

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659468

研究課題名（和文） 骨格筋におけるDNAメチル化標的遺伝子の同定と医学応用

研究課題名（英文） Identification of target genes for DNA methylation in skeletal muscle and its medical application

研究代表者

小川 佳宏 (OGAWA YOSHIHIRO)

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：70291424

研究成果の概要（和文）：

DNAメチル化は代表的なエピジェネティクス制御の様式であり、個体の初期発生や癌抑制遺伝子の発現制御などにおいて精力的に研究されている。しかしながら、正常の成体組織あるいは肥満や糖尿病などの成人期に発症する慢性疾患における生理的・病態生理的意義は不明である。本研究は、従来、全く知見のなかったDNAメチル化に着目した骨格筋代謝のエピジェネティクス制御による医学応用を目指すものである。本研究では、*de novo*（新規）メチル化酵素Dnmt3aのflox/floxマウスと、 $\alpha$ アクチンプロモーターによりCREリコンビナーゼを骨格筋特異的に発現させたトランスジェニックマウスを交配し、Dnmt3aの骨格筋特異的欠損マウスを作出した。qPCR法により組織別のDnmt3aの遺伝子発現を検討したところ、Dnmt3aの骨格筋特異的な発現抑制が観察された。MIAMI法（Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers）（Oncogene 25: 3059-3064, 2006）により、Dnmt3a欠損マウス骨格筋のDNAメチル化プロファイルを網羅的に検討したところ、野生型マウスの骨格筋と比較して、数十の遺伝子において顕著なDNAメチル化レベルの減少が認められた。複数の遺伝子については、バイサルファイト法によりDNAメチル化変化を確認した。メチル化減少した遺伝子のバイオインフォマティクス解析により、転写抑制因子類をコードしているものが多く認められ、DNAメチル化標的遺伝子である可能性が示唆された。一方、DNAメチル化変化と遺伝子発現変化に明らかな相関は認められなかった。DNAメチル化標的遺伝子の発現と骨格筋の代謝表現型の変化の検討により、DNAメチル化を標的とする医学応用への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：

DNA methylation is essential for normal embryonic development, and altered DNA methylation patterns have been implicated in tumorigenesis. An epigenetic mechanism involving DNA methylation has also been suggested to be involved in the regulation of metabolic processes; however, the molecular basis of this mechanism has not been clearly demonstrated. In this study, we attempted to get an insight into the role of DNA methylation in skeletal muscle, which plays important roles in exercise, energy expenditure and glucose metabolism. We made skeletal muscle-specific knockout (KO) mice with Dnmt3a (a *de novo* DNA methyltransferase highly expressed in skeletal muscle) by crossing Dnmt3a flox/flox mice and transgenic mice expressing Cre recombinase, driven by the skeletal muscle alpha-actin promoter. A quantitative real-time PCR analysis confirmed that Dnmt3a mRNA levels were markedly diminished in the skeletal muscle but not in other tissues of the KO mice. In this study, a genome-wide DNA methylation analysis called Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers (MIAMI) was performed using the methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII* and a genome microarray. MIAMI analysis revealed a marked decrease in DNA methylation in the KO mice, including that of several genes coding transcription factors. Despite this, the decreased DNA methylation did not correlate with the gene expression levels under the same condition. Because DNA methylation is considered a key epigenetic contributor in the maintenance of gene silencing, gene expression in the KO mice may be modified in the presence of additional metabolic stress. Therefore, analysis of metabolic phenotype of the KO mice will be essential to elucidate the epigenetic regulation of skeletal muscle

gene expression and skeletal muscle-related metabolic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：骨格筋、DNA、メチル化、エピジェネティクス、生活習慣病、遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

マウス線維芽細胞C3H10T1/2を5-アザシチジンで処理することにより、グローバルな脱メチル化に伴って筋細胞分化が促進することが報告され (**Cell** 17:771-779, 1979)、この分化誘導系を用いて、筋分化誘導マスター制御因子 myogenic differentiation 1 (MyoD) が同定された (**Cell** 51:987-1000, 1987)。しかしながら、MyoDを含む筋細胞分化特異的遺伝子と DNA メチル化の関連の詳細は全く不明である。一方、2 型糖尿病患者の骨格筋において PGC-1 $\alpha$  のプロモーターの非 CpG 領域のメチル化とミトコンドリア量の逆相関が最近報告されているが (**Cell Metab.** 10:189-198, 2009)、成体の骨格筋における DNA メチル化の変動の生理的・病態生理的意義は不明である。研究代表者はこれまでに、絶食により萎縮した骨格筋において DNA メチル化酵素のうち新規 DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferase 3a; Dnmt3a) の遺伝子発現の減少と DNA 脱メチル化を促進する growth arrest and DNA damage 45 $\alpha$  (Gadd45 $\alpha$ ) (**Cell** 135:1201-1212, 2008) の増加を見出した。

### 2. 研究の目的

DNA メチル化は代表的なエピジェネティクス制御の様式であり、個体の初期発生や癌抑制遺伝子の発現制御などにおいて精力的に研究されている。しかしながら、正常の成体組織あるいは肥満や糖尿病などの成人期に発症する慢性疾患における生理的・病態生理的意義は不明である。本研究は、従来、全く知見のなかった DNA メチル化

に着目した骨格筋代謝のエピジェネティクス制御による医学応用を目指すものである。本研究では、骨格筋における DNA メチル化プロファイルを明らかにするとともに、*de novo* (新規) メチル化酵素 Dnmt3a の骨格筋特異的欠損マウスを作成し、「DNA メチル化標的遺伝子」を同定し、DNA メチル化を標的とした医学応用の可能性の検証を試みた。

### 3. 研究の方法

#### Dnmt3a 骨格筋特異的 KO マウスの作成

Dnmt3a flox/flox マウス (**Nature** 429:900-901, 2004) は理化学研究所岡野正樹博士より供与いただいた。Cre リコンビナーゼを骨格筋特異的に発現させる遺伝子改変マウスは、 $\alpha$  アクチンプロモーターの下流に Cre cDNA およびポリ A 付加シグナルを加えたプラスミド DNA を用いてトランスジェニックマウスを作成した。そして、Dnmt3a flox/flox マウスとアクチン Cre マウスを交配させ、産仔をジェノタイプングした。qPCR 法により組織別の Dnmt3a の遺伝子発現を検討したところ、Dnmt3a の骨格筋特異的な発現抑制が観察された。

#### 網羅的 DNA メチル化法の確立

本研究では、網羅的な DNA メチル化解析法である MIAMI 法 (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by IsoSCHIZOMERS) (**Oncogene** 25:3059-3064, 2006) を用いた。ゲノム DNA をメチル化感受性酵素 HpaII および非感受性酵素 MspI で処理、アダプター添加後、PCR 増幅し、

プロモーターゲノム DNA アレイとハイブリダイゼーションさせて、DNA メチル化の有無によるシグナルの変化を比較した。

#### マイクロアレイによる発現パターンの変化

Dnmt3a 骨格筋 KO マウスおよび野生型コントロールマウスの骨格筋より RNA を調製した。逆転写反応および Cy3-CTP の取り込み後、マウス cDNA アレイとハイブリダイゼーションし、遺伝子発現変化を計測した。得られた結果はバイオインフォマティクス的手法を用いて解析した。すなわち、Dnmt3a 骨格筋 KO マウスの骨格筋における遺伝子発現プロフィールを検討し、プロモーター領域の DNA メチル化の変動と遺伝子発現の変化が逆相関する「DNA メチル化標的遺伝子」の同定を試みた。

#### 骨格筋代謝に関する検討

Dnmt3a 骨格筋 KO マウスについてエネルギー代謝に関する表現型（血中パラメーター、糖脂質代謝、体組成）を解析した。そして、骨格筋においてエネルギー代謝制御に関連する DNA メチル化標的遺伝子の同定と生活習慣病における DNA メチル化の病態生理的意義の解明を目指した。

#### 4. 研究成果

**MIAMI法による DNA メチル化変化の解析**  
野生型コントロールマウスと比較し、Dnmt3a 骨格筋 KO マウスでは約 50 の遺伝子で顕著な DNA メチル化の減少が観察された。複数の遺伝子については、バイサルファイト法により DNA メチル化変化を確認した。DNA メチル化が増加した遺伝子は無かった。この結果から、Dnmt3a により、ある特定の遺伝子群が DNA メチル化制御を受けることが示唆された。また、バイオインフォマティクス解析により、これらには転写調節に関わる遺伝子が多く含まれることが判明した。

#### 骨格筋における DNA メチル化標的遺伝子の同定と機能解析

本研究では、Dnmt3a 骨格筋 KO マウスにおいて DNA メチル化が著しく減少した遺伝子に焦点を当てて、DNA メチル化標的遺伝子を絞り込み、骨格筋における機能解析を試みた。すなわち、cDNA 発現マイクロアレイ法により、Dnmt3a 骨格筋 KO マウスの骨格筋における遺伝子発現プロフィールを検討し、プロモーター領域の DNA メチル化の変動と遺伝子発現の変化が逆相関する「DNA メチル化標的遺伝子」の同定を試みた。しかしながら、DNA メチル化変化と、遺伝子発現変化には明らかな相関（正あるいは負）は観られなかった。これまで考えられてきた「DNA メチル化＝遺伝子発現減少」という単純な図式に加え、何らかの付加的な制御機構が存在することが示唆された。

#### Dnmt3a 骨格筋 KO マウスの代謝表現型

糖代謝（糖負荷試験、インスリン抵抗性試験）および体組成、体重、筋重量は野生型コントロールと比べ KO マウスで顕著な差は観られなかった。DNA メチル化と筋細胞の分化の関係は 1980 年代より指摘されており、今後、筋分化に及ぼす影響を検討すべきであると考えられる。

#### 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 4 件）

1. M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice

and humans. **Diabetes** 60: 819-826, 2011.

2. M. Tanaka, T. Suganami, M. Kim-Saijo, C. Toda, M. Tsuiji, K. Ochi, Y. Kamei, Y. Minokoshi, Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B cell development. **J. Neurosci.** 31: 8373-8380, 2011.

3. S. Sugita, Y. Kamei, F. Akaike, T. Suganami, S. Kanai, M. Hattori, Y. Manabe, N. Fujii, T. Takai-Igarashi, J. Oka, H. Aburatani, T. Yamada, H. Katagiri, S. Kakehi, Y. Tamura, S. Takasuga, T. Sasaki, H. Kubo, K. Nishida, S. Miura, O. Ezaki, Y. Ogawa. Metabolic analysis of transgenic mice overexpressing RXR  $\gamma$  in skeletal muscle: increased glucose tolerance and suppression of obesity-induced fatty liver. **PLoS ONE** 6: e20467, 2011.

4. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. **Am. J. Pathol.** 179: 2454-2463, 2011.

[学会発表] (計4件)

1. 小川佳宏: 「エピジェネティクス機構による細胞制御と病態」: ネスレ栄養科学会議, 2011.5.14, 東京
2. Yoshihiro Ogawa: Epigenetic Modifications Underlying Insulin Resistance : THE ENDOCRINE SOCIETY' S 93RD ANNUAL MEETING & EXPO(ENDO2011), 2011.6.4-7, Boston
3. Yoshihiro Ogawa: Epigenetic Regulation of Metabolic Diseases : THE ENDOCRINE SOCIETY' S 93RD ANNUAL MEETING & EXPO(ENDO2011), 2011.6.4-7, Boston
4. 小川佳宏: 「メタボリックシンドロームと慢性炎症」: 熊本大学最先端・次世代研究開発プログラム キックオフシンポジウム 特別講演, 2011.6.30, 熊本

[図書] (計1件)

小川佳宏等: 「栄養とエピジェネティクス」  
建帛社

[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

<http://www.tmd.ac.jp/mri/prm/index.html>

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 小川佳宏  
研究者番号 : 70291424

(2) 研究分担者 無し  
研究者番号 :

(3) 連携研究者 無し  
研究者番号 :