

論文審査の結果の要旨

氏名：本田（佐々木） 充

筋ジストロフィは、進行性の筋委縮と筋力低下を伴う骨格筋の遺伝性疾患群であり、異なる遺伝的背景や臨床像を持つ様々な型からなる。本田 充の博士研究では、エピジェネティックな異常が深く関連する筋ジストロフィである、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィ（以下 FSHD）に着目し、その病態の解明を目指した。

FSHD は、その名称は初めに侵襲されやすい部位に由来するが、加齢とともに全身性に筋委縮が進行し得る。FSHD には 1 型と 2 型があり臨床像に差はない。遺伝学的には、1 型は 4 番染色体末端近傍（4q35 領域）の反復配列 D4Z4 の反復数の短縮（10 以下）に起因し、2 型は D4Z4 の短縮がないが比較的短いことに加え、SMCHD1 遺伝子などの変異があることで発症する。両型とも、その遺伝的変異ゆえに、4q35 領域のクロマチン構造に“緩み”が生じ、健常者では発現しない DUX4 遺伝子が異常発現することで病態を呈するとされるが、その詳細な発現様式や病態への関与については不明な点が多い。また、患者由来の培養骨格筋細胞においては DUX4 遺伝子の転写産物や確率的なタンパク質発現が報告されているが、患者の筋生検においてタンパク質レベルで検出された例はなく、その発現量の低さが病態の理解を困難にしてきた。本研究では、DUX4 遺伝子発現制御に着目し、FSHD の病態の理解を目指した。

本研究では、上述の複雑な遺伝的背景に起因する FSHD について、細胞レベルでの病態を詳細に解析するため、共同研究先である京都大学 iPS 細胞研究所 櫻井英俊研究室にて、1 型および 2 型患者より人工多能性幹細胞（iPS 細胞）株を樹立した。特筆すべきこととして、論文提出者本人が 1 型の FSHD 患者であることから、この研究では本人の了解のもと、本人の細胞から採取した細胞を 1 型細胞とした。同研究室にて確立された筋細胞分化制御因子 MyoD の強制発現系を用いて、先に樹立した FSHD 患者由来および健常者由来の iPS 細胞株を、骨格筋細胞へ分化誘導した。これらの誘導筋細胞のうち、FSHD1 型および 2 型の患者由来株では、DUX4 およびその下流の標的因子 ZSCAN4、TRIM43、MBD3L2（DUX4 の転写因子活性の指標）の発現が認められたが、他方、健常者の株ではほとんど検出されなかった。このことから、樹立した FSHD 患者由来筋細胞は、既報の遺伝学的知見に一致して、DUX4 遺伝子発現を呈する細胞であることが示された。

さらに、FSHD2 型の細胞株については、遺伝子編集技術 CRISPR/Cas9 と相同組換機構を利用して、SMCHD1 変異修復 iPS 細胞株を作製し、同条件で筋細胞に誘導したところ、DUX4 発現が有意に抑制された。また、このことは下流の標的因子 ZSCAN4、TRIM43、MBD3L2 の発現が抑制されたこのことから確認された。これらから、SMCHD1 の変

異が DUX4 の遺伝子発現を亢進していることが示された。以上のデータから、ここまでで樹立した細胞株群は、以降の解析における FSHD 骨格筋細胞モデルとして適切であると考えられた。

次に、FSHD の臨床所見として、比較的遅い発症（10 代以降がほとんど）、患者間での病態進行のばらつき、筋委縮の部位特異性や左右非対称性などが知られていることから、何らかの外的環境因子が発症や病態の進行に関与すると仮定した。また、小規模な臨床試験で FSHD 患者の抗酸化剤の経口摂取が筋力の一部を改善したことや、患者骨格筋では酸化ストレスマーカーが上昇しているなどの報告があることから、酸化ストレスに着目した。そこで本研究では、「FSHD 患者由来筋細胞において、酸化ストレスが DUX4 遺伝子発現を変化させる」という仮説を立て、先に樹立した細胞株を用いて検証した。

初めに、患者由来および健常者由来の誘導筋細胞に対し、酸化ストレスのモデルとして過酸化水素を用いて刺激したところ、DUX4 および ZSCAN4 の発現上昇が FSHD 患者の筋細胞において濃度依存的に認められた。抗酸化剤 N-acetylcysteine によって、過酸化水素による DUX4 発現増大が減弱されたことから、過酸化水素添加の効果は酸化ストレスによることが示唆された。このことから、FSHD 患者筋細胞における DUX4 遺伝子発現に酸化ストレス応答性があることが示された。次に、FSHD2 型遺伝子修復細胞株について同様に解析したところ、酸化ストレス時にも DUX4 発現が低レベルに保たれたことから、酸化ストレスによる DUX4 発現の量的な上昇は、FSHD 患者のゲノム変異に特異的であることが示唆された。

次に、FSHD 患者由来筋細胞において酸化ストレスによる DUX4 発現を上昇させる分子機序について検討した。ストレス開始後の経時的な発現解析により、刺激後 6-12 時間の間に上昇が開始することが分かった。刺激後 6 時間において、DNA 損傷マーカーである γ H2AX 陽性細胞の割合が濃度依存的に増加していたことから、DNA 損傷の関与が示唆された。酸化ストレス以外の DNA 損傷応答を引き起こす外的刺激として、非致死性の UV 照射を行ったところ、過酸化水素添加の場合と同程度の DUX4 発現量増加が、FSHD 由来筋細胞において確認された。さらに、DNA 損傷応答を制御するキナーゼ群 (ATM,ATR,DNA-PK) の阻害実験により、酸化ストレス応答性を仲介する因子として、ATM が同定された。

以上の結果から、FSHD 患者由来筋細胞において酸化ストレスが DNA 損傷応答シグナルを介して DUX4 遺伝子発現を上昇させることが実証された。骨格筋は、過運動や筋損傷、あるいは炎症などにより酸化ストレスが発生しやすい環境にある。健常な骨格筋であれば、酸化ストレスは一過性の現象として適切に処理されるが、他方、FSHD 患者骨格筋では、酸化ストレスに応じて動く DNA 損傷応答シグナルが、クロマチンに“緩み”が生じた 4q35 領域に誤って入り、DUX4 遺伝子の転写を促進してしまうことが示唆される。本研究で見出された DUX4 遺伝子の酸化ストレス応答性が病態の発症や進行に対して与える影響については、今回用いた系での評価は困難であったが、新たな病

態モデルを確立して検討することが期待される。

本研究においての新規性をまとめると、第一に、FSHD 患者由来 iPS 細胞を用いて、新しい FSHD 骨格筋細胞モデルを確立した点、第二に、FSHD2 型由来細胞株と遺伝子編集技術を用いて、原因遺伝子 SMCHD1 が DUX4 遺伝子発現を制御することを遺伝学的に検証した点、第三に、環境要因が DUX4 遺伝子の発現を制御する最初の例として、酸化ストレスの関与を見出した点があげられる。さらに、その仲介分子として、DNA 損傷応答に関連する ATM キナーゼを同定した。これらの発見は、FSHD の特徴的な病態（症状のばらつき、左右非対称性）を説明する一要因となる可能性がある他、DUX4 遺伝子発現制御の新たな知見に基づいた治療法の開発に繋がると考えられる。また、FSHD 患者が日常生活において過度な酸化ストレスを防ぐことが、病態進行を遅らせるための手段となるかもしれないことを示唆している。

審査委員会においては、研究発表と質疑応答、さらに研究の基盤となる広い範囲について口頭試問を行い、申請者が十分な学識があることを確認した。以上の理由から、本審査の審査委員の総意をもって、本研究は博士（理学）の学位を授与するにふさわしいものと認定した。