

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 30 年 5 月 11 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科
メタボ先制医療講座
職 名 寄附講座准教授
研究代表者 橋本 貢士

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 17014)

1. 共同研究課題名	Fibroblast Growth Factor (FGF)21 遺伝子の DNA メチル化状態の機能的意義の解明			
2. 共同研究目的	FGF21 遺伝子への DNA 脱メチル化を、CRISPR-dCAS9-TET1 CD 系を用いて人工的にマウス肝臓由来の株細胞およびマウス肝臓に導入し、単一の糖脂質代謝関連遺伝子の DNA メチル化状態の改変が、細胞内の遺伝子発現および、生体における代謝表現型にどのような影響を及ぼすかを解析する。単一の糖脂質代謝関連遺伝子のエピゲノム修飾がもつ生理的、機能的意義を明らかにすることを目的とする。			
3. 共同研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 橋本 貢士	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 メタボ先制医療講座	寄附講座 准教授	研究計画の立案、総括とその実施 および研究計画全体の 推進、論文作成	
(分担研究者) 袁 勳梅	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子細胞代謝学分野	特任助教	研究計画の遂行	
榛澤 望	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子内分泌代謝学分野	大学院生	研究計画の遂行	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	ゲノム科学リソース分野	氏 名	畑田出穂

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:17014)

6. 共同研究計画

本研究では、ゲノム科学リソース分野の畑田教授（共同研究担当教員）のグループが最近開発された、塩基配列特異的に人工的 DNA 脱メチル化を導入しうる CRISPR-dCAS9-TET1CD 系 (*Nat Biotechnol* 34:1060-1065, 2016) を用いて、FGF21 遺伝子特異的に DNA 脱メチル化を導入する。まずマウス肝臓由来の株細胞である Hepa1-6 細胞に CRISPR-dCAS9-TET1CD 系によって、マウス FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化が導入できるかを検証する。FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化の導入が、Hepa1-6 細胞の遺伝子発現にどのような影響を与えるかを検討したのち、C57/B6 マウスの肝臓において CRISPR-dCAS9-TET1CD 系により、FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化を導入する。この「遺伝子特異的エピゲノム変化導入マウス」に高脂肪食摂餌を含む環境変化を負荷し、同遺伝子の DNA メチル化状態が生体の代謝表現型に与える影響を検討する。

7. 共同研究の成果

マウス肝細胞株 Hepa1-6 に、マウス FGF21 遺伝子特異的なガイド RNA をもち GFP 標識した CRISPR-dCas9-TET1CD を導入した。FACS で GFP 陽性細胞を回収（ソーティング）した上で、バイサルファイトシークエンス法を用いて DNA メチル化状態を検討し、FGF21 遺伝子発現の変化を解析した。その結果、Hepa1-6 において CRISPR-dCas9-TET1CD により FGF21 遺伝子特異的に DNA 脱メチル化が導入された（DNA メチル化率 96%→60.8%）。また GFP 発光が持続するソーティング後 96 時間まで、DNA 脱メチル化状態は維持された。対照細胞と比較して、DNA 脱メチル化状態を導入した細胞では、FGF21 遺伝子発現の増加を認めなかったが、Peroxisome proliferator activator receptor (PPAR) α アゴニストである K-877 (50 μ M) を 48 時間添加すると FGF21 遺伝子発現は有意に上昇した。以上の通り、CRISPR-dCas9-TET1CD によって FGF21 遺伝子特異的 DNA 脱メチル化を導入した細胞系を構築し、PPAR α リガンド添加によって、対照細胞と比較して FGF21 遺伝子発現が上昇することを確認した。研究成果の一部を 2017 年度生命科学系学会合同年次大会で発表した。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

Yuan X, Tsujimoto K, Hashimoto K, Kawahori K, Hanzawa N, Hamaguchi M, Seki T, Nawa M, Ehara T, Kitamura Y, Hatada I, Konishi M, Itoh N, Nakagawa Y, Shimano H, Takai-Igarashi T, Kamei Y, Ogawa Y: Epigenetic modulation of *Fgf21* in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. *Nat Commun* 9:636, 2018

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし