

論文の内容の要旨

論文題目 筋発生・再生における DNA メチル化を介した骨格筋幹細胞制御機構
の解明

内藤 昌志

塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構をエピジェネティック制御と呼び、細胞の遺伝子発現プロファイルはエピジェネティックな機構によりコントロールされている。このエピジェネティック制御の一つに DNA メチル化が知られている。DNA メチル化は DNA メチル基転移酵素（Dnmt : DNA methyltransferase）によって行われ、哺乳類では Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の 3 種類が存在する。Dnmt1 は既存の DNA メチル化の維持を担っているのに対し、Dnmt3a および Dnmt3b はメチル化されていない DNA を新たにメチル化する *de novo* DNA メチル化を担っている。DNA メチル化の機能については未だ明らかにされていない部分も多いが、プロモーター領域の DNA メチル化は転写の抑制と関係していることが多くの報告により証明されている。Dnmt3a と Dnmt3b による *de novo* DNA メチル化は未分化な幹細胞が分化する過程で DNA メチル化プロファイルを形成し細胞の運命を決定するのに寄与すると考えられる。実際、胚性幹細胞における Dnmt3a および Dnmt3b の働きについては多くの報告があり分化能との関わりが証明されている。しかし、体性幹細胞における Dnmt3a や Dnmt3b についての報告はわずかしき存在せず、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞における Dnmt3a および Dnmt3b による *de novo* DNA メチル化の役割につ

いてはほとんど知られていない。本研究では、*de novo* DNA メチル基転移酵素 Dnmt3a による DNA メチル化を介した骨格筋幹細胞の制御機構について検討した。

まず始めに、骨格筋発生における DNA メチル化の役割を明らかにするために、*Pax3-Cre* マウスと *Dnmt3a-flox* マウスを交配し筋前駆細胞特異的 *Dnmt3a* コンディショナルノックアウト (conditional knock-out : cKO) マウス (*Pax3-Cre; Dnmt3a^{flox/flox}* マウス) を作成し表現型の解析を行った。*Dnmt3a*-cKO マウスは成長障害を呈し、*Dnmt3a*-cKO マウスの骨格筋は低形成で筋線維の構築はされるものの筋線維径が細かった。この表現型は骨格筋の成長障害を示していると思われ、出生後の骨格筋の成長を担う筋衛星細胞の機能障害が疑われた。

次に、*Dnmt3a*-cKO マウスの筋衛星細胞に機能障害が生じていることを確かめるため、前脛骨筋に筋損傷を起こし骨格筋再生能を評価した。*Dnmt3a*-cKO マウスでは筋再生が障害されており筋衛星細胞の機能障害が生じていることが示された。

Dnmt3a の欠失によって筋衛星細胞に機能障害が生じるメカニズムを明らかにするため、筋衛星細胞を *in vitro* で解析した。*Pax7* は筋衛星細胞特異的に発現する転写因子であり *Pax7-CreERT2; Dnmt3a^{flox/flox}* マウスではタモキシフェン誘導性に筋衛星細胞で *Dnmt3a* がノックアウトされる。このマウスにタモキシフェンを投与した後に筋衛星細胞を採取した。筋衛星細胞を増殖条件で培養したところ、*Dnmt3a*-KO 筋衛星細胞は細胞増殖が障害されていた。一方、*Dnmt3a*-KO 筋衛星細胞の分化能は保たれていた。このことから、*Dnmt3a* の欠失により筋衛星細胞の増殖障害が生じることが示された。

Dnmt3a が筋衛星細胞の増殖を制御するメカニズムを明らかにするため、*Dnmt3a*-KO 筋

衛星細胞のトランスクリプトーム解析を行った。DNA マイクロアレイの結果を細胞周期関連遺伝子について調べると、細胞周期を負に制御するサイクリン依存性キナーゼ (cyclin dependent kinase: CDK) インヒビターの一つである *p57Kip2* の発現が *Dnmt3a*-KO 筋衛星細胞で上昇していることがわかり、*Dnmt3a* の欠失は筋衛星細胞において *p57Kip2* の発現上昇を引き起こすと考えられた。バイサルファイトシーケンス解析によると *Dnmt3a*-KO 筋衛星細胞における *p57Kip2* プロモーター領域はコントロールに比較して有意に DNA 低メチル化状態であり、プロモーター領域の DNA メチル化レベルにより *p57Kip2* 発現が調節されていることが示唆された。

続いて、*Dnmt3a*-KO 筋衛星細胞の表現型すなわち細胞増殖障害が *p57Kip2* の高発現によって生じていることを確かめるために、*Dnmt3a*-KO 筋衛星細胞における *p57Kip2* ノックダウンの効果調べた。siRNA による *p57Kip2* ノックダウンによって *Dnmt3a*-KO 筋衛星細胞の細胞増殖障害の一部が有意にレスキューされ、*Dnmt3a* が *p57Kip2* の発現を調節することで筋衛星細胞の増殖を制御していることが示唆された。

Dnmt3a-cKO マウス筋線維の免疫染色により Pax7 陽性細胞で *p57Kip2* の高発現が見られ、筋組織から抽出したゲノムを用いたバイサルファイトシーケンス解析で *p57Kip2* プロモーターは *Dnmt3a*-cKO マウスにおいてコントロールマウスに比較して有意に DNA 低メチル化状態であった。これらのことから、*in vitro* のみならず *in vivo* でも *Dnmt3a* はエピジェネティックに *p57Kip2* を制御していることが示唆された。

Dnmt3a-cKO マウスの骨格筋再生能の低下が筋衛星細胞の増殖障害によって起こっていることを確かめるため非損傷筋と骨格筋損傷後の再生筋において Pax7 陽性細胞の頻度を調べた。

非損傷筋における Pax7 陽性細胞の割合は *Dnmt3a*-cKO マウスとコントロールマウスとの間で差がなかったのに対し、再生過程にある損傷筋では Pax7 陽性細胞の頻度が *Dnmt3a*-cKO マウスでコントロールマウスに比較して有意に少なかった。この結果から *Dnmt3a*-cKO マウスでは筋衛星細胞が定常状態で枯渇することはないが、筋損傷後の細胞増殖が正常に起こらないため骨格筋再生が障害されていることが示唆された。

本研究ではマウスにおいて筋前駆細胞特異的に *Dnmt3a* をノックアウトし *in vivo* および *in vitro* で解析することで *Dnmt3a* が筋衛星細胞の適切な増殖に必要であることを示し、さらに *Dnmt3a* の下流の標的遺伝子として *p57Kip2* を同定した。*Dnmt3a* が細胞周期を負に制御する CDK インヒビターである *p57Kip2* のプロモーター領域の DNA メチル化を介して筋衛星細胞の増殖を制御していることが示された。ヒトの疾患において体格および臓器の大きさを制御する *p57Kip2* の役割が明らかにされている。*p57Kip2* の機能喪失変異は筋肉を含むあらゆる臓器の大きさが増大する過成長症候群を呈する Beckwith-Wiedemann 症候群の原因となることが知られている。反対に機能獲得変異は発育遅延を呈する IMAGe 症候群や Silver-Russell 症候群の原因となる。本研究の結果と合わせて考えると、*Dnmt3a*-*p57Kip2* の経路が骨格筋量を決定する機構の一部を担っている可能性が示唆された。DNA メチル化と体および臓器のサイズを制御する機構との関係をさらに明らかにすることで、これまで治療困難と考えられてきたヒトの疾患に対する新たな治療アプローチが見出される可能性がある。