

審査の結果の要旨

氏名 内藤 昌志

本研究は胚性幹細胞の機能や個体発生に重要な役割を有する DNA メチル化が骨格筋幹細胞においてどのような役割を果たしているかを明らかにするため、組織特異的な遺伝子欠損の手法を用いたアプローチで *in vivo* および *in vitro* での解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 筋前駆細胞特異的 *Dnmt3a* コンディショナルノックアウトマウス (*Pax3-Cre; Dnmt3a^{fox/fox}* マウス) を作成し、このマウスの表現型として成長障害、骨格筋量の低下が見られ、カルディオトキシン注射による筋損傷実験では骨格筋再生障害が見られた。これらの結果は筋衛星細胞の障害を示唆するものと考えられた。
2. *Pax7-CreERT2; Dnmt3a^{fox/fox}* マウスにタモキシフェンを投与することにより *Dnmt3a* ノックアウト筋衛星細胞を作成し増殖条件および分化条件で培養したところ *Dnmt3a* ノックアウト筋衛星細胞では細胞増殖が障害されていたが分化能は保たれていた。
3. DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析の結果からサイクリン依存性キナーゼインヒビターの一つである *p57Kip2* の発現が *Dnmt3a* ノックアウト筋衛星細胞で上昇していることが示された。さらにバイサルファイトシーケンス解析によって *Dnmt3a* ノックアウト筋衛星細胞における *p57Kip2* プロモーター領域がコントロールに比較して DNA 低メチル化状態であることが明らかとなり、*Dnmt3a* ノックアウトによる *p57Kip2* プロモーター DNA の低メチル化が *p57Kip2* 高発現の原因と考えられた。
4. siRNA による *p57Kip2* ノックダウンによって *Dnmt3a* ノックアウト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。またクロマチン免疫沈降によって *p57Kip2* プロモーターが *Dnmt3a* の直接のターゲットであることが示された。
5. *Dnmt3a* コンディショナルノックアウトマウス筋線維の免疫染色と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によって *in vivo* でも *Dnmt3a* ノックアウトによる *p57Kip2* プロモーター領域の DNA 低メチル化と *p57Kip2* 高発現が生じていることが明らかとなった。
6. *Dnmt3a* コンディショナルノックアウトマウス骨格筋の免疫染色によって非損傷筋における *Pax7* 陽性細胞の割合は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* 陽性細胞およびリン酸化ヒストン H3 陽性細胞の頻度が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* コンディショナルノ

ックアウト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。

以上、本論文はマウスにおいて Dnmt3a による DNA メチル化を介した *p57Kip2* の発現制御が骨格筋幹細胞である筋衛星細胞の増殖に重要であることを分子生物学的な手法を用いて証明した。本研究はこれまでに明らかにされていなかった骨格筋幹細胞における DNA メチル化の役割を示すものであり、骨格筋幹細胞の機能制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。