

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山崎 邦隆

---

哺乳類ゲノムの遺伝子領域には、細胞・組織特異的にメチル化される領域 (Tissue-dependent and differentially methylated region; T-DMR) が存在する。少なくともゲノムに存在する数千に上る T-DMR のメチル化／非メチル化の組み合わせは膨大で、DNA メチル化プロファイルは、細胞のフィンガープリントとなっている。近年、DNA のメチル化プロファイル解析を目的に、新たな網羅的解析法 (T-DMR profiling with restriction tag-mediated amplification; D-REAM) が確立されている。

骨格筋は体躯の維持に加え、エネルギー代謝や血流量調整の中心ともなる、主要組織のひとつである。筋芽細胞 (myoblast) は、筋の前駆細胞であり、筋管細胞 (myotube) を経て、筋線維 (myofiber) へと分化し成熟する。筋衛星細胞 (satellite cell) は成熟後も見られる細胞で、筋形質膜と基底膜の間に存在する単核細胞である。筋芽細胞の一部が損傷修復時に備え、未分化な状態で残った細胞が筋衛星細胞とされる。これまでの研究では、筋衛星細胞は、組織幹細胞と同等に筋再生に関与していると考えられ、骨格筋が損傷を受けると筋衛星細胞が活性化し、筋芽細胞になると理解されている。一方、難治性筋疾患においては、幹・前駆細胞系の異常や筋分化・再生系の障害が予測され、再生が見られないことが問題で、あるいは、脂肪化や線維化を伴う分化異常が観察されている。多くの場合は治療法が無いため、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の研究に期待がよせられている。筋分化の理解と再生医療のための基盤情報として DNA メチル化プロファイル解析が必要とされている。本論文は三章よりなる。

第一章では、D-REAM 法を用いマウス胚性幹細胞 (ES 細胞)、脳、腎臓、肝臓などを比較対象とした骨格筋 (腓腹筋) のゲノムワイド DNA メチル化解析が行われ、骨格筋 T-DMR が同定された。骨格筋で低メチル化となる T-DMR を有する遺伝子 (群) 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* も含まれていた。骨格筋で高メチル化の T-DMR 遺伝子 (群) には、DNA や RNA 制御に関連する ontology term の濃縮のほか、筋分化に関する遺伝子 (群) の濃縮がみられた。骨格筋に特徴的な T-DMR 情報を基に、筋の分化に関連する遺伝子群および、筋特異的な発現パターンを有する遺伝子群から成る 1380 遺伝子のリストが作成された。

第二章では、第一章で同定された 1380 筋分化関連遺伝子 T-DMR に注目した、筋芽細胞および筋管細胞の DNA メチル化プロファイル解析がなされた。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 (*Pax3*、*Pax7*、*MyoD1*、*Myogenin*、*Myf5*、*Myf6*) 領域には、複数の T-DMR が存在していること

が判明した。これら T-DMR のメチル化状態を筋芽細胞・筋管細胞・骨格筋間で比較し、筋芽細胞からの筋分化過程では、メチル化・脱メチル化両方向のダイナミックな変化が起きていることが判明した。しかも、漸増・漸減型の変化だけでなく、一過性の低メチル化／メチル化の亢進がみられることが示された。

第三章では、筋衛星細胞からの筋分化過程の DNA メチル化プロファイルが解析された。筋衛星細胞の DNA メチル化プロファイル解析の結果、筋芽細胞とは大きく異なることが明らかになった。それにも関わらず、筋衛星細胞から筋分化を誘導したところ、骨格筋の DNA メチル化プロファイルに近似していた。筋衛星細胞と筋芽細胞はともに骨格筋への分化能を保持し、近似した組織幹細胞であると考えられていたが、分化系列は全く別である可能性を示唆している。筋芽細胞と異なり、筋衛星細胞は、培養下で盛んに増殖し、条件によっては脂肪細胞へと分化する。この実験系を用い、脂肪分化関連遺伝子群 T-DMR も同定された。筋衛星細胞から骨格筋あるいは脂肪細胞分化を制御するエピジェネティクスの制御領域が初めて明らかになった。

以上、本論文では、骨格筋について分化段階の各細胞の DNA メチル化プロファイルが明らかになった。また、DNA メチル化解析から、意外にも筋芽細胞と筋衛星細胞の DNA メチル化プロファイルは異なること、したがって、分化経路を含め、必ずしも両者は同じではなく、骨格筋へ分化経路すら同じでない可能性が示された。これらの発見は筋分化の遺伝子制御の基礎として重要であるばかりでなく、再生医療の新たな取り組みにつながる可能性も示され、応用研究としても新たな視点を提供している。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。