

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 4年 4月 11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 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 3年 4月 1日 ~ 令和 4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
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

・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

マウス培養肝細胞である Hepa1-6 を用いてエピゲノム編集に必要なコンポーネント(dCAS9-GFP-TET1CD システム)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)を挿入したコンポーネントを過剰発現する安定発現細胞株を作製した。作製した細胞に AAV にて Cre を導入し、dCAS9-GFP-TET1CD システムの過剰発現を確認している。多層オミクス解析により同定したエピゲノム記憶遺伝子を標的とした gRNA を AAV により共発現することで、その機能的意義を解析する。

・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

上述の遺伝子カセットを過剰発現するマウスを作製中である。AAV ベクターや albumin-CreTg マウスとの交配により肝臓特異的に dCAS9-GFP-TET1CD システムを発現したマウスを作製中である。エピゲノム記憶遺伝子を標的とした gRNA を AAV によりマウス肝臓に導入し、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中である。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 α 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た。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。これまでの検討により Hepa1-6 は肝癌由来の細胞株であり、生理的な DNA メチル化状態との関連が乏しいと考えられたため他の細胞株を用いた検討も併行してすすめている。

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、HEK293 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している。作製したマウスを用いて特定の遺伝子における DNA メチル化の改変が、代謝表現型に及ぼす影響を検討する。

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