

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21745

研究課題名（和文）DNAメチル化修飾を標的にした肥満治療法の開発

研究課題名（英文）Targeting DNA methylation for the treatment of obesity

研究代表者

河野 大輔（Kohno, Daisuke）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：10382904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は以前に、視床下部室傍核のDNAメチル化修飾異常がチロシン水酸化酵素(Th)の発現を著しく増加させるとともに、肥満を誘導することを報告した。本研究では、エピゲノム編集を用いてTh遺伝子のDNAメチル化修飾レベルを人為的に操作し、体重を変化させることを目指した。まず培養細胞により検討したところ、Thプロモーター領域のDNAメチル化修飾を低下させることができた。マウスの脳内におけるThのDNAメチル化修飾の誘導については、LNPを用いた導入方法などを試したが、十分な変化を誘導できるだけの投与条件の検討を完了するところまでには至らなかった。今後もこの課題を継続して行い実現を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化修飾の操作によるドーパミン発現の調節は、肥満だけではなく、ドーパミンにかかわる複数の病気の治療につながるものであり、行う意義は高い。また、DNAメチル化修飾を標的とすることで、発現を単純に増加や抑制するのではなく、発現のされやすさに影響を与えて穏やか発現を変化させることが期待できる。また、DNAメチル化修飾の操作を中枢の特定のニューロン群で行うことは、技術的に容易ではないが、本研究を通して改善方法の検討を行うことができた。今後もこの課題を継続し、成功させて学術的、社会的に有意義なものにしたい。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that aberrant regulation of DNA methylation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus strongly affects tyrosine hydroxylase (Th) gene expression and induces obesity. In this study, we aimed to artificially manipulate the level of DNA methylation of the Th gene in the hypothalamus using epigenome editing. First, we studied using cultured cells and were able to reduce the level of DNA methylation of the Th promoter. We used lipid nanoparticles (LNP) to transfect the plasmid DNA vector into the mouse brain. However, we have not been able to complete our testing of delivery conditions to induce sufficient changes. We will continue this project to achieve this goal.

研究分野：神経科学

キーワード：肥満 視床下部 DNAメチル化修飾 エピゲノム編集 チロシン水酸化酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

過去数十年間に、肥満者の割合が世界的に急増している。同時期に食事の高脂肪食化や高脂肪高砂糖食化、交通手段の変化などの人間を取り巻く環境の大きな変化が起こっているため、環境要因が肥満者増加の中心的な原因であると考えられる。一方で、環境要因により肥満が発症する分子機構は十分には明らかになっていない。

生体内の環境応答機構には様々なものが存在しているが、エピゲノム修飾もその一つである。我々は、以前に視床下部室傍核特異的 *Dnmt3a* 欠損マウスが肥満になることを見出した（文献① Kohno D., et al., *J Neurosci.* 2014）。*Dnmt3a* 遺伝子から作られる DNMT3A タンパクは、*de novo* DNA メチル基転移酵素であり、環境変化などに応じて新しい DNA メチル化修飾を作る役割をしている。視床下部室傍核特異的 *Dnmt3a* 欠損マウスでは、視床下部室傍核においてチロシン水酸化酵素 (*Th*) 遺伝子の発現が著しく増加していることを網羅的発現解析により見出している（文献①）。また、このマウスでは *Th* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化修飾が減少しており、*Dnmt3a* 欠損により *Th* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化修飾が減少した結果、*Th* 発現が増加し、肥満になったと考えられる。また、*Th* 遺伝子と DNA メチル化修飾が深くかかわっていることを推測させる報告は、他にも複数あり、DNA メチル化修飾の標的として *Th* 遺伝子が重要な役割をしていることが推測できる。最近になり、ゲノム編集技術を応用して、DNA メチル化修飾を操作する技術（エピゲノム編集）が開発されており（文献②）、特定のゲノム領域の DNA メチル化修飾を操作することが可能になってきた。そこで本研究では、*Th* 遺伝子の DNA メチル化修飾に注目して研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、エピゲノム編集技術を利用して以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) 培養細胞において *Th* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化修飾を操作できるか？
- (2) マウスの視床下部において、*Th* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化修飾を操作できるか？

3. 研究の方法

(1) *Th* 遺伝子を発現する細胞株である、ラットドーパミン作動性神経細胞株である N27 細胞とラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 細胞を用いた。*Th* 遺伝子プロモーター領域を標的とするガイド RNA を 6 種類設計した。DNA 脱メチル化酵素である Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 (TET1) を dCas9 などにより強制配置し、DNA 脱メチル化を誘導するエピゲノム編集オールインワンベクターである pPlatTET-gRNA2 (Addgene #82559) から、ガイド RNA 領域を制限酵素処理により除いたベクターを作成した。このベクターを「pdCAS9-TET1」ベクターとする。pdCAS9-TET1 ベクターをガイド RNA とともに脂質ナノ粒子 (LNP) (日油株式会社) (文献③) を用いて細胞に導入した。3 日後に細胞を回収してゲノム DNA を抽出した。バイサルファイト処理後、DNA メチル化レベルを調べるために、methylation-specific PCR (MSP) を行った。MethPrimer プログラムを用いて、メチル化特異的 PCR プライマーと非メチル化特異的 PCR プライマーをデザインした。EpiScope MSP Kit (タカラバイオ) を用いて定量 PCR を行い、Ct 値を得た。DNA メチル化修飾率は以下の計算方法により算出した。

methylated rate (%)

$$= \Delta\text{Ct methylated DNA} / (\Delta\text{Ct methylated DNA} + \Delta\text{Ct unmethylated DNA}) \times 100$$

(2) C57BL/6J マウスの視床下部室傍核に、pdCAS9-TET1 ベクターとガイド RNA を脂質ナノ粒子に混ぜた状態で 0.1 μ l を注入した。ベクター量は、0.1 μ g、1 μ g、1.5 μ g および 2 μ g の投与量を試した。注入 2 日後、灌流固定し、スクロースに置換後凍結切片を作成し pdCAS9-TET1 ベクターから発現する GFP 蛍光を観察することにより、遺伝子導入の確認を行った。また、室傍核組織を採取し、ゲノム DNA を抽出し、(1) と同様にバイサルファイト処理後、methylation-specific PCR (MSP)を行った。

4. 研究成果

(1) PC12 細胞では、6 種類中 4 種類のガイド RNA で *Th* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化修飾率の有意な低下を誘導することができた。また、N27 細胞では、6 種類すべてのガイド RNA で *Th* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化修飾率が有意に低下した (図 1)。PC12 細胞と N27 細胞の細胞増殖速度は大きく違いがあり、N27 細胞のほうが早い。N27 細胞のほうが脱メチル化誘導できたガイド RNA の種類の割合が高かったことのために、細胞増殖速度が関係しているのではないかと推測している。

(2) 視床下部室傍核に pdCAS9-TET1 ベクターとガイド RNA を導入したマウスでは、いずれのプラスミド量を注入した場合でも、ベクターに組み込んだ GFP の発現は確認できなかった。現在、投与量の調整や検出感度の上昇などの条件設定を行っている。

本研究では、マウス個体レベルでエピゲノム編集を行い太りやすさを操作することをねらいとしている。本研究費の期間ではそのねらいの達成にまでは至らなかったが、少なく

とも細胞レベルでは *Th* 遺伝子の脱メチル化誘導ができることが明らかになった。エピゲノム編集を用いて太りやすさを変更させる研究発表はこれまでなく、画期的な研究成果になることが期待できるため、今後も引き続きこの研究課題に取り組み、成功させたい。

<引用文献>

文献① Kohno D, Lee S, Harper MJ, Kim KW, Sone H, Sasaki T, Kitamura T, Fan G, Elmquist JK. Dnmt3a in Sim1 neurons is necessary for normal energy homeostasis. *J Neurosci*. 2014 Nov 12;34(46):15288-96.

文献② Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using

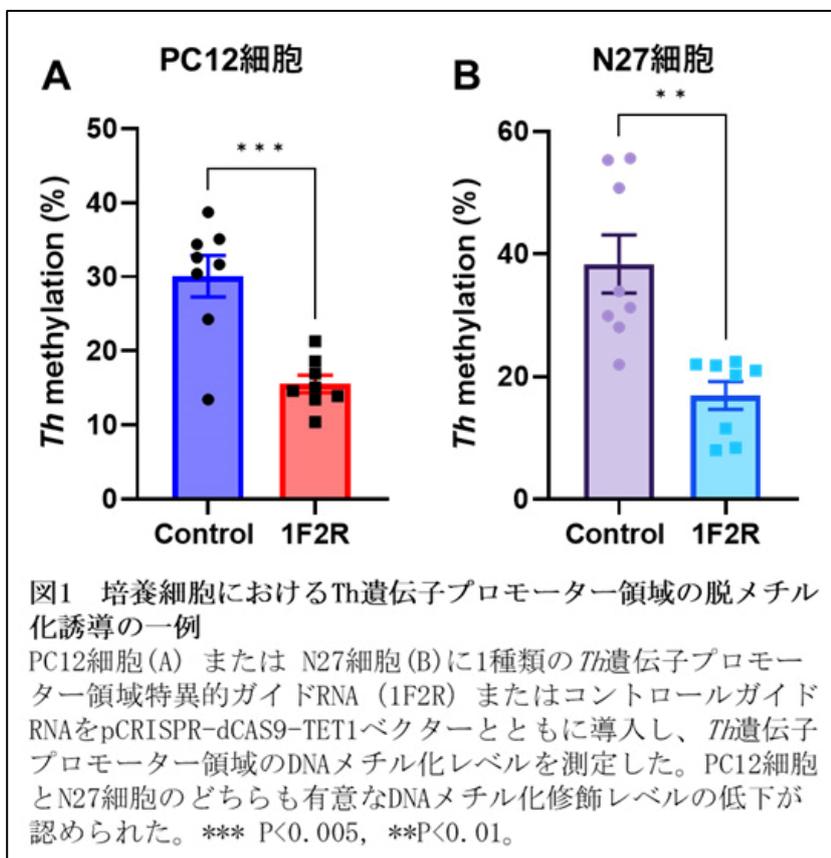


図1 培養細胞における*Th*遺伝子プロモーター領域の脱メチル化誘導の一例
PC12細胞(A) または N27細胞(B)に1種類の*Th*遺伝子プロモーター領域特異的ガイドRNA (1F2R) またはコントロールガイドRNAをpCRISPR-dCAS9-TET1ベクターとともに導入し、*Th*遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化レベルを測定した。PC12細胞とN27細胞のどちらも有意なDNAメチル化修飾レベルの低下が認められた。*** P<0.005, **P<0.01。

dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat Biotechnol.* 2016 Oct;34(10):1060-1065

文献③ Kimura S, Khalil IA, Elewa YHA, Harashima H. Novel lipid combination for delivery of plasmid DNA to immune cells in the spleen. *J Control Release.* 2021 Feb 10;330:753-764.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------