

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	飯尾 浩之
審査委員	主査 三浦 裕正 副査 金川 基 副査 青戸 守 副査 原口 竜摩 副査 武森 信暁

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

審査結果の要旨

【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。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は 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。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が、維持メチル化に関与する Dnmt1 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) 野生型マウスの前脛骨筋をへび毒の注射で障害させ、筋損傷後の 4、7、14 日目に採取し DNA メチル化因子 Dnmt1、Dnmt3a、および Dnmt3b の mRNA 発現を調べた。

(2) 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、筋衛星細胞特異的 Dnmt1 ノックアウトマウス (タモキシフェンを投与した $Pax7^{CreERT2}; Dnmt1^{f/f}$ 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^{f/f}*マウス)および Con2 (タモキシフェンを投与した *Dnmt1^{f/f}*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。

(3) 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。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・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 Dnmt1 の発現が大きく増加していた。筋衛星細胞特異的 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、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た。

【結論】本研究は筋衛星細胞における DNA 維持メチル化酵素 Dnmt1 の機能について初めて報告したものである。Dnmt1 が筋再生において必須であることが明らかとなった。今後、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。

審査会は令和 3 年 1 月 15 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した。その後審査員から本研究に関して、ヘビ毒による筋損傷モデルの作成法、損傷メカニズム、モデルの妥当性、Dnmt3a の挙動についての解釈、性差の影響、癌細胞での Dnmt1 の発現、cKO マウスにおける癌化の可能性、cKO マウスや単離した衛星細胞の culture を長期的に観察した場合の予測、アセチル化やヒストンのメチル化など他のエピジェネティックな変化との関連性、サルコペニアなどの臨床的課題との関連等についての質問がなされた。

申請者はこれらの質問に対し、問題点や今後の展望を含め、明快に回答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。