

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19603

研究課題名（和文）筋分化をモデルとしたde novo DNAメチル化の誘導分子機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of myogenesis via de novo DNA methylation

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：筋分化の研究領域は、転写因子MyoDという世界初のマスター因子の発見以来、発生・再生研究をリードしてきた。さらに、我々は、抑制性転写因子Rp58が、筋分化の遺伝子ネットワークの要となること、DNAメチル化がエピゲノム情報として記憶されることによって筋の発生と再生に必須であることを報告してきた。これらを基盤に、本研究では、筋分化におけるRp58のDNAメチル化を伴った、細胞運命決定のメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生・発達におけるDNAメチル化は、エピゲノム情報として、細胞の運命を決定するが、その詳細なメカニズムはまだ不明な点が多い。我々はその鍵を握る遺伝子として、転写抑制因子Rp58とDNAメチル化酵素の相互関係に注目し、筋分化・再生の分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。この成果は、今後、筋疾患の病態解明や治療への応用をはじめ、広く、体の恒常性維持、組織再生、発がんなど多くの医学・生物学研究の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The muscle differentiation has been a model for developmental and regenerative research since the discovery of the world's first master factor, the transcription factor MyoD. Furthermore, we have reported that the repressive transcription factor Rp58 is a key component of the gene network for muscle differentiation and that DNA methylation is essential for muscle development and regeneration as epigenomic information. On the basis of these findings, the present study clarified the mechanism of cell fate determination involving DNA methylation of Rp58 in muscle differentiation.

研究分野：分子生物学、発生・再生医学、整形外科学、リウマチ学

キーワード：筋分化 DNAメチル化 DNMT3A Rp58 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生・分化における de novo DNA メチル化の分子機構

個体の発生において、遺伝子の発現プログラムが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、細胞は集団および個体としてのシステムを構築する。なかでも新たなDNAのメチル化修飾の誘導、すなわち de novo DNA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(Where)、どのタイミングで(When)、どのような分子機序でリクルートされるか(How)、についてまだ多くの部分が明らかでない(図1)。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、発がんなど多くの医学・生物学研究の基盤となる課題である。

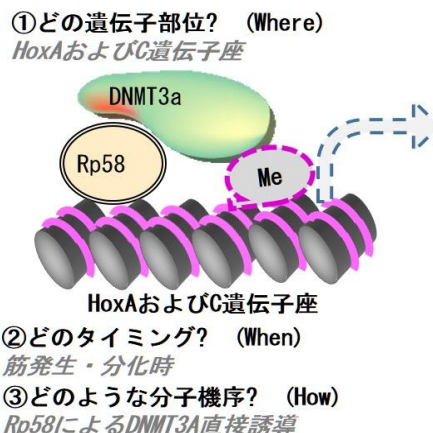


図1 Rp58 を介した de novo DNA メチル化のモデル

(2) 筋発生・分化における Rp58 を介した遺伝子ネットワークと de novo DNA メチル化

筋分化の研究領域は、転写因子 MyoD という世界初のマスター因子の発見以来、発生・再生研究をリードしてきた。さらに、筋分化をモデルに、細胞運命決定のメカニズムを明らかにするため、我々はホルマウントインサイチュールハイブリダイゼーション(WISH)をほぼすべての転写因子・転写コファクターに行い胎児発生期の遺伝子発現データベースを作成した。その結果として、抑制性転写因子 Rp58 が、筋分化の遺伝子ネットワークの要となることを世界に先駆けて発表した(図2; Yokoyama et al, *Dev Cell* 2009)。さらに、我々は、DNMT3A と DNMT3B の筋および筋サテライト細胞(筋組織における幹細胞)特異的のノックアウトマウスを作成することで、de novo DNAメチル化が筋の発生と再生に必須であることを世界で最初に報告している(Naito et al, *PLoS Genet* 2016)。また、ヒト筋芽細胞の分化系においてゲノムワイドなメチル化の解析を行ったところ、DNAメチル化の亢進が Rp58 の認識部位に、特異的かつダイナミックにおこっていることを発見した(Miyata et al, *Hum Mol Genet* 2015)。

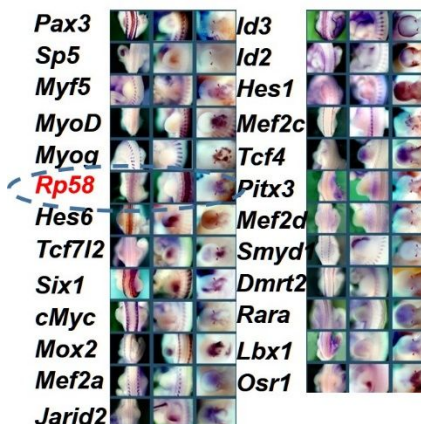


図2 WISH データベースから Rp58 を同定

2. 研究の目的

de novo DNAメチル化は、多くが初期発生期におこり、組織特異的な de novo DNAメチル化領域は比較的限局されていると考えられている。我々は筋特異的な DNMT3A のノックアウトマウスの筋組織の de novo DNAメチル化部位をゲノムワイドに探索した。Rp58 がヘテロクロマチン領域に局在する転写リプレッサーであり、DNMT3a 結合能力があるという報告と合わせると、Rp58 を介した筋分化のモデルは、de novo DNAメチル化の本質に迫る分子機構であると考えられる(図1)。

さらに、Rp58 が筋分化において、de novo DNAメチル化を介して必須の機能を果たす仮説を検証するため、Rp58 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、筋細胞特異的な Cre マウスと交配させたところ、この遺伝子改変マウスでは、筋組織の分化が著しく阻害されていることが確認された。今後、本研究成果を基に、さらに、筋組織のエピジェネティックスレベルでの分化機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) Rp58 の欠損による筋分化阻害の検討：Rp58 のコンディショナルノックアウトマウス (Rp58CK0; Rp58^{fl/fl}) を作成し、筋細胞特異的な Cre マウスと交配させた遺伝子改変マウス (Myogenin-Cre; Rp58^{fl/fl}) において、組織染色、遺伝子発現解析などの筋のフェノタイプ解析を行う。

(2) Rp58 による de novo DNA メチル化機構の解明： de novo DNA メチル化は、多くが初期発生期におこり、組織特異的な de novo DNA メチル化領域は比較的限局されていると考えられている。そこで、筋特異的な DNMT3A のノックアウトマウスの筋組織における de novo DNA メチル化部位をゲノムワイドに探索し、筋分化にともなう de novo DNA メチル化領域を同定し、この領域内の Rp58 結合サイトを検討する。

(3) 筋特異的な DNMT3A のノックアウトマウスとの比較解析：筋特異的な DNMT3A のノックアウトマウスと、Rp58 ノックアウトマウスの筋組織のフェノタイプを比較検討し、発生時期特異的な遺伝子発現ネットワークの差異とともに、筋組織における de novo DNA メチル化部位を解析、de novo DNA メチル化と Rp58 結合サイトとの関連を検討する。

(4) Rp58 と Dnmt3a の筋分化における相互作用：Rp58 と Dnmt3a の筋分化における DNA 結合部位を、時間軸にそって明らかにするため、タグをノックインしたマウス個体を作成し、個体から得られる、筋発生分化の各ステージにおけるクロマチン免疫沈降および次世代シーケンサーを用いた解析を行うことで、Rp58 と Dnmt3a それぞれの DNA 結合様式を検討する。さらに、Rp58 と Dnmt3a の共免疫沈降を行い、これら分子の結合様式を詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) Rp58 の骨格筋分化における機能を検討する為に、骨格筋特異的な発現を示す Myf5 を Cre recombinase の driver として用いた Rp58 flox マウスを作成したところ、Rp58 flox; Myf5-Cre マウス (Rp58 cK0 マウス) は出生後直ちに死亡し (11 匹中 11 匹死亡)、HE 染色で骨格筋が正常に形成されないことが確認された。骨格筋組織を用いた Real time PCR では、cK0 マウスで Hoxa および Hoxc 遺伝子の発現は、Hoxa9, Hoxc6 が cK0 マウスで亢進していた。この組織から抽出した DNA を用いて bisulfite sequence を行ったところ、HoxC6 の周囲の領域の DNA メチル化が cK0 マウスで低下していた。

(2) マウス ES 細胞を用いた Hox 遺伝子座における Rp58 結合領域の DNA メチル化への影響を検討するため、マウス ES 細胞からの筋分化の系において、Rp58 のリクルートと de novo DNA メチル化のタイミングを時系列で解析、更に、Rp58 結合サイトに、dCas9 をリクルートすることで Rp58 の結合を阻害させた時の DNA メチル化および遺伝子の発現、更に筋分化への影響を検討した。この時、ヒストンの修飾マーカーも ChIP-seq によって解析し、ヒストン修飾と DNA メチル化の関係についても検証した。

(3) マウス個体レベルでの DNA メチル化誘導領域の解析：Rp58 と Dnmt3a の筋分化における DNA 結合部位を、時間軸にそって明らかにするため、DNMT3A および Rp58 の 5' に HA タグを CRISPR/Cas9 を用いてノックインしたマウス個体を作成し、十分な個体数を得た。これらマウスを用いて、筋組織の発生段階に特異的な Rp58 と Dnmt3a それぞれのターゲットとなる遺伝子を同定、さらにトランスクリプトーム情報と合わせて解析することで、Rp58 および Dnmt3a による遺伝子発現制御機構を検討した。さらに、Rp58 および Dnmt3a に会合するタンパク複合体を解析した。

(4) マウス ES 細胞を用いた Hox 遺伝子座における Rp58 結合領域の DNA メチル化への影響：マウス ES 細胞からの筋分化の系において、Rp58 のリクルートと de novo DNA メチル化のタイミングを時系列で解析した。その結果、Hox 遺伝子座の中で Hoxc 領域および Hoxa 領域の中に Rp58 および DNMT3a によって特異的にメチル化制御が行われている候補を見出すことが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mokuda Sho, Nakamichi Ryo, Matsuzaki Tokio, Ito Yoshiaki, Sato Tempei, Miyata Kohei, Inui Masafumi, Olmer Merissa, Sugiyama Eiji, Lotz Martin, Asahara Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Wwp2 maintains cartilage homeostasis through regulation of Adamts5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-10177-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakamichi Ryo, Asahara Hiroshi	4. 巻 3
2. 論文標題 The transcription factors regulating intervertebral disc development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JOR SPINE	6. 最初と最後の頁 e1081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsp2.1081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mitsumura Takahiro, Ito Yoshiaki, Chiba Tomoki, Matsushima Takahide, Kurimoto Ryota, Tanaka Yoko, Kato Tomomi, Uchida Keisuke, Ito Takashi, Yamamoto Kouhei, Eishi Yoshinobu, Kitagawa Masanobu, Miyazaki Yasunari, Inase Naohiko, Asahara Hiroshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Ablation of miR-146b in mice causes hematopoietic malignancy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 3483 ~ 3491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018017954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mochizuki Yusuke, Chiba Tomoki, Kataoka Kensuke, Yamashita Satoshi, Sato Tempei, Kato Tomomi, Takahashi Kenji, Miyamoto Takeshi, Kitazawa Masashi, Hatta Tomohisa, Natsume Tohru, Takai Shinro, Asahara Hiroshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Combinatorial CRISPR/Cas9 Approach to Elucidate a Far-Upstream Enhancer Complex for Tissue-Specific Sox9 Expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 794 ~ 806.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2018.07.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamichi Ryo, Kataoka Kensuke, Asahara Hiroshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Essential role of Mohawk for tenogenic tissue homeostasis including spinal disc and periodontal ligament	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 933 ~ 940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1466644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inui Masafumi, Mokuda Sho, Sato Tempei, Tamano Moe, Takada Shuji, Asahara Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Dissecting the roles of miR-140 and its host gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 516 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-018-0077-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 浅原弘嗣	4. 巻 28
2. 論文標題 ～運動器から健康と加齢を俯瞰する～	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊誌 CLINICAL CALCIUM	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中道亮、片岡健輔、浅原弘嗣	4. 巻 28
2. 論文標題 靭帯再生医療の現状と展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 月刊誌 CLINICAL CALCIUM	6. 最初と最後の頁 809-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松島 隆英, 浅原 弘嗣	4. 巻 61
2. 論文標題 ゲノム編集のヒトへの応用の展望と問題点	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 リウマチ科	6. 最初と最後の頁 191-196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計27件 (うち招待講演 17件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 miRNAs in arthritis pathogenesis and therapy
3. 学会等名 2019 Keystone Symposia Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 システムアプローチによる関節疾患・先天性骨系統疾患の診断と治療法の開発
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原弘嗣、茂久田翔、伊藤義晃、中道亮、杉山英二、松崎時夫
2. 発表標題 Wwp2 maintains cartilage homeostasis through regulation of Adamts5
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 システムアプローチによる関節疾患・先天性骨系統疾患の診断と治療法の開発
3. 学会等名 第23回小児分子内分泌研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Lecture I “ Cartilage homeostasis and arthritis pathogenesis via RNA regulation ”
3. 学会等名 16th Meeting of Bone Biology Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Characterization of a novel Sox9 enhancer and down-stream targets with implications in Arthritis parthenogenesis and therapeutics.
3. 学会等名 SOX meeting2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 腱マスター転写因子 Mxx とメカニカルストレスによる人工腱様組織形成
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 リウマチ・関節炎を制御するmiRNA
3. 学会等名 第6回ベーシックリサーチカンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 RNA結合タンパクのシステムティックな機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Homeostasis of tendons and ligaments connecting musculoskeletal systems
3. 学会等名 Japan Bone Academy2019(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Mechano-signal on tendon and ligament homeostasis via Mxx
3. 学会等名 International Symposium on AMED "Mechanobiology" Project(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 ゲノム編集技術によって初めて露わにされる生命科学
3. 学会等名 日本オミックス医療学会シンポジウム「ゲノム編集に基づく医療の到来」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 遺伝子の織り成す旋律を採譜するには
3. 学会等名 東京医科歯科大学ピアノの会 第21回市民フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 RNA階層における炎症とがんの病態制御
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原弘嗣、伊藤義晃
2. 発表標題 マイクロRNAによる変形性関節症の病態解明と医療応用
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉朋希、浅原弘嗣
2. 発表標題 長鎖非コードRNAによる炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 骨と軟骨と腱・靭帯の織りなす生理と病理
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡健輔、千葉朋希、伊藤義晃、中道亮、鈴木英嗣、嘉山智大、浅原弘嗣
2. 発表標題 腱マスター転写因子Mkxとメカニカルストレスに依存した人工腱様組織の作製
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 腱・靭帯の分子ネットワークの解明と再生医療への応用
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Transcriptional and translational regulation of musculoskeletal development and arthritis pathogenesis.
3. 学会等名 Marc Montminy's 62nd Birthday Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 miRNAs in arthritis pathogenesis and therapy
3. 学会等名 JAJ RNA 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Mechano-signal pathway regulating tendon and ligament via Mxk
3. 学会等名 ORS Tendon Section 2018 Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 骨と骨にまつわる組織の発生と保護と再生
3. 学会等名 第25回徳島骨代謝研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡健輔、千葉朋希、伊藤義晃、加藤真理子、河村峻太郎、中道亮、浅原弘嗣
2. 発表標題 腱マスター転写因子Mkxとメカニカルストレスによる人口腱様組織の作製
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅原弘嗣
2. 発表標題 miRNAs in arthritis pathogenesis and therapy
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium on BioSciences
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Genome dynamics for chondrogenesis and miRNAs for cartilage homeostasis via Sox9
3. 学会等名 Cartilage GRC 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Asahara
2. 発表標題 Mechano-property of tendon/ligament and its application to regenerative medicine
3. 学会等名 FAOPS2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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.tmdusystemsbiomedicine.com/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------