

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

令和2年4月30日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 獨協医科大学埼玉医療センター
糖尿病内分泌・血液内科

職 名 主任教授

研究代表者 橋本 貢士

下記のとおり令和元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31年 4月 1日 ~ 令和 2 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	獨協医科大学埼玉医療センター 糖尿病内分泌・血液内科	主任教授	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 勲梅	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 脱メチル化を導入する 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 Hepa1-6 細胞に CRISPR-dCAS9-TET1 系によって、マウス FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化を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、Hepa1-6 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、Hepa1-6 細胞における 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 PPAR α ノックアウト(KO)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。平成31年度/令和元年度は、in vivo への 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。

7. 共同研究の成果(平成 29 年度～令和元年度のまとめ)

- 今回の共同研究で、我々は CRISPR-dCAS9-TET1 系によって in vitro および in vivo において FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化の導入に成功した。また本研究は特定の特異的な DNA 脱メチル化について、経時的な DNA メチル化パターンの変化を詳細に検討した初めての研究であり、本系によるエピゲノム編集の分子基盤を明らかにした。
- 我々の先行研究(Nat Commun 9:636, 2018)では乳仔期に一旦確立したマウス肝臓における FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態は成獣期まで維持されたが、本研究では細胞への transient transfection による FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化は維持されなかった。これは一時的な導入後に CRISPR-dCAS9-TET1 系ベクターが消失したためと考えられる。さらにこの DNA メチル化の再誘導に DNA メチル化酵素である Dnmt1、Dnmt3a が寄与していることを初めて明らかにし、人工的に生じた DNA 脱メチル化に対しては、Dnmt1、Dnmt3a によって DNA メチル化状態を恒常的に維持する仕組みが存在すると考えられた。
- これまで成獣でのエピゲノム編集はわずかしか報告されておらず、今回我々が PPAR α KO マウスの肝臓で FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化に成功したことは注目すべきことである。しかしこの DNA 脱メチル化は一過性であり、in vitro 同様ベクターが消失し Dnmt1、Dnmt3a が働くことで DNA メチル化状態が再誘導された可能性がある。
- また今まで原則的に、DNA 脱メチル化は定常状態の遺伝子発現を上昇させると考えられてきたが、FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化は in vitro および in vivo においても PPAR α 刺激に対する応答性の遺伝子発現を増加させた。このように FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態が刺激に対する遺伝子発現の反応応答性を規定しうることも FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化の導入によって明らかとなった。

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。)

学会発表:

1. 橋本 貢士:DOHaD 学説におけるエピゲノム記憶と DNA メチル化の機能的意義, 第 34 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 高崎, 2020 年,1 月
2. 橋本 貢士: CRISPR/dCas9 系による Fibroblast growth factor 21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化の導入, 日本ゲノム編集学会 第4回大会, 東京, 2019 年 6 月

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

Hanzawa N, Hashimoto K, Yuan X, Kawahori K, Tsujimoto K, Hamaguchi M, Tanaka T, Nagaoka Y, Nishina H, Morita S, Hatada I, Yamada T, Ogawa Y. Targeted DNA demethylation of the Fgf21 promoter by CRISPR/dCas9-mediated epigenome editing. Sci Rep.10:5181, 2020.

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

同上