

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15544

研究課題名(和文) Rp58を介した筋サテライト細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of muscle satellite cells differentiation via Rp58

研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA, Hiroshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70294460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋は運動機能における動力源であり、組織幹細胞による再生メカニズムとMyoDに始まる発生分化転写制御システムの研究モデルとして長らく医学・生物学をリードしてきた。我々は、筋分化に必須の転写因子としてRp58を同定、これがDNAメチル化と連動して筋分化制御を担っている可能性を示した。本研究の成果は、筋の疾患、再生医療に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Muscle, a power source in our musculoskeletal function, has long been studied in medicine and biology for its regeneration mechanism by tissue stem cells and transcriptional control system starting with MyoD. We identified Rp 58 as a transcription factor essential for muscle differentiation and showed that this could be responsible for muscle differentiation control in conjunction with DNA methylation. The results of this research are expected to contribute to muscle diseases and regenerative medicine.

研究分野：分子生物学、発生・再生医学、整形外科学

キーワード：骨格筋 サテライト細胞 DNAメチル化 筋再生

1. 研究開始当初の背景

個体の発生は、たったひとつの受精卵から細胞が分裂していく中で、個々の細胞の遺伝子発現調節を介した運命決定と細胞間の調和からなる。この時、遺伝子の発現プログラムは個々の細胞に長期あるいは短期のエピゲノム情報として記憶されることによって、細胞は集団として個体としてのシステムを構築する。なかでも DNA のメチル化については、長期エピゲノム記憶において中心的な役割を果たしていると考えられているが、どの遺伝子部位に、どのタイミングで、どのような分子機序でリクルートされるか、まだ多くが明らかでない。これらを明らかにすることは、生物の発生、ヒトの発育、恒常性維持、組織再生など多くの医学・生物学研究にとって基盤となる課題であるが、今まで、鍵となる分子、遺伝子が同定されなかったことが本課題の解明を困難にしていると考えられる。MyoD の発見は、初めて組織特異的な転写因子が発生・分化を誘導することを示し、その後の医学・生物学的に大きな影響を与えている。筋においてはその後の多くの研究により、複数の転写“活性化”因子が、協調して筋分化に関わることがしめされたが、同時に、筋分化によって不必要な遺伝子群をロックする転写“抑制”因子の存在が予想されていた。我々は、発生期における全ての転写因子の 4 次元的な発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) によって解析し、分類したデータベース EMBRY5 を作成、公開した (Yokoyama et al. Dev Cell 2009)。この EMBRY5 はマイクロアレイに比べ、より空間解像度の高い WISH 解析を用いているため、筋の発生に必須の転写“抑制”因子として Rp58 を同定することができた (Yokoyama et al. Dev Cell 2009)。しかし、筋幹細胞であるサテライト細胞における機能は明らかでない。

我々は最近、Human Methylation 450k Bead Chip を用いて、ヒト筋芽細胞の分化における DNA メチル化部位を全ゲノムにおいて解析、筋分化において特異的に DNA メチル化が起こるシーケンスを同定したところ、DNA メチル化は筋分化とともに上昇し、Rp58 の結合配列が最も強く DNA メチル化されることが明らかとなった (Hum Mol Genet 2014)。興味深いことに、この Rp58 は DNMT3A と結合することが報告されており (Fuks F, et al, EMBO J, 2001)、De novo メチル化のメカニズムとの関わりが示唆されている。しかし、これらの部位において、Rp58 が本当に DNA メチル化に寄与しているかどうか、また、どのような分子機序で *de novo* メチル化がおこるか明らかでない。

Rp58 は筋の発生に必須の転写リプレッサーであり、その筋再生における機能を Rp58 コンディショナルノックアウトマウスと Pax7-CreER マウスを用いて、解析する。さらに、Rp58 の筋の発生・再生における直接の遺伝子ターゲットを決定し、DNA メチル化を含めた、遺伝子制御メカニズムを検討する。さらに、*de novo* DNA メチル化酵素である DNMT3a、3b コンディショナルノックアウトマウスと Pax7-CreER マウスを用いて、筋再生における DNA メチル化のダイナミズムを比較検討し、エピジェネティクス制御を介した筋再生機構の分子基盤を明らかにする。

2. 研究の目的

筋は運動機能における動力源であり、組織幹細胞による再生メカニズムと MyoD に始まる発生分化転写制御システムの研究モデルとして常に医学・生物学をリードしてきた。我々は、筋分化に必須の転写因子として Rp58 を同定、さらに、ヒト筋芽細胞の分化系を用いたゲノムワイドなメチル化解析で、Rp58 に認識されるプロモーターが効率に DNA メチル化を受けることを明らかにした。本研究ではこれらの研究を基に、コンディショナルノックアウトマウスを用いて、Rp58 の筋サテライト細胞における筋再生を促す機能を解析し、Flag ノックイン Rp58 マウスを用いて Rp58 および DNMT3a, b を介した DNA メチル化を中心としたエピジェネティクスレベルでの筋分化・再生の分子機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Rp58CKO (Rp58^{fl/fl}) を用いて、遺伝子改変マウス (Pax7Cre^{ERT2}; Rp58^{fl/fl}, Pax7^{fl/fl}; Rp58^{fl/fl}) 各 6 匹ずつを用意する。タモキシフェン 3mg/40gBW 腹腔内注射を連日 5 日間行い Rp58 遺伝子をサテライト細胞でノックアウトする。タモキシフェン投与初日より 7 日後に前脛骨筋に cardiotoxin (0.03mg/ml) 50 μ l を注射することにより筋損傷を起こし、術後 1 週あるいは 2 週で前脛骨筋を採取し、筋組織を HE 染色ならびに、Pax7, MF20, troponin T 等の筋特異的抗体染色で検討することで、筋再生の評価を行う。また、Pax7Cre^{ERT2}; Rp58^{fl/fl} よりサテライト細胞を採取し、*in vitro* でタモキシフェンを投与した後に筋分化を誘導し、サテライト細胞の筋分化における Rp58 の役割を検討する。

Rp58 のターゲットをゲノムワイドに探索するため、ChIP シークエンスを行う。TALEN・CRISPR 法を用いて、Rp58 の 5' に Flag タグをノックインしたマウスを作成し、Flag タグで Rp58 の結合するクロマチン断片を免疫

沈降し、DNA を次世代シーケンサーを用いてシーケンスすることで、Rp58 が結合しているプロモーターを同定する。ChiP シーケンスならびに TALEN・CRISPR による Flag ノックアウトマウスの作成については、現在当研究室で稼働している。これら Rp58 の結合部位に対し、転写開始点から、上流 7kb 下流 3kb をプロモーターと定義して、その中に Rp58 の DNA 結合予測サイトを持つものを選出し、それらプロモーターが実際に、Rp58 のターゲットであるかどうかを予測する。

こうして、同定された候補遺伝子を中心に、Rp58 に直接制御されるかどうかにつき、1) プロモーターアッセイ、2) ゲルシフトアッセイ、3) クロマチン免疫沈降、によって、解析を行い、さらに、4) Rp58 の過剰発現による候補遺伝子の発現をリアルタイム PCR で確認し、5) KO マウスにおける未分化筋芽細胞における各々の遺伝子の発現の確認を行う。6) さらに、直接ターゲットであると確認された遺伝子につき、その遺伝子の機能を C2C12 細胞の筋分化誘導系において TALEN/CRISPR で遺伝子変異を導入することで解析する。

4. 研究成果

骨格筋幹細胞における DNA メチル化の意義を明らかにするため、骨格筋前駆細胞で発現する Pax7 あるいは Pax3 依存的に Dnmt3a 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作成した。このマウスは正常なマウスより筋肉量が少ない傾向がみられましたが、正常なマウスと比較して、一見フェノタイプがないようにられた。しかし、筋が損傷を受けた後の筋再生を観察したところ、ノックアウトマウスにおいては、再生能力が著しく障害されていることが観察された。このノックアウトマウスをさらに詳細に解析すると、筋肉の元となる細胞（幹細胞）である筋サテライト細胞の増殖が障害されていることが明らかとなった。また、筋再生時において、DNA メチル化を十分行うことのできないノックアウトマウスにおいては、サテライト細胞の指標となる Pax7 陽性細胞の数が激減しており、サテライト細胞が十分増えることができないため、筋の損傷が治癒できないことが考えられた。さらに、ノックアウトマウスの筋サテライト細胞の異常の原因を探るため、筋サテライト細胞における遺伝子の発現をマイクロアレイという手法で解析したところ、本来なら低く保たれているはずの *p57Kip2* 遺伝子の発現がノックアウトマウスの筋サテライト細胞において異常に上昇していることがわかった。DNA メチル化を司る Dnmt3a という遺伝子を欠損したマウスにおいて、このような症状がみられたことから、この遺伝子と DNA メチ

ル化との関係が予測された。そこで、バイサルファイト法という DNA メチル化部位を解析する手法を用いて検討したところ、予測されたとおり、ノックアウトマウスから得られた筋サテライト細胞の *p57Kip2* 遺伝子近傍では本来あるべき DNA メチル化修飾が有意に減少していることが明らかになった。さらに、この *p57Kip2* 遺伝子の異常な発現上昇を抑えてやると、サテライト細胞の増殖が一部回復することを見出した。

すなわち、Dnmt3a は *p57Kip2* の発現調節を介して骨格筋幹細胞の増殖を制御し骨格筋の再生を制御する一因となっていると考えられた。以上、エピジェネティックスレベルでの筋分化・再生の分子機序の一部を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Inui M, Mokuda S, Sato T, Tamano M, Takada S, Asahara H. Dissecting the roles of miR-140 and its host gene. *Nat Cell Biol*. 査読有、2018 in press.

DOI: 10.1038/s41556-018-0077-4

Kataoka K, Matsushima T, Ito Y, Sato T, Yokoyama S, Asahara H. Bhlha9 regulates apical ectodermal ridge formation during limb development. *JBMM*. 査読有、2018 Jan;36(1):64-72. doi: 10.1007/s00774-017-0820-0.

DOI: 10.1007/s00774-017-0820-0.

Asahara H, Inui M*, Lotz M*. Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. *JBMR*. 査読有、2017 Sep;32(9):1773-1782. Review. doi: 10.1002/jbmr.3199.

Yokoyama S, Furukawa S, Kitada S, Mori M, Saito T, Kawakami K, Izpissua Belmonte JC, Kawakami Y, Ito Y, Sato T, Asahara H. Analysis of transcription factors expressed at the anterior mouse limb bud. *PLoS One*. 査読有、2017 May 3;12(5):e0175673. doi: 10.1371/journal.pone.0175673.

Ito Y, Inoue A, Seers T, Hato Y, Igarashi A, Toyama T, Taganov K, Boldin M, Asahara H. Identification of targets of tumor suppressor microRNA-34a using a reporter library system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、2017, Apr 11;114(15):3927-3932. doi: 10.1073/pnas.1620019114.

Naoki Koda, Tempei Sato, Masahiro Shinohara, Shizuko Ichinose, Yoshiaki Ito, Ryo Nakamichi, Tomohiro Kayama, Kensuke Kataoka, Hidetsugu Suzuki, Keiji Moriyama, Hiroshi Asahara. Mohawk transcription factor regulates homeostasis of the

periodontal ligament. Development. 査読有、2017 Jan 15;144(2):313-320. doi: 10.1242/dev.135798. Epub 2016 Dec 19.

Suzuki H, Ito Y, Shinohara M, Yamashita S, Ichinose S, Kishida A, Oyaizu T, Kayama T, Nakamichi R, Koda N, Yagishita K, Lotz M, Okawa A, Asahara H. Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有、2016 Jul 12;113(28):7840-5. doi: 10.1073/pnas.1522054113.

Naito M, Mori M, Inagawa M, Miyata K, Hashimoto N, Tanaka S, Asahara H. Dnmt3a Regulates Proliferation of Muscle Satellite Cells via p57Kip2. PLoS Genet. 査読有、2016 Jul 14;12(7):e1006167. doi: 10.1371/journal.pgen.1006167.

Nakamichi R, Ito Y, Inui M, Onizuka N, Kayama T, Kataoka K, Suzuki H, Mori M, Inagawa M, Ichinose S, Lotz M, Sakai D, Masuda K, Ozaki T, Asahara H. Mohawk promotes the maintenance and regeneration of the outer annulus fibrosus of intervertebral discs. Nat Commun. 査読有、2016 Aug 16;7:12503. doi: 10.1038/ncomms12503.

Kayama T, Mori M, Ito Y, Matsushima T, Nakamichi R, Suzuki H, Ichinose S, Saito M, Marumo K, Asahara H. Gtf2ird1-dependent Mohawk (Mkx) expression regulates mechanosensing properties of tendon. Mol Cell Biol. 査読有、2016 Mar 31;36(8):1297-309. doi: 10.1128/MCB.00950-15. Print 2016 Apr 15.

〔学会発表〕(計 30 件)

Hiroshi Asahara, The completely automated ChIP system performed by LabDroid "Maholo", Robotics and Semantic Systems for Biology (RSSB) 2, 2018

浅原弘嗣、腱特異的転写因子 Mxk を介した腱の発生と再生、第 56 回日本生体医工学会大会、2017

浅原弘嗣、片岡健輔、中道亮、鈴木英嗣、内藤昌志、望月祐輔、幸田直己、森雅樹、篠原正弘、伊藤義晃、嘉山智大、腱組織の恒常性維持と再生の分子メカニズムの解析、第 2 回日本骨免疫学会、2016

Hiroshi Asahara, Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis, Stem Cell, Growth Factor Signaling and Bone Biology, 2016

片岡健輔、伊藤義晃、千葉朋希、中道亮、嘉山智大、浅原弘嗣、腱マスター転写因子 Mxk はメカノストレスに応答し腱組織の恒常性を維持する、第 2 回日本筋学会学術集会、2016

浅原弘嗣、DNA methylation と筋分化、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016

浅原弘嗣、転写因子 Mxk による腱・靭帯の恒常性の制御と再生医学への応用、「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法の開発」武田班班会議、2016

浅原弘嗣、Rp58 と Mxk による筋・腱・靭帯の形成機構、第 1 回日本筋学会学術集会、2015
内藤昌志、森雅樹、田中栄、浅原弘嗣、正常な骨格筋分化には筋前駆細胞における de novo DNA メチル化が必要である、第 1 回日本骨免疫学会、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 システム発生・再生医学分野
<https://www.tmdusystemsbionmedicine.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅原 弘嗣 (ASAHARA, Hiroshi)
東京医科歯科大学、大学院医歯学総合研究科、教授
研究者番号：70294460

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()