

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

令和 3 年 4 月 30 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学  
職 名 教授  
研究代表者 小川 佳宏

下記のとおり令和2年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 20021 )

1. 共同研究課題名	エピゲノム記憶の担い手としての DNA メチル化の病態生理学的意義と医学応用			
2. 共同研究目的	胎生期～新生児期の栄養環境は DNA 塩基配列を変化させることなくゲノム上に記憶され(エピゲノム記憶)、成人期における生活習慣病の発症や進展と関連する。本研究ではマウスモデルを用いて出生後の肝臓の代謝機能の成熟過程における DNA メチル化の関与を明らかにする。またエピゲノム編集技術を用いて細胞・個体レベルにおける DNA メチル化の機能的意義を明らかにする。			
3. 共同研究期間	令和 2 年 4 月 1 日 ~ 令和 3 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) 小川 佳宏	九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学	教授	研究計画の立案と総括	
(分担研究者) 佐藤 直市	九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学	助教	研究計画に係る立案と実験・解析	
森永 秀孝	九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学	特任助教	研究計画に係る実験・解析	
横溝 久	研究計画に係る実験・解析	助教	研究計画に係る実験・解析	
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

① 肝細胞レベルにおけるエピゲノム記憶遺伝子の機能的意義の解明

先行研究によりエピゲノム記憶遺伝子として同定した Fgf21 の細胞レベルにおける機能的意義をエピゲノム編集技術(dCAS9-GFP-TET1CD システム)にて DNA メチル化を改変したマウス肝癌由来 Hepa1-6 細胞を作製し解析している。同様の手法を用いて多層オミクス解析により新たに同定したエピゲノム記憶遺伝子の機能的意義を解析する。

② 個体肝臓レベルにおけるエピゲノム記憶遺伝子の病態生理学的意義の解明

エピゲノム編集に必要なコンポーネントのプロモーターの直下流に 2 つの loxP で挟んだターミネーター配列 (polyA cassette) を挿入し、AAV ベクターにて CreAlb システムとエピゲノム記憶遺伝子を標的とした gRNA をマウス肝臓に共導入し、乳仔期を含む任意の時期に特定の遺伝子の DNA メチル化を改変できるモデル動物を作製する。作製したマウスの表現型を解析し、エピゲノム記憶遺伝子の病態生理学的意義を解明する。

7. 共同研究の成果

① 肝細胞レベルにおけるエピゲノム記憶遺伝子の機能的意義の解明

dCAS9-GFP-TET1CD システムにて Fgf21 の DNA メチル化を改変したマウス肝癌由来 Hepa1-6 細胞において定常状態では Fgf21 の遺伝子発現の変化は認めないが、PPAR $\alpha$  のリガンドを添加した際の Fgf21 の遺伝子発現レベルは DNA メチル化レベルと逆相関を認めた。これらの結果より単一遺伝子の DNA メチル化レベルは刺激因子に対する応答性を規定している可能性が考えられる。出生前後のマウス肝臓における遺伝子発現、DNA メチル化の経時的変化についての網羅的解析は終了しており、同定したエピゲノム記憶遺伝子の候補となる糖脂質代謝遺伝子において同様の解析を行い、DNA メチル化の機能的意義を解析したいと考えている。

② 個体肝臓レベルにおけるエピゲノム記憶遺伝子の病態生理学的意義の解明

エピゲノム編集に必要なコンポーネントのプロモーターの上流に 2 つの loxP で挟んだターミネーター配列 (polyA cassette) を挿入した発現プラスミドを作成し、Hepa1-6 細胞に遺伝子導入し、安定発現細胞株を作製した。作製した細胞に AAV ベクターを用いて Cre システムを導入することで、dCAS9-GFP-TET1CD システムが発現することを確認できており、PiggyBac システムを応用し作成した遺伝子コンポーネントを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製予定としている。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換 (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

1. X. Yuan, K. Tsujimoto, K. Hashimoto, K. Kawahori, N. Hanzawa, M. Hamaguchi, T. Seki, M. Nawa, T. Ehara, Y. Kitamura, I. Hatada, M. Konishi, N. Itoh, Y. Nakagawa, H. Shim-ano, T. Takai-Igarashi, Y. Kamei, Y. Ogawa. Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. Nat. Commun. 9: e636, 2018.

2. 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(1):5181,2020

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

上記 2

③学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

該当なし

④本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)

- ・実験試料の供与だけでなく、技術的なアドバイス
- ・研究進捗に関わる情報の提供、今後の研究の方向性の相談など