

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成 19 年度博士課程入学
氏 名 山崎 邦隆
指導教員名 塩田 邦郎

論文題目

筋分化・再生系の DNA メチル化を中心としたエピジェネティック制御に関する研究

緒言

骨格筋は、体勢の維持、呼吸や運動に必須の収縮性を備え、筋損傷時の再生能を保持する。筋線維 (myofiber) の筋形質膜と基底膜の間に筋衛星細胞 (satellite cell) と呼ばれる単核細胞が存在し、骨格筋が怪我などにより損傷を受けると、休止状態にあった筋衛星細胞が活性化し、筋への分化運命決定を受けた筋芽細胞 (myoblast) となる。筋芽細胞は、筋分化・再生に必須の前駆細胞であり、筋管細胞 (myotube) への分化を経て、筋線維へと成熟する。一部の筋芽細胞は、未分化な筋衛星細胞として残り、次回の筋再生に備えるため、通常枯渇することはないとされている。しかし、ある種の筋疾患においては、長期にわたる筋分化・再生系の亢進や異常によって、脂肪化や線維化が生じたり、筋芽細胞も枯渇し、更なる筋再生が困難になることも提唱されている。治療法のひとつとして、筋芽細胞移植により筋再生を促すことが検討されてきたが、治療に用いる大量の筋芽細胞の供給源として、胚性多能性幹細胞 (ES 細胞) や、近年開発された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が大きな期待を集め、筋分化系譜細胞作出を目指す研究が急速に進んでいる。その際、筋芽細胞の特徴を定義し、分化能や安全性を評価することが必要となるが、現状においては、筋分化後特有のマーカー遺伝子を発現していないことや、数種の筋芽細胞発現マーカーが指標として用いられるのみであり、筋芽細胞とは何かという定義は非常に曖昧である。

DNA のメチル化は、エピジェネティック系の主要な制御機構であり、ゲノム上には、細胞・組織特異的にメチル化・脱メチル化される領域 (Tissue-Dependent methylated regions ; T-DMR) が存在する。このような細胞の DNA のメチル化/非メチル化の組み合わせ

わせは、DNA メチル化プロファイルと呼ばれる。近年、開発の進んだ網羅的解析技術を用いて得た DNA のメチル化プロファイルは、個体発生や細胞の分化だけでなく、再生医療、疾患の病因・診断・治療法確立の基礎として重要である。これまで、筋分化系の DNA メチル化プロファイル情報は得られておらず、DNA のメチル化という観点から、筋分化・再生系の持つ特徴や、筋から脂肪への分化転換による影響を明らかにすることは、難治性筋疾患の病因、治療法確立に有用な情報となる。

第1章 骨格筋の DNA メチル化プロファイル

筋分化系譜の最終分化器官である骨格筋の持つエピゲノムの特徴を捉える目的で、**D-REAM (T-DMR profiling with restriction tag-mediated amplification)**法を用いたゲノムワイドな遺伝子プロモーター領域（転写開始点の上流 6kb および下流 2.5kb）の DNA メチル化解析を行った。未分化な細胞であるマウス胚性幹細胞（ES 細胞）を比較対象として用い、骨格筋（腓腹筋）における低メチル化傾向およびメチル化傾向 **T-DMR** を同定した。さらに、ES 細胞と脳、腎臓、肝臓の比較により同定された **T-DMR** データと照合し、骨格筋においてのみ同定された **T-DMR** を選別した。これらの骨格筋に特徴的な **T-DMR** が存在する遺伝子について、ontology 解析を行ったところ、骨格筋で低メチル化傾向の **T-DMR** が存在する遺伝子には、筋分化に関連する ontology term の濃縮がみられ、筋分化マスター遺伝子である **MyoD1**、**Myf5**、**Myf6** が含まれた。骨格筋でメチル化傾向の **T-DMR** が存在する遺伝子には、DNA、RNA 制御に関連する ontology term の濃縮のほかに、筋分化に関連する ontology term の濃縮がみられた。一方、脳、腎臓、肝臓のいずれかの組織と共通に検出された **T-DMR** についての ontology 解析において、筋分化に関連する ontology term の濃縮はみられなかった。

以上のように、骨格筋の有する筋分化関連遺伝子領域の **T-DMR** を同定した。

第2章 筋前駆細胞の DNA メチル化プロファイル

第1章の結果から、筋分化に関連する遺伝子領域には、骨格筋に特徴的な **T-DMR** が存在することが示された。そこで、これまで筋分化に関与する報告のある遺伝子領域に存在する **T-DMR** から、筋分化・再生系における特徴的な DNA メチル化制御の検出が可能であると考え、筋分化に関連する ontology term を持つ遺伝子群および、筋特異的な発現パターンを有する遺伝子群から成る 1734 遺伝子のリストを作成した。

第1章の骨格筋（腓腹筋）と同様に、筋への分化運命決定を受けた筋芽細胞（myoblast）、および筋芽細胞を *in vitro* において分化させた筋管細胞（myotube）を用いて、ES 細胞を比較対象とした **D-REAM** 解析を行った。1734 筋分化関連遺伝子について、ES 細胞をコントロールとした **HEAT MAP** 解析を行ったところ、筋芽細胞・筋管細胞・骨格筋を通じて類似した低メチル化あるいはメチル化傾向を示す **T-DMR** が存在する一方で、筋芽細胞および筋管細胞と骨格筋間で異なるメチル化状態を示す **T-DMR** が存在した。メチル化状態の異

なる T-DMR には、骨格筋において低メチル化あるいはメチル化方向に変化する T-DMR に加えて、筋芽細胞および筋管細胞で一時的に低メチル化あるいはメチル化の亢進が生じる T-DMR の存在が認められた。

さらに、筋分化マスター遺伝子である Pax3、Pax7、MyoD1、Myogenin、Myf5、Myf6 遺伝子領域について詳細に検討したところ、ひとつの遺伝子領域に複数の T-DMR が存在しており、それぞれの T-DMR のメチル化状態は一様でなく、筋芽細胞・筋管細胞・骨格筋間の比較においても、筋分化関連遺伝子間でみられた低メチル化あるいはメチル化方向の変化パターンの混在が認められた。

以上のことから、筋分化関連遺伝子に存在する T-DMR には、筋芽細胞・筋管細胞・骨格筋間において、低メチル化方向の変化だけでなくメチル化方向の変化も生じていること、また、漸増・漸減型の変化だけでなく、筋芽細胞・筋管細胞において一時的な低メチル化／メチル化の亢進がみられることが示され、遺伝子間において一様、一方向性の変化ではないことが明らかとなった。

第 3 章 DNA メチル化情報を用いた筋衛星細胞筋分化系および脂肪分化転換系の評価

第 2 章の結果から、筋芽細胞・筋管細胞・骨格筋の特徴を示す T-DMR のメチル化情報が得られた。筋衛星細胞は初代培養が可能で、筋管細胞に分化する。また、脂肪細胞への分化転換が可能である。そこで、第 2 章で得られた筋分化マスター遺伝子群および筋分化関連遺伝子群に存在する T-DMR の DNA メチル化情報と、脂肪分化関連遺伝子群に存在する T-DMR の DNA メチル化情報を用いて、筋衛星細胞、筋分化後および脂肪誘導した筋衛星細胞におけるメチル化状況を検討した。

筋衛星細胞のメチル化状態は、筋分化マスター遺伝子群 T-DMR、筋分化関連遺伝子群 T-DMR および脂肪分化関連遺伝子群 T-DMR いずれの場合においても、ほとんどの T-DMR において筋芽細胞のメチル化状態とは異なった。また、筋衛星細胞と筋芽細胞間で見られたメチル化状態の違いは、ES 細胞と筋芽細胞間で見られた違いと相関が認められたが、ES マスター遺伝子群 T-DMR (Oct-3/4、Nanog、Sox2、Myc) を用いて、筋衛星細胞と ES 細胞を比較した結果、メチル化状態は異なっていた。

筋分化後の筋衛星細胞のメチル化状態は、筋分化マスター遺伝子群 T-DMR、筋分化関連遺伝子群 T-DMR および脂肪分化関連遺伝子群 T-DMR を用いて比較すると、第 2 章で用いた myotube より、骨格筋のメチル化状態に類似したメチル化状態を示す T-DMR が多かった。

脂肪誘導した筋衛星細胞のメチル化状態は、筋分化マスター遺伝子群 T-DMR、筋分化関連遺伝子群 T-DMR および脂肪分化関連遺伝子群 T-DMR を用いて比較すると、筋分化した場合と脂肪誘導した場合で変化の少ない T-DMR と大きく変化する T-DMR が存在した。大きく変化する T-DMR は、Myf5、Myf6、Ppar γ 、Prdm16 などの遺伝子領域に存在した。

以上のことから、第 2 章で得た筋芽細胞・筋管細胞・骨格筋の特徴を示す T-DMR のメチ

ル化情報を用いて、筋衛星細胞および分化後の筋衛星細胞の特徴を示すことができた。また脂肪誘導により分化転換すると、筋分化関連遺伝子や脂肪分化関連遺伝子領域に存在する T-DMR にメチル化状態の変化が生じることが明らかとなった。

総括

DNA のメチル化情報という新たな観点から骨格筋の分化を捉えることにより、筋分化・再生系はエピジェネティック制御を受けることが示唆された。筋分化関連遺伝子領域の DNA メチル化状態の変化は、筋分化・再生過程では、一方向性のものではなく、複数の T-DMR が低メチル化／メチル化両方向性に多様に変化する事が明らかとなった。また、T-DMR の DNA のメチル化状態から、筋衛星細胞、筋芽細胞、筋管細胞、骨格筋を定義し評価することも可能となった。筋分化系細胞が脂肪細胞に分化転換した場合において、DNA メチル化状態に影響を受ける T-DMR が存在することから、骨格筋が骨格筋であり続ける、あるいは骨格筋から脂肪へのポイント切り替えとなるような、分化の方向付けに関わるエピジェネティックな制御も考えられ、筋の生理学および、難治性筋疾患や加齢による脂肪化の病因解明・治療法確立のための新たな概念を提供した。