

# 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの 治療法開発に向けたDUX4遺伝子の機能解析

三橋 弘明<sup>†</sup>第74回国立病院総合医学会  
(2020年10月17日 於 新潟)

IRYO Vol. 76 No. 1 (50-54) 2022

## 要旨

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) は顔, 肩, 上腕の筋萎縮・筋力低下を特徴とする遺伝性疾患で, 患者数の最も多い型の筋ジストロフィーの1つである. 平均発症年齢は10代であるが, 先天性型や早期発症型も知られており, 網膜症や難聴の合併がみられる例もある. FSHD患者の約95%は, 第4番染色体4q35領域に存在するD4Z4反復配列が11回未満に短縮しており, FSHD1と分類される. また, 約5%の患者は, *SMCHD1* 遺伝子に変異を有しており, FSHD2と分類される. どちらの型も4qAと呼ばれる特別な遺伝子多型を持つ場合のみ発症する. これまでの研究から, FSHD1とFSHD2は共通のメカニズムで発症すると考えられており, D4Z4反復配列の短縮または*SMCHD1* 変異の結果, D4Z4領域のDNAメチル化が減少し, 最もテロメア側のD4Z4配列内に存在する*DUX4* 遺伝子の脱抑制が生じることが疾患の原因と考えられている. FSHD患者の筋細胞に認められるDUX4- $\beta$ タンパク質はホメオボックスを2つ持つ転写因子であるが, 本来, 筋細胞には発現しておらず, その機能については未知の部分が多い. われわれはDUX4のcDNAをクローニングし, さまざまな改変体を作製してDUX4の転写活性と細胞毒性が相関することを明らかにした. また, DUX4- $\beta$ タンパク質のC末端約80アミノ酸残基が転写活性化ドメインとして機能することを明らかにした. さらに, ロングリードシーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により, DUX4- $\beta$ は筋細胞で初期胚特異的遺伝子や非遺伝子領域からの転写を誘導することが確認された. これらの結果から, DUX4- $\beta$ の転写因子活性の阻害がFSHDの治療法開発戦略の1つとなることが示唆された.

キーワード FSHD, DUX4, 転写因子, トランスクリプトーム

## はじめに

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (Facioscapulohumeral muscular dystrophy: FSHD) は常染色体優性遺伝形式をとる筋ジストロフィーである. 有病率はおよそ8,000人に1人と推測されており, 頻度の高い筋疾患の1つである. 顔, 肩, 上腕の筋萎縮, 筋力低下を主な症状とし, 筋肉以外の症状とし

て網膜症や神経性難聴の合併が認められる. 筋病理所見では, 筋線維の壊死・再生といった筋ジストロフィー変化がみられ, 血管周囲の炎症細胞浸潤がみられる場合もある.

FSHDの遺伝的要因は複雑であり, 現在の学説では第4番染色体4q35に存在するD4Z4領域の低メチル化と, そのテロメア側に存在する遺伝子多型 (4qA, 4qB) の2つの要因が重要と考えられている (図

東海大学工学部 生命化学科 <sup>†</sup> 教員

著者連絡先: 三橋弘明 東海大学工学部 生命化学科 准教授 〒259-1292 神奈川県平塚市北金目4-1-1

e-mail: hmitsuhashi@tsc.u-tokai.ac.jp

(2021年3月18日受付, 2021年10月15日受理)

Functional Analysis of *DUX4*, A Causative Gene for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy

Hiroaki Mitsuhashi, Department of Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai University

(Received Mar. 18, 2021, Accepted Oct. 15, 2021)

Key Words: FSHD, DUX4, transcription factor, transcriptome

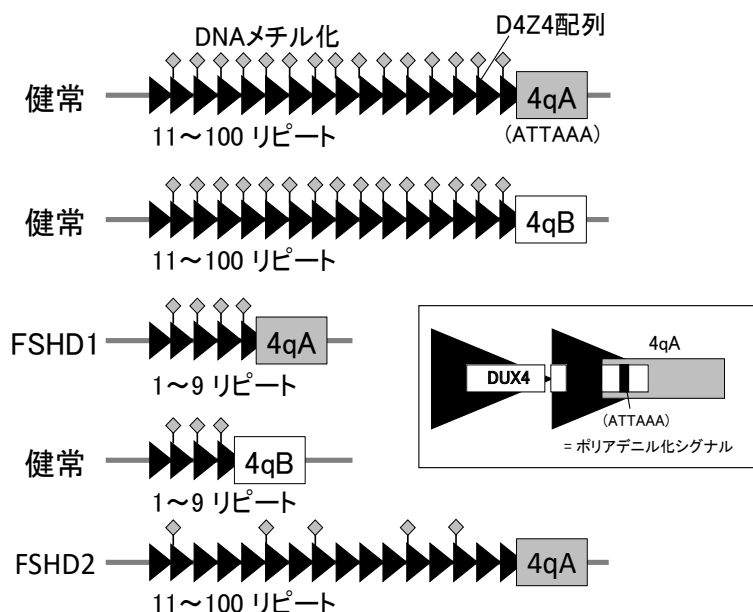


図1 FSHDの遺伝的要因

4q35の模式図を示す。D4Z4配列の中にはDUX4のOpen Reading Frameが存在する。4qA多型の中にはポリアデニル化シグナルが存在し、末端のD4Z4から転写されるDUX4 mRNAが安定化する。

1). FSHD患者の約95%では4q35に存在する3.3kbの繰り返し配列(D4Z4)が短縮しており、FSHD1 (OMIM158900)と分類される。短縮したD4Z4領域では、DNAのメチル化が減少している。FSHD患者の約5%にはD4Z4の短縮が認められないが、D4Z4のメチル化の減少は認められる。近年、こうした患者の中にD4Z4のメチル化に関わる*SMCHD1*遺伝子に変異が見いだされ、FSHD2 (OMIM: 158901)と分類されている。さらに最近では、*DNMT3B*遺伝子や*LRIF1*遺伝子もD4Z4のメチル化に関与することが示唆されている。通常、筋細胞ではD4Z4領域は高度にメチル化され、4q35領域からの転写は抑制されているが、FSHD1およびFSHD2では低メチル化により転写がおこりやすい状態になっている。その結果、D4Z4配列内に存在するDUX4遺伝子からの転写が生じる。D4Z4配列内にはポリアデニル化シグナルがなく、転写されたDUX4 mRNAは速やかに分解されるが、4qA多型にはポリアデニル化シグナルとなる塩基配列ATTAAAが存在している。そのため、D4Z4が低メチル化状態にあり4qA多型を持つ人では、最もテロメア側のD4Z4配列から転写されたDUX4 mRNAがポリアデニル化を受けて安定化する。その結果、DUX4タンパク質が産生され、筋細胞に障害を与えらると思われている<sup>1)</sup>。

DUX4タンパク質は転写因子であり、選択的スプライシングにより約55kDaのDUX4-fと約20kDaのDUX4-sが産生され得る。FSHD1、FSHD2両方の患者で、全長型のDUX4-fが高頻度に産生される。DUX4-fは転写因子として*ZSCAN4*、*MBD3L2*、*TRIM43*などの初期胚に発現する遺伝子群や、MaLRなどのレトロトランスポゾン由来配列からの転写を活性化する。実験的にDUX4-fを培養細胞や動物に発現させるとアポトーシス性細胞死や筋変性が生じるが<sup>2) 3)</sup>、DUX4-fが活性化する遺伝子群との関連性についてはまだ解明されていない。一方、DUX4-sは健康人にも発現が認められ、転写因子としての活性がほとんどないことが報告されている。

われわれは、DUX4-fの転写因子としての働きと筋細胞死との関連性を調べるため、DUX4のcDNAをクローニングし、さまざまな改変体を作製して転写因子活性と細胞毒性との関係を詳細に解析した。また、ロングリード次世代シーケンサーを用いたDUX4発現筋細胞のトランスクリプトーム解析を行い、非遺伝子領域も含めDUX4-fによって誘導される転写産物について網羅的な解析を行った。これらの研究によってDUX4-fが筋細胞に障害を及ぼすメカニズムを分子レベルで明らかにすることにより、今後の治療法開発の戦略が少しずつみえてきた。

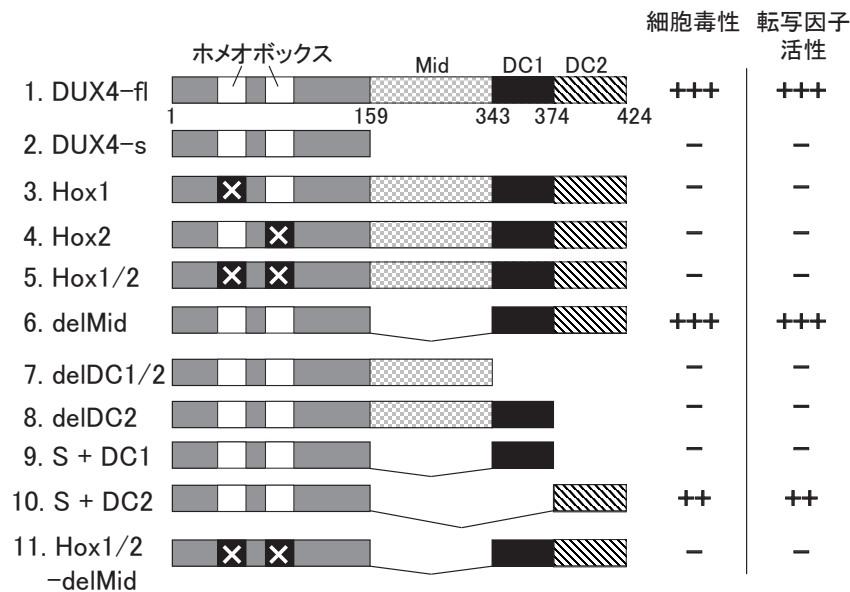


図2 作製したDUX4変異体。×はホメオボックスの変異を表す。

## 方 法

### 1. DUX4の転写因子活性と細胞毒性の相関の検討

DUX4-flおよびDUX4-sのcDNAをクローニングし、哺乳類細胞での発現コンストラクトを作製した。それらをもとに、DUX4-flのホメオボックスに変異を入れた変異体を3種（図2, Hox1, Hox2, Hox1/2）、DUX4-flに特異的なC末端領域を部分的に欠失した欠失変異体を5種（図2, delMid, delDC1/2, delDC2, S+DC1, S+DC2）、ホメオボックス変異とC末端欠失を両方持つ変異体1種（図2, Hox1/2-delMid）の合計9種類のDUX4変異体を作製した。作製したDNAをヒト子宮頸癌由来細胞株HeLa細胞に遺伝子導入し、48時間後の細胞生存率をCell Counting Kit-8 アッセイ（同仁化学研究所）で測定した。また、遺伝子導入して24時間後にtotal RNAを抽出し、逆転写したのち、DUX4標的遺伝子の1つであるZSCAN4の発現量を定量的PCRで測定した。また、DUX4-flと各DUX4変異体を同時に発現させ、競合阻害がおこるかどうかをルシフェラーゼアッセイで検討した。

### 2. ロングリードシーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析

DUX4-fl発現コンストラクトをヒト横紋筋肉腫由来細胞株RD細胞に遺伝子導入し、24時間後にRNAを抽出した。ポリアダニル化された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を遺伝子導入した細胞を用いた。得られたデータはヒトゲノムリファレンス (GRCh38) にLAST (<https://gitlab.com/mcfrith/last>) を用いてマッピングし、DUX4-fl発現によって統計的に有意に発現量が変化する転写産物を同定した。

## 結 果

### 1. DUX4の転写因子活性と細胞毒性の相関の検討

DUX4変異体をHeLa細胞に遺伝子導入し、48時間後に観察したところ、DUX4-flの2つのホメオボックスのうち、1つでも変異が入ったもの（図2のHox1, Hox2, Hox1/2）は細胞死を引き起こさなかった。また、DUX4-flのC末端50アミノ酸残基 (DC2と呼ぶ) を欠失したdelDC2変異体でも細胞死は起こさなかった。反対に、細胞毒性のないDUX4-sに、DUX4-flのC末端50アミノ酸を付加したS+DC2変異体では、有意に細胞死が引き起こされた。DUX4-sにDUX4-flのC末端82アミノ酸を付加したdelMid変異体では、DUX4-flと同程度の細胞死が引き起こされた。これらの結果から、DUX4-flによる細胞毒性には、2つの完全なホメオボックスとC末端50アミノ酸残基が必要であることが明らかとなった（図2,3）。次に、これらのDUX4変異体の転写因子としての活性を、標的遺伝子の1つであるZSCAN4の発現量を指標として検討した（図4）。そ

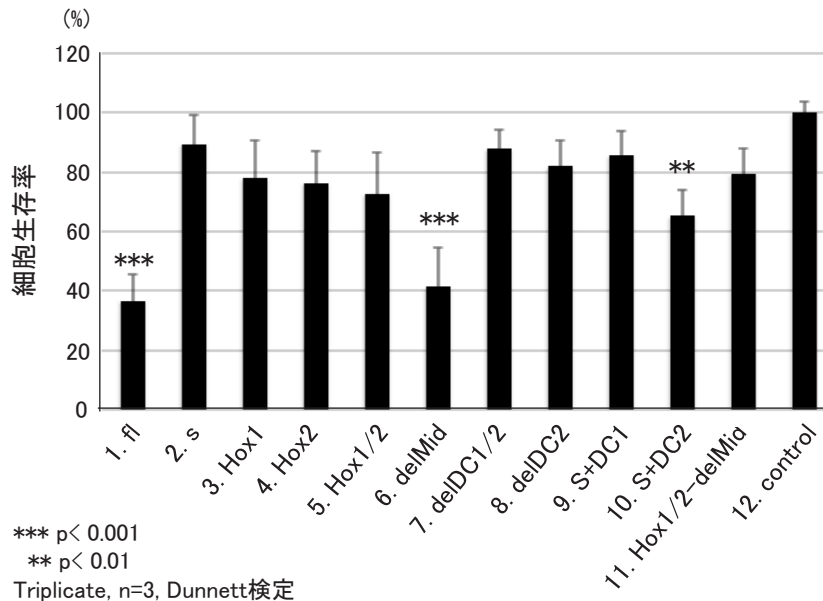


図3 DUX4変異体の発現による細胞生存率の変化

の結果、細胞毒性のあるdelMid変異体とS+DC2変異体ではZSCAN4の発現が誘導されるが、細胞毒性を示さなかった変異体では、ZSCAN4の発現は認められなかった。また、われわれの別の実験では、転写因子活性がなく細胞毒性もないDUX4-sに、ウイルス由来のVP16転写活性化ドメインを融合させると、ZSCAN4の発現が強力に誘導されるばかりでなく、細胞毒性も持つことが示されている<sup>4)</sup>。これらの結果を総合すると、DUX4-flの細胞毒性は転写因子活性に依存すると考えられた。また、DUX4-flの2つのホメオボックスはどちらも等しく毒性に必要であること、DUX4-flに特異的なC末端約80アミノ酸残基が転写活性化ドメインとして機能しており、とくに末端の50アミノ酸残基が重要だということが明らかとなった。

この実験の結果から、DUX4-flがホメオボックスを介して標的DNAに結合するのを阻害すれば、細胞毒性が弱まるのではないかと考えた。DUX4-sや、転写活性化ドメインを欠失させたdelDC2変異体などは、DUX4-flと同じホメオボックスを有しているが、転写因子活性を持たない。そのため、DUX4-flと競合し、阻害効果を発揮するのではないかと考えた。そこでHEK細胞にDUX4-flとDUX4-sまたはdelDC2変異体を共発現させ、ルシフェラーゼアッセイでDUX4-flの転写因子活性を測定したところ、顕著な抑制が認められた<sup>4)</sup>。この結果から、DUX4-flのDNA結合阻害はFSHDの治療戦略になりうると考えられる。

## 2. ロングリード次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析

ロングリードRNAシーケンシングを行った結果、DUX4-flを発現するRD細胞においてZSCAN4、MBD3L2、TRIM43、RFPL2、PRAMEF1、LEUTX、KDM4Eなどの初期胚特異的遺伝子の顕著な発現増加が認められた。これらは過去に報告されたショートリード次世代シーケンサーでのトランスクリプトーム解析の結果と非常によく一致していた。したがって、これらの遺伝子がDUX4-flの標的であり、FSHD患者の骨格筋で高発現していることはかなり確証の高い事実と考えられる。また、MaLRなどのレトロトランスポゾン由来配列からの転写も多数、検出された。われわれの解析では、MaLRのほかには内源性レトロウイルスであるHERVLやLINE、Alu要素、SVA因子、セントロメア付近に存在するサテライト配列(HSATII)などの非遺伝子領域からの転写も複数、検出された。これらの非遺伝子領域からの転写がFSHD患者の体でもお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、定量的PCRで発現量を調べた。その結果、調べた4種類の非遺伝子領域配列のうち、2種類は健常者由来の細胞に比べ、FSHD患者由来の細胞で発現が増加していた。これらの結果から、DUX4-flによって活性化される非遺伝子領域からの転写産物は、過去の報告よりも複雑であることが明らかになった<sup>5)</sup>。

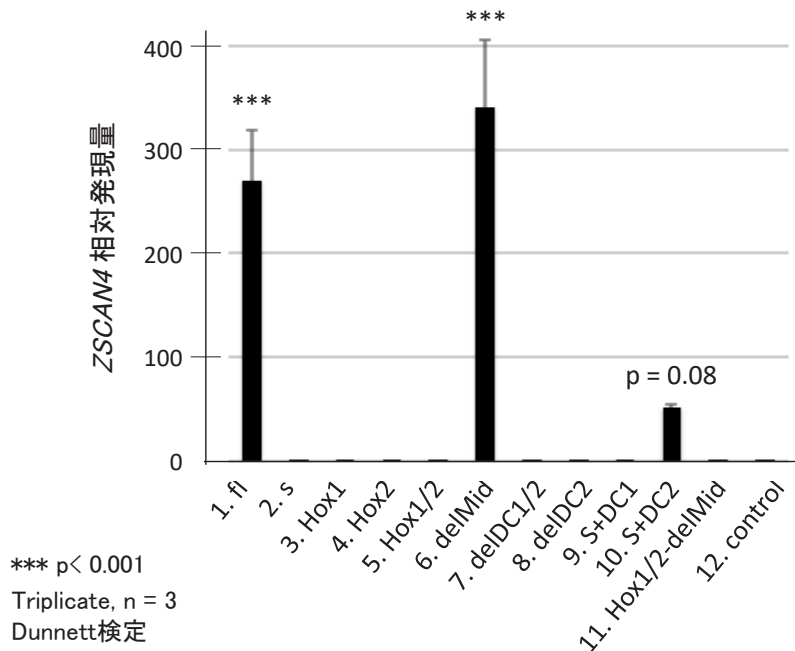


図4 DUX4変異体の発現によるZSCAN4遺伝子の発現

## 考 察

本研究により、FSHDの原因と考えられているDUX4-fタンパク質が筋細胞に障害を与えるメカニズムは、その転写因子活性に依存することが強く示唆された。DUX4-fのDNA結合阻害が1つの治療戦略になる可能性が示唆された。また、トランスクリプトーム解析により、DUX4-fの下流の遺伝子群が明確になり、非遺伝子領域からの多数の転写も確認された。初期胚特異的遺伝子群や内在性レトロウイルスなどの非遺伝子配列は、本来、骨格筋には発現していないものであるため、これらの異常なタンパク質やRNAが筋細胞の障害や炎症に関与している可能性が考えられる。こうしたDUX4-fの下流でおきる現象を解明することが、将来、FSHDの治療法開発につながるものと期待する。

〈本論文は第74回国立病院総合医学会シンポジウム(2020年)「筋ジストロフィー治療開発の最先端、次の10年に何が起るか」において「顔面肩甲骨型筋ジストロフィーの治療法開発に向けたDUX4遺伝子の機能解析」として発表した内容に加筆したものである。〉

**謝辞:** 本研究の一部はボストン大学のJeffrey Boone Miller教授、本間幸子博士との共同研究で行われた。本研究は文部科学省科学研究費補助金(KAKENHI 15K19477, 18K07511) および先進ゲノム支援

(16H06279)の支援を受けて行われた。ここに感謝を申し上げます。

**著者の利益相反:** 本論文発表内容に関連して申告なし。

## 【文献】

- 1) 三橋弘明. 顔面肩甲骨型筋ジストロフィーの病態の理解と治療法の開発. 難病と在宅ケア 2020 ; 26 (9) : 21-5.
- 2) Mitsuhashi H, Mitsuhashi S, Lynn-Jones T, et al. Expression of DUX4 in zebrafish development recapitulates facioscapulohumeral muscular dystrophy. Hum Mol Genet 2013 ; 22 : 568-77.
- 3) Pakula A, Lek A, Widrick J, et al. Transgenic zebrafish model of DUX4 misexpression reveals a developmental role in FSHD pathogenesis. Hum Mol Genet 2018 ; 28 : 320-31.
- 4) Mitsuhashi H, Ishimaru S, Homma S, et al. Functional domains of the FSHD-associated DUX4 protein. Biol Open 2018 ; 7(4) : bio033977. doi : 10.1242/bio.033977.
- 5) Mitsuhashi S, Nakagawa S, Sasaki-Honda M, et al. Nanopore direct RNA sequencing detects DUX4-activated repeats and isoforms in human muscle cells. Hum Mol Genet 2021 ; 30 : 552-63.