティを活用して行う。網羅的遺伝子発現においては、RNAマイクロアレイよりもさらに微量な発現レベルを精度よく解析できるRNAシーケンス(RNAseq)を実施する予定である。リピート伸長が再現できなかった評価系での変化と比較することで、リピート伸長が再現できた評価系において特異的に上昇あるいは下降している因子を抽出する。

またエピゲノム修飾においては、患者の体細胞においてDMPK遺伝子のCTGリピート部の上流の領域に、異常なゲノムのメチル化が増加することが報告されているが(Castel et al. Hum. Mol. Genet., 2011)、クロマチン構造を解析した例はない。連携研究者の渡辺博士らは、ATACseqという手法を用いてクロマチン構造がオープンになっているのか、クローズであるのかを解析する技術も導入しており、この手法を用いてDMPK遺伝子のCTGリピート部に患者のみで見られる異常な構造がないかどうかを検証する。

## 4. 研究成果

### (1) 各段階でのCTGリピート数評価

筋強直性ジストロフィー(DM1)患者3例からのiPS細胞各2クローン、計6クローンについて、継代維持培養、神経細胞、骨格筋細胞および心筋細胞への分化誘導培養を実施し、3段階の異なる継代数でそれぞれのゲノ

ムDNAを回収し、精度の高いSmall pool PCR法(Sp-PCR法)にてCTGリピート数を解析した。

まず継代維持培養時においては、すべてのクローンにおいて、約10継代ごとの継代数の増加とともにCTGリピート数のピーク値が増大する傾向が認められた。次に特定組織への分化誘導時については、元の未分化細胞と比較して、ほとんどCTGリピート数には変化がない事が明らかとなった。これは神経細胞、骨格筋細胞、心筋細胞のどの系譜においても同様であった。また継代数が増えれば、分化細胞でのCTGリピート数は増大する傾向が、未分化細胞と同様に認められた。以上の結果から、CTGリピート数の増大を決定づける因子は、特定組織への分化ではなく、細胞の増殖過程であることが強く示唆される(図2)。



## 図2. リピート数解析結果

横軸はリピート数、縦軸はサンプル全体の中でその長さのDNAが認められた割合を表している。維持培養初期、中期、後期のリピート数の変化を見ると、最も継代培養の進んだ後期でリピート数が増大している。一方、未分化状態から筋肉細胞に分化させた場合には、有意なリピート数の増大は認めなかった。

維持培養中の継代を重ねることでリピートが伸長することが明らかとなったため、これが細胞分裂によるものであるかを解析した。維持培養時と筋細胞分化時において、Cell Traceによる分裂回数測定実験を行った。リピート伸長が認められたiPS細胞の維持培養中では1週間で平均8.9回の分裂であったのに対し、筋分化誘導では1週間で平均5.6回の細胞分裂回数であった。我々が評価したサンプルの分裂回数を試算すると、維持培養では約55回、筋分化誘導では約6回となる。このことからiPS細胞モデルにおけるリピート伸長は、細胞分裂時に起きていることが示唆された。

### (2) 網羅的遺伝子発現解析、エピゲノム解

析によりリピート伸長因子の候補を同定

まず、網羅的遺伝子発現解析に移行する前の段階として、患者由来 iPS 細胞から分化させた組織細胞において、RNA のスプライシング異常が本当に起こっているかどうかを確認するため、既報で報告されているいくつかの遺伝子について、その RNA スプライシングパターンを PCR にて健常 iPS 細胞由来組織と比較した。いくつかの遺伝子において、患者で報告されていると同様のスプライシング異常を検出することに成功した。

次に、心筋細胞への分化時におけるエピジェネティックな変化の解析のため、高次クロマチンの構造がヘテロクロマチンであるのかユークロマチンであるのかを解析する ATAC-seq という研究手法を用いて、クロマチン構造を網羅的に解析した。

DM1 患者 1 例からの iPS 細胞 2 クローンと、健常者由来 iPS 細胞 2 クローンについて解析を行った。まず得られたリード数のクオリティチェックにより、患者由来心筋の 1 クローンにおいて、十分なリード数が得られなかったためデータ解析は行わず、健常 2 クローンと患者 1 クローンの比較解析を行った。その結果、ユークロマチン状態を意味する ATAC ピークの総数が、健常と比べ患者で約 1/2 となっていることが分かり、DM1 患者由来細胞で遺伝子発現が全体に抑制されている可能性が示唆された。ピークが下がっている遺伝子領域は中胚葉発生や心臓の形成にかかわる遺伝子群が含まれ、CTG リピート伸長あるいはスプライシング異常が心筋分化に影響を及ぼす可能性が明らかとなった。さらに CTG リピート部位付近のゲノムにおけるクロマチン構造を詳細に解析すると、DMPK 遺伝子の CTCF 領域近傍および SIX5 のプロモーター領域で ATAC ピークが有意に減弱していた。これらは既報においてゲノム DNA のメチル化促進が報告されている領域であり、DM1 において CTG リピート伸長そのものが近傍領域の転写抑制に関わる機構の存在が示唆された。

次に筋筋直性ジストロフィー (DM1) 患者 1 例からの iPS 細胞 2 クローンと、健常者由来 iPS 細胞 2 クローンについて、それぞれ心筋細胞へ分化させ RNAseq による網羅的遺伝子発現解析を進めた。DM1 細胞で特異的に 5 倍以上上昇する遺伝子として約 300 個を、1/5 以下に発現が低下する遺伝子として約 200 個を同定したが、これまで報告のあるミスマッチ修復蛋白などリピート伸長に関連するような分子の同定には至らなかった。またエピジェネティックな異常が認められた DMPK および SIX5 について、アンチセンス鎖の発現量も含めて解析したが明確な差は認めず、エピジェネティックな異常が発現異常に直結しているわけではないという結果であった。これらの結果から、残念ながらリピート伸長に影響を与える分子の同定には至っていないが、比較対象を工夫することで今回得られたデータを今後も候補分子の同定に役立て

てゆく。

最終的な成果としては、①DM1-iPS 細胞におけるリピート伸長は未分化細胞維持培養時に顕著にみられ、分化誘導時にはあまり認められないこと。②またそれは細胞分裂回数と関連があること。③DM1-iPS 細胞から分化させた神経、心筋、骨格筋細胞において、患者で認められるのと同様のスプライシング異常が起きること。④そして DM1-iPS 細胞由来心筋細胞では DMPK 遺伝子近傍にエピジェネティックな異常が存在すること、であり、これら成果を Scientific Reports 誌に投稿し受理・出版された。国際的には、DM1 患者由来 iPS 細胞を使って、Sp-PCR 法という精度の高い解析法で CTG リピート伸長を明らかにした最初の報告となり、DM1 患者由来 iPS 細胞がリピート伸長解析の良い細胞モデルになるという事を国内外に知らせる成果となった。今後は、リピート伸長メカニズム解析のために DM1 患者由来 iPS 細胞が利用されると考えられ、リピート伸長そのものをターゲットにした治療薬開発に貢献するモデルとなることが期待される。

#### 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 1 件)

①Ueki J, Nakamori M, Nakamura M, Nishikawa M, Yoshida Y, Tanaka A, Morizane A, Kamon M, Araki T, Takahashi M.P., Watanabe A, Inagaki N, Sakurai H.

Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability

Scientific Reports. 2017 Feb 13;7:42522. 査読あり、DOI: 10.1038/srep42522.

[学会発表] (計 2 件)

①加門正義、植木絢子、櫻井英俊、荒木敏之 DM1 患者由来 iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングと CTG リピート伸長メカニズムの解明 第 5 回骨格筋カンファレンス、2017 年 2 月 20 日、国立精神・神経医療研究センター (東京都小平市)

②植木絢子、中森雅之、高橋正紀、櫻井英俊 Modeling genetic instability of the CTG repeats in Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) patient-derived iPS cell

The 10<sup>th</sup> International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, 2015 年 6 月 10 日、パリ (フランス)

[図書] (計 0 件)

[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

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/sakurai2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻井 英俊 (SAKURAI, Hidetoshi)  
京都大学・iPS細胞研究所・准教授  
研究者番号：80528745

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

高橋 正紀 (TAKAHASHI, Masanori)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20359847

中森 雅之 (NAKAMORI, Masayuki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：60630233

渡辺 亮 (WATANABE, Akira)  
京都大学・iPS細胞研究所・助教  
研究者番号：60506765

### (4) 研究協力者

植木 絢子 (UEKI, Junko)  
城之内 達也 (Jonouchi, Tatsuya)