

学 位 論 文 要 旨

氏 名 飯尾 浩之

論 文 名 筋衛星細胞における DNA 維持メチル化酵素 Dnmt1 は筋再生に必須である

学位論文要旨

【背景】骨格筋量の減少は加齢、廃用症候群、神経疾患など様々な疾患または状態によって引き起こされ、QOL の低下や健康寿命の短縮にも関与する。また、がんにおける筋肉量の減少を引き起こすカヘシキアは癌患者の QOL 低下のみならず、治療抵抗性や有害事象の増加にも関与しているとされる。これら筋肉量減少への治療法や予防法の開発が期待されるものの、現状では有用な薬剤はない。治療法開発のためにはまず骨格筋の制御メカニズムを明らかにする必要がある。骨格筋は筋線維が束となり構成され、筋線維の細胞膜と基底膜の間に筋衛星細胞が存在する。骨格筋の筋衛星細胞 Pax7 を特異的に発現しており、筋衛星細胞は刺激がない状態では静止状態にある。筋肉の炎症や損傷といった刺激により筋衛星細胞は増殖および分化を始める。単核の筋衛星細胞から筋芽細胞へと分化し、そして筋芽細胞が融合し、多核の筋線維を形成する。一方で、筋衛星細胞はその静止状態の細胞の数を維持するために、一部の細胞は分化の道から外れ、再び静止状態となる。最近のマウスの研究では、筋衛星細胞が筋肉の再生に不可欠であることが明らかになった。また、エピジェネティックな転写制御は、運動の中心臓器である骨や筋肉を含むすべての細胞種の分化に不可欠である。細胞の分化は、DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンリモデリングなどのエピジェネティックな制御とともに転写因子によって統制されている。DNA メチル化については *de novo* メチル化に関与する DNA メチル化酵素 Dnmt3a と Dnmt3b、維持メチル化に関与する Dnmt1 が、DNA メチル化反応を触媒する酵素として同定されている。Dnmt3a が制御する *de novo* メチル化と骨格筋再生との関係が報告されているが、維持 DNA メチル化の調節因子と骨格筋再生との関係は明らかではない。本研究では、骨格筋再生における Dnmt1 の役割を解明するために、筋衛星細胞特異的 Dnmt1 ノックアウトマウスを作製し、筋再生モデルと RNA シークエンスを用いて解析した。

【方法】(1) 筋再生とエピジェネティックな変化との関係を解析するため、筋損傷後の野生型マウスの前脛骨筋をヘビ毒の注射で障害させ、4、7、14 日目に採取した。そのサンプルを用い、DNA メチル化因子 *Dnmt1*、*Dnmt3a*、および *Dnmt3b* の mRNA 発現を調べた。

(2) *Dnmt1* が筋再生に必要なかどうか調べるため、まず *Pax7^{CreERT2}; Dnmt1^{ff}* マウスを作出した。このマウスにタモキシフェンを 5 日間連続で腹腔内投与することで、筋衛星細胞に特異的に *Dnmt1* をノックアウトした。*Dnmt1^{ff}* マウスにも同様に投与しコントロールとした。投与開始 7 日目に下肢の筋肉を採取し、FACS を用いて筋衛星細胞を単離した。qPCR とウエスタンブロットでノックアウトを確認した。

(3) 筋衛星細胞において *Dnmt1* が筋再生に必要なかどうか調べるため、cKO マウス(タモキシフェンを投与した *Pax7^{CreERT2}; Dnmt1^{ff}* マウス)と 2 種類のコントロールマウス Con1 コーンオイルを投与した *Pax7^{CreERT2}; Dnmt1^{ff}* マウス)および Con2 (タモキシフェンを投与した *Dnmt1^{ff}* マウス) の 2 種類のコントロールマウスを用いて評価した。それぞれの左前脛骨筋(n=5)にヘビ毒を注入し、筋損傷後 14 日目に採取した。外観の観察と筋重量を測定し、筋再生は筋線維断面積(CSA)を計測し評価した。

(4) 骨格筋における *Dnmt1* の機能を調べるために、筋衛星細胞を用いて RNA-seq を行った。*Pax7^{CreERT2}; Dnmt1^{ff}* マウスおよび *Dnmt1^{ff}* マウスのそれぞれにタモキシフェンを 5 日間連続で投与し、7 日目に筋衛星細胞を単離し、増殖培地で 3 日間培養した後に RNA を回収した。また RNA-Seq により *Dnmt1* ノックアウトで有意に発現が上昇した遺伝子群を抽出し、Gene ontology (GO) 解析にて発現変動する遺伝子群の機能を分類した。その結果をもとに、筋衛星細胞を同様に単離後、培養し細胞数を評価した。

【結果と考察】野生型マウスを用いた筋再生モデルでは mRNA レベルで *Dnmt3a*、*Dnmt3b* よりも *Dnmt1* の発現が大きく増加していた。*Pax7^{CreERT2}; Dnmt1^{ff}* マウスを作出し、筋衛星細胞特異的な *Dnmt1* のノックアウトを qPCR とウエスタンブロットで確認できた。筋衛星細胞特異的な *Dnmt1* ノックアウトマウスを用いた筋損傷実験ではコントロールマウスに比べて外観上の筋再生不良と筋重量の有意な低下を認めた。また CSA も有意に減少しており、*Dnmt1* が筋肉の再生に必須の因子であることが示唆された。RNA-seq の結果、*Dnmt1* のノックアウトで 289 個の遺伝子発現が上昇しており、これらに対する GO 解析ではアポトーシスや細胞接着に関連する遺伝子群が抽出された。*Dnmt1* をノックアウトした筋衛星細胞の培養では細胞数の減少を認めており、*Dnmt1* が衛星細胞数の正の調節に関与していることを示唆している。本研究は筋衛星細胞における *Dnmt1* の機能について初めて報告したものである。これらのメカニズムを解明することで、骨格筋の減少や筋疾患の治療法の開発につながる可能性がある。

【倫理審査】本研究にて実施した動物実験は愛媛大学動物実験委員会、遺伝子組換え実験は愛媛大学医学系研究科等遺伝子組換え実験安全委員会により承認されている。

キーワード (3~5)	<i>Dnmt1</i> 筋衛星細胞 エピジェネティクス 骨格筋 筋再生
-------------	--