

様式3

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 31 年 4 月 9 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30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 系を用いて人工的にマウス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30年 4月 1日 ~ 平成31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。

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-TET1系(*Nat Biotechnol.* 34:1060-1065, 2016)を用いて、Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 遺伝子特異的にDNA脱メチル化を導入する。平成29年度は、マウス肝臓由来の株細胞であるHepal-6細胞にCRISPR-dCAS9-TET1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こと明らかにした。さらにFGF21遺伝子特異的なDNA脱メチル化の導入は、Hepal-6細胞全体の遺伝子発現に大きな影響を与えないこともDNAマイクロアレイで確認した。平成30年度は、FGF21遺伝子特異的なDNA脱メチル化の導入が、同遺伝子の発現にどのような影響を与えているのかを検討した。またC57/B6BLマウスの肝臓においてCRISPR-dCAS9-TET1系により、FGF21遺伝子特異的なDNA脱メチル化を導入することを試みた。

7. 共同研究の成果

Hepal-6細胞にFGF21遺伝子特異的なガイド(g)RNAを持ったCRISPR-dCAS9-TET1系を導入したところ、非特異的なscramble gRNAを持ったものと比較して、有意にDNA脱メチル化を導入しえた(DNAメチル化率: scramble群: FGF21遺伝子特異的群=96.5%:62.7%)。しかしFGF21遺伝子発現は定常状態では、両群に有意な差を認めず、核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α の人工アゴニストであるK-877を添加すると、scramble群と比較してFGF21遺伝子特異的群において有意な発現上昇を認めた。この結果により遺伝子のDNAメチル化状態の差は、発現刺激に対する遺伝子発現応答の差として反映されることが示唆された。

さらに我々はHydrodynamic Tail Vein injection (HTVi)法によって成獣期(生後8~10週齢)のC57/B6マウスの尾静脈からCRISPR-dCAS9-TET1系コンストラクトを注入することによって、肝臓でのCRISPR-dCAS9-TET1系の発現に成功した。HTVi法は生後7~8週齢のマウスの尾静脈から、体重あたり8~10%の核酸溶液を5~7秒で急速に注入するもので、水圧によって肝細胞の表面に孔を開けることで注入核酸を肝細胞内に押し込む。HTVi法は導入効率はウイルスと比較して低いが、プラスミドコンストラクトのまま導入できる利点がある。我々はFGF21遺伝子のDNAメチル化が十分になされているPPAR α ノックアウトマウスにHTVi法を用いてCRISPR-dCAS9-TET1系を肝臓に導入した。scramble群のDNAメチル化率89.9%に対して、FGF21遺伝子特異的群では77.6%と有意差を持ってDNA脱メチル化をFGF21遺伝子に導入することができた。この結果により、生体においても細胞と同様にCRISPR-dCAS9-TET1系によってFGF21遺伝子特異的なDNA脱メチル化を導入することが可能であることが明らかになった。これらの結果は、平成30年度の日本内分泌学会および日本糖尿病学会、日本肥満学会で発表を行なった(発表者: 榛澤 望)。

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
今年度はなし

②この共同研究に基づくとの記載のある論文
今年度はなし