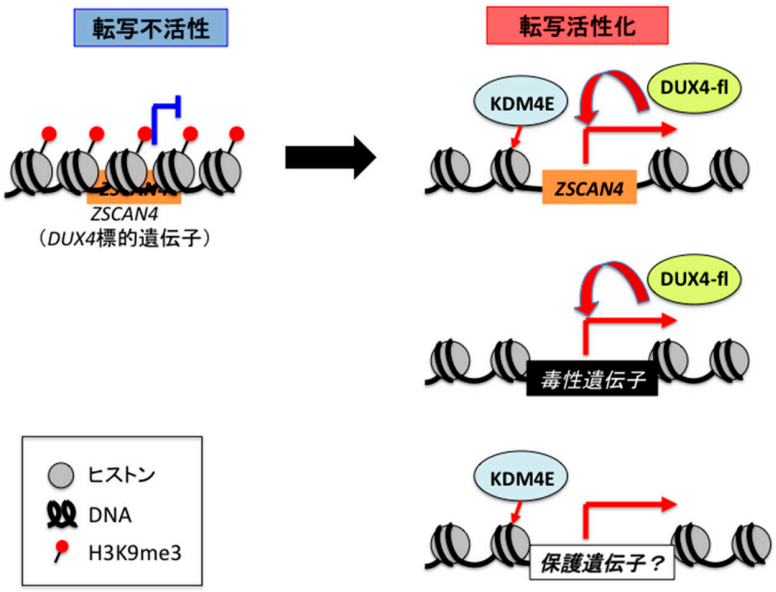
159　DUX4-flによるエピジェネティック制御の解析	三橋　弘明

【目的】本研究は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）の原因遺伝子である DUX4-fl と、エピジェネティック因子の関係性について明らかにすることを目的とする。

【方法】DUX4-fl は転写因子としてはたらき、FSHD 患者の骨格筋で *ZSCAN4* などの初期胚特異的な遺伝子群を活性化させるが、この際にエピジェネティック修飾の変化が生じていると予想した。本研究では DUX4-fl 標的遺伝子群が H3K9me3 ヒストン修飾を受けていることから、ヒストンリジン脱メチル化酵素 KDM4 ファミリーに着目し、KDM4 ファミリーの発現解析、cDNA クローニング、過剰発現とノックダウンをおこない、DUX4-fl との関連を調べた。

【結果】その結果、*KDM4E* の発現が DUX4-fl によって制御されていることを見出した。また、KDM4D、KDM4E の過剰発現により *ZSCAN4* の発現量が増加することが明らかとなった。RNAi による KDM4E の発現抑制は DUX4-fl 依存性の細胞死を増悪させた。反対に、DUX4-fl と KDM4E の共発現をおこなうと DUX4-fl による細胞毒性がわずかに減少した。以上の結果から、KDM4E が DUX4-fl 依存的な細胞毒性に保護的な役割を持つ可能性が示唆された。

DUX4-fl による転写制御と本研究の概略



159. DUX4-fl によるエピジェネティック制御の解析

三橋　弘明

東海大学 工学部 生命化学科

Key words：筋ジストロフィー，FSHD，DUX4，エピジェネティクス

緒　言

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型の遺伝性筋疾患であり、病態の解明と治療法の開発が待たれているが、いまだ分子病態が明らかでなく、根本的な治療法も存在していない。これまでの研究から、*DUX4* 遺伝子から転写される DUX4-fl が FSHD の原因であると考えられている［1，2］。DUX4-fl は正常では発生初期胚と精巣の一部の細胞でのみ一過性に発現する機能未知の転写因子であり、正常な骨格筋では発現していないが、FSHD 患者の骨格筋では高頻度に発現している。そのため、FSHD 患者筋では、*ZSCAN4* 遺伝子などの初期胚特異的遺伝子が異所性に発現している[3]。このような遺伝子発現の撹乱により筋細胞の恒常性が破綻し、細胞死を起こすことが FSHD の発症につながるのではないかと考えられているが、DUX4-fl がどのように初期胚特異的遺伝子群の発現を活性化するのかについては明らかになっていない。そこで本研究では、エピジェネティック因子に着目して、DUX4-fl 標的遺伝子の活性化機構を探ることとした。

方　法

まず、データベース検索により、DUX4-fl 標的遺伝子群のプロモーター領域に共通のヒストン修飾を探索した。H3K9me3 修飾が重要と考えられたため、H3K9me3 脱メチル化酵素である KDM4 ファミリーに属する 5 遺伝子ついて DUX4-fl 存在下での発現を RT-PCR で調べた。また、KDM4 ファミリーの cDNA をクローニングし、HEK293 細胞に過剰発現させることにより、*ZSCAN4* 遺伝子発現への影響を調べた。反対に KDM4E に対する siRNA を用いたノックダウンをおこない、DUX4-fl 依存性の細胞毒性への効果を調べた。さらに KDM4 と DUX4-fl の関係を調べるため、KDM4 阻害剤や DUX4-fl と KDM4E の共発現実験をおこなった。

結　果

1. データベース検索による DUX4-fl 標的遺伝子群のヒストン修飾解析

DUX4-fl 標的遺伝子のエピジェネティック修飾を調べるため、ENCODE データベースを利用してヒストン修飾の検索をおこなった。その結果、DUX4-fl 標的遺伝子である *ZSCAN4*、*TRIM43*、*MBD3L2*、*RFPL2* のマウスホモログは全てヒストン H3 リシン 9 トリメチル化修飾（H3K9me3）を受けていることがわかった。H3K9me3 は高度に折りたたまれた構造的ヘテロクロマチン領域を作り、長期的/永続的に遺伝子に遺伝子の発現を抑制する修飾として知られている。したがって、DUX4-fl の標的遺伝子は、発生後の生体ではヘテロクロマチン状態にあり、強い遺伝子サイレンシングを受けていることが推測された。

2. DUX4-fl 発現による *KDM4* ファミリーの発現変化

構造的ヘテロクロマチン状態にある遺伝子群を DUX4-fl が転写活性化するためには、ヒストン修飾の変化をともなうクロマチン構造の緩みが必要になるだろうと考えた。H3K9me3 の脱メチル化酵素として KDM4 ファミリーが知られているため、DUX4-fl を発現した細胞での KDM4 ファミリーの遺伝子発現について、RT-PCR で検討をおこなった。KDM4A、KDM4B、KDM4C、KDM4D、KDM4E のすべての KDM4 ファミリーのうち、KDM4A～4D は DUX4-

fl の発現の有無に関係なく、一定量の発現を示したが、KDM4E は DUX4-fl の非存在下では発現が見られず、DUX4-fl 存在下で顕著な発現量の増加を示した（図 1）。この結果から、KDM4E の発現が DUX4-fl に制御されていることが明らかとなった。同じ遺伝子発現経路上に存在することから、KDM4E と DUX4-fl が協調して機能するのではないかという可能性が浮上した。

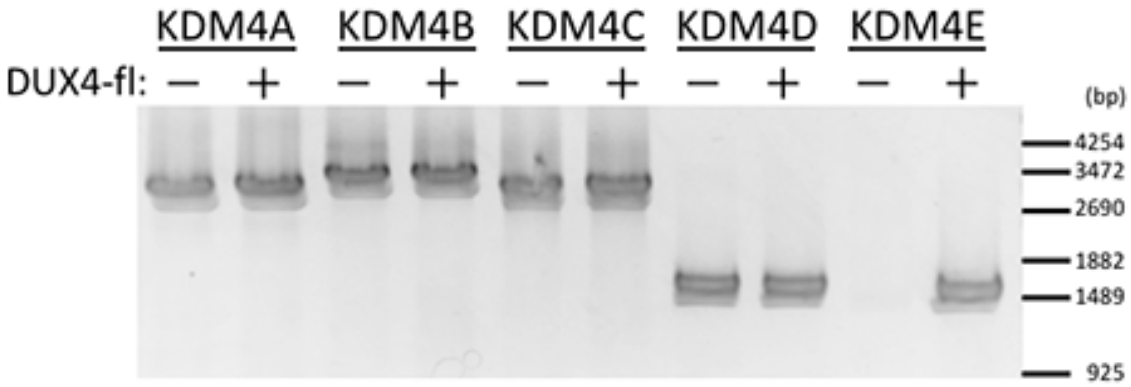


図 1. DUX4-fl は KDM4E の発現を誘導する
HEK293 細胞における KDM4 ファミリーの発現を RT-PCR で調べた。DUX4-fl の発現により KDM4E の発現が誘導された。

3. KDM4D、KDM4E による *ZSCAN4* 遺伝子の発現調節

KDM4 の機能を調べるため、cDNA のクローニングをおこない、KDM4E とホモログの KDM4D の cDNA を得た。pcDNA3.1-V5 ベクターへ挿入し、HEK293 細胞でタンパク質を発現し予想分子量に発現を確認した。KDM4D、KDM4E を過剰発現した時の *ZSCAN4* の発現量をリアルタイム PCR で定量すると、コントロールと比べ、KDM4D では約 2 倍、KDM4E では約 4 倍 *ZSCAN4* の発現が増加した（図 2）。このことから、予想通り KDM4 ファミリーが *ZSCAN4* 遺伝子の H3K9me3 修飾を脱メチル化することにより、*ZSCAN4* 遺伝子周辺のヘテロクロマチン構造が緩み、遺伝子が発現しやすい状態になることが示唆された。

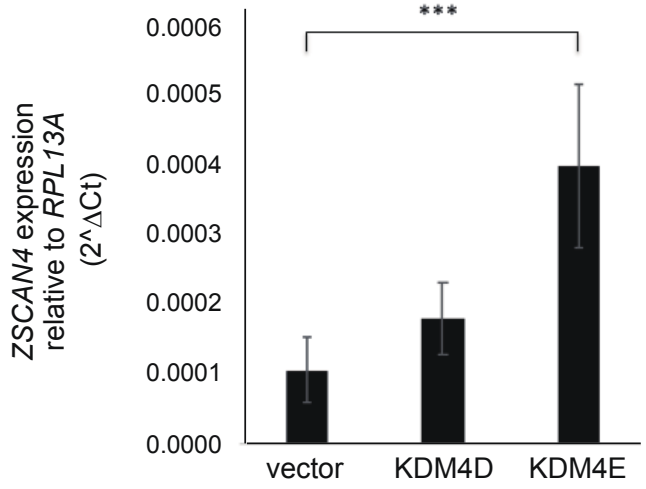


図 2. KDM4D、KDM4E の過剰発現は *ZSCAN4* の発現を増加させる
KDM4 ファミリーの KDM4D、KDM4E の過剰発現により DUX4-fl 標的遺伝子の *ZSCAN4* の発現が増加した。有意差は Dunnett 検定による。*** $p < 0.001$。

4. KDM4E 阻害による DUX4-fl 依存性細胞毒性への影響

これまでの結果から、DUX4-fl と KDM4E が協調して FSHD 患者筋細胞内で初期発生特異的遺伝子の活性化をおこなっているのではないかと仮説を立てた。この場合、DUX4-fl 存在下で KDM4E を阻害すると、DUX4-fl による標的遺伝子群（*ZSCAN4* を含む）の活性化が抑制される可能性があると考えた。過去の研究結果より、DUX4-fl の細胞毒性は自身の転写活性化能に依存していることがわかっている［4］。したがって KDM4E 阻害によって DUX4-fl の転写活性化能を抑制できれば、FSHD の治療につながる可能性があると考えた。そこでまず、KDM4E の siRNA によるノックダウンを検討した。DUX4-fl cDNA と KDM4E を標的とした siRNA を 20～60 nM の濃度で HEK293 細胞に導入し、48 時間後の KDM4E 発現量をリアルタイム PCR で定量した。その結果、20 nM 以上の濃度で有意に KDM4E の発現を抑制できていることが確認された。そこで次に DUX4-fl の細胞毒性について検討したところ、DUX4-fl とコントロール siRNA をコトランスフェクションした細胞に比べ、DUX4-fl と KDM4E siRNA をコトランスフェクションした細胞の方が細胞生存率が低いことが判明した（図 3）。この結果は予想外であったが、KDM4E が DUX4-fl 依存性の細胞毒性には保護的にはたらいている可能性を示唆した。

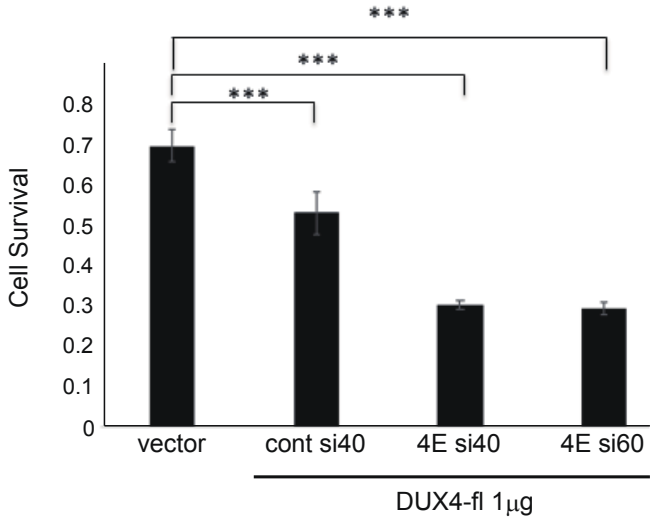


図 3. KDM4E のノックダウンは DUX4-fl 依存性の細胞死を増悪する
DUX4-fl と KDM4E siRNA のコトランスフェクションでは細胞生存率の低下が見られた。
有意差は Dunnett 検定による。*** $p < 0.001$。

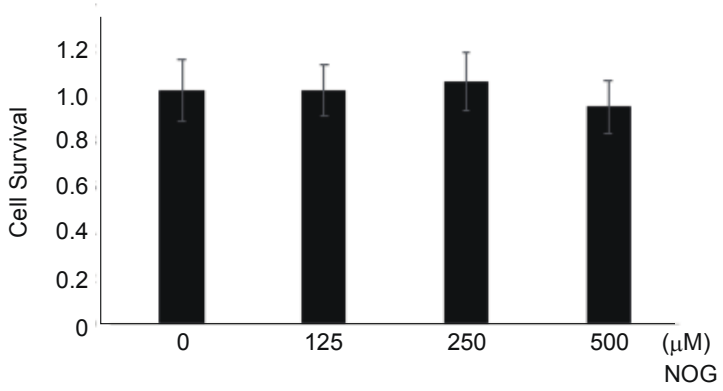


図 4. DUX4-fl 依存性細胞死に対する KDM4 阻害剤の効果
KDM4 阻害剤である NOG の投与ではいずれの濃度でも細胞死に対する効果はなかった。

また、低分子化合物による KDM4E の阻害を検討するため、KDM4 ファミリーの阻害剤として知られる *N*-Oxalylglycine（NOG）の投与実験をおこなった［5］。125～500 μM の NOG を添加し、細胞生存率を測定したが、どの NOG 濃度でも DUX4-fl の毒性は抑制されなかった（図 4）。また、DUX4-fl と KDM4E を同時に過剰発現し、細胞生存率への影響を検討したところ、DUX4-fl と KDM4E の共発現で、DUX4-fl の細胞毒性が有意に減少していた（図 5）。

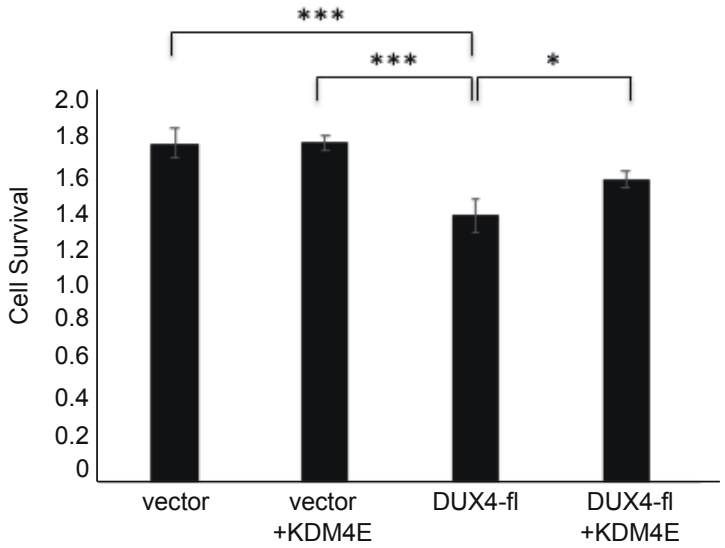


図 5. KDM4E の共発現は DUX4-fl 依存性の細胞死を緩和する
DUX4-fl と KDM4E を共発現させた細胞では生存率の増加が見られた。有意差は Dunnett 検定による。*** $p < 0.001$, * $p = 0.02$。

考　察

本研究ではこれまで調べられてこなかったDUX4-fl標的遺伝子のエピジェネティック制御に着目して研究をおこない、*ZSCAN4*の発現がKDM4ファミリーによって制御されることを明らかにした。特に、KDM4Eはその発現がDUX4-fl依存的に誘導されたことから、DUX4-flが引き起こす生理的なイベントと密接に関係していると考えられる。*ZSCAN4*遺伝子の発現制御に関してはKDM4Eは促進的にはたらいたが、DUX4-fl依存性の細胞死については保護的な役割を示唆した。これは予想外の結果であったが、DUX4-flが惹起するストレスに対し応答するストレス耐性遺伝子の発現制御にKDM4Eが関わっている可能性が考えられる。こうした新たな可能性を検証するために、本実験で得られたKDM4E cDNAやsiRNAの実験系を活用していく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camaño P, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, Tawil R, Frants RR, van der Maarel SM. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy.Science. 2010 Sep 24;329(5999):1650-3. Epub 2010 Aug 19. PMID: 20724583. doi: 10.1126/science.1189044.

2) Mitsuhashi H, Mitsuhashi S, Lynn-Jones T, Kawahara G, Kunkel LM. Expression of DUX4 in zebrafish development recapitulates facioscapulohumeral muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2013 Feb 1;22(3):568-77. Epub 2012 Oct 29.PMID: 23108159. doi: 10.1093/hmg/dds467.

3) 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 Jan 17;22(1):38-51. Epub 2011 Dec 29. PMID: 22209328. doi: 10.1016/j.devcel.2011.11.013.

4) 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). pii: bio033977. PMID: 29618456. doi: 10.1242/bio.033977.

5) Hamada S, Kim TD, Suzuki T, Itoh Y, Tsumoto H, Nakagawa H, Janknecht R, Miyata N. Synthesis and activity of N-oxalylglycine and its derivatives as Jumonji C-domain-containing histone lysine demethylase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2009 May 15;19(10):2852-5. Epub 2009 Mar 26. PMID: 19359167. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.03.098.