

令和元年5月27日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05331

研究課題名(和文) DNAメチル化に着目した「エピゲノム記憶」の分子機構と機能的意義の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of DNA methylation-mediated epigenome memory and its functional implications

研究代表者

小川 佳宏 (Ogawa, Yoshihiro)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：70291424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なエピゲノム修飾であるDNAメチル化に焦点を当て、乳仔期のマウスの肝臓では糖脂質代謝制御ホルモンであるfibroblast growth factor 21 (FGF21) の遺伝子プロモーター領域が核内受容体に依存してDNA脱メチル化されること、この時期に一旦確立したDNAメチル化状態が長期にわたってエピゲノム記憶され、これが成獣期の高脂肪食により誘導される肥満の程度に関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期ライフステージにおけるエピゲノム記憶の担い手としてDNAメチル化の生理的・病態生理的意義が示唆された。本研究の学術的意義としては、特定の遺伝子のDNAメチル化状態が早期ライフステージの記憶・維持を担うことにより将来の疾患発症に関与することが初めて証明された。一方、社会的意義としては、人工乳や機能性食品によるエピゲノム制御による胎児期や新生児期の栄養環境に対する介入により、成人期に発症する生活習慣病の先制医療の実現が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor 21 (FGF21; Fgf21) is a major PPAR target gene that occurs abundantly in the liver. We have found that DNA demethylation of Fgf21 can be modulated and/or enhanced by pharmacologic activation of PPAR during the suckling period. Importantly, DNA methylation status of Fgf21, once established in early life, is relatively stable and remains into adulthood as an epigenetic memory. With increased DNA demethylation, hepatic induction of Fgf21 has been exaggerated upon PPAR activation, which may account in part for the attenuation of diet-induced obesity in adulthood. This study represents the first demonstration that DNA methylation status of a particular gene, once established in early life, contributes to the metabolic phenotypes in later life.

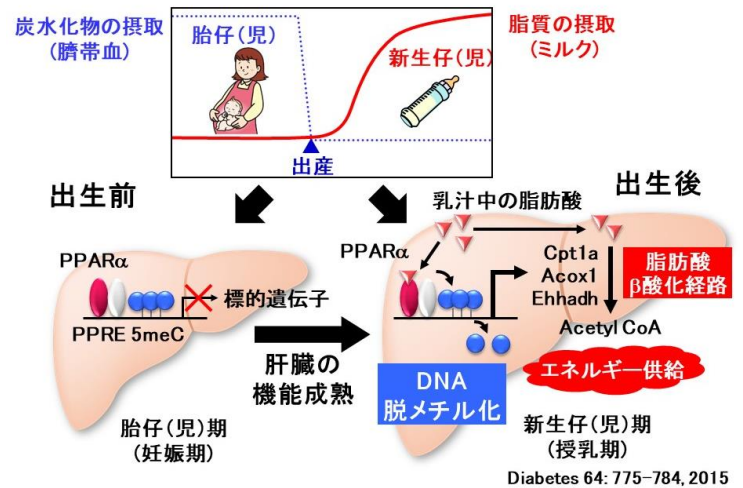
研究分野：内科学、内分泌代謝学

キーワード：エピゲノム記憶 DNAメチル化 FGF21 PPAR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 器官形成期に相当する胎生期や個体の発育が著しい新生児期は全身臓器の可塑性が最も高い時期であり、この時期の様々な環境要因が塩基配列を変化させずにゲノム上に記憶(=エピゲノム記憶)され、成人期の生活習慣病の発症に関連する可能性がある(DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説) (Science 305: 1733-1736, 2004)。研究代表者らは既に、摂取カロリーを制限した妊娠マウスを用いて得られる子宮内胎児発育遅延(IUGR)マウスを世界に先駆けて確立し、IUGRマウスでは成獣期の過栄養により肥満の程度が増悪することを報告した(Cell Metab. 1: 371-378, 2005)。しかしながら、「エピゲノム記憶」の概念には具体性が乏しく、どのようにしてエピゲノム記憶が成立するのか、エピゲノム記憶自体がどのようにして成人期の生活習慣病の発症に関連するのかは明らかではなかった。



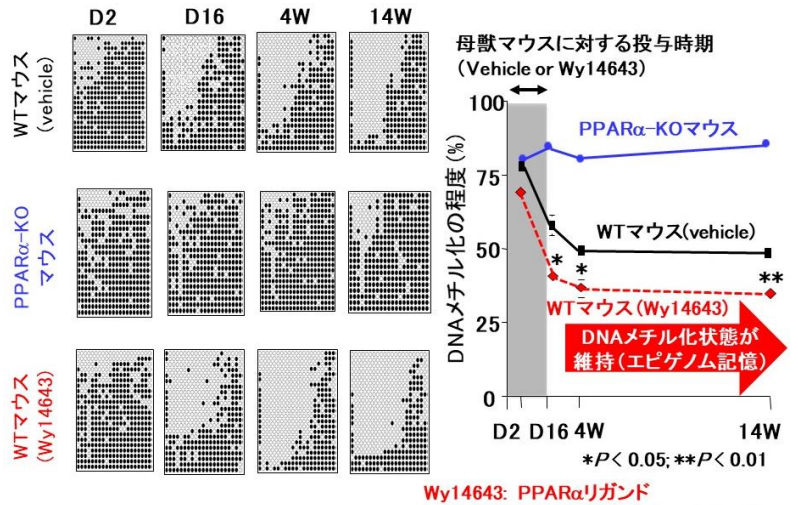
(図1) PPAR α 依存性DNA脱メチル化による脂肪酸 β 酸化経路の制御
Diabetes 64: 775-784, 2015

(2) ゲノムのDNAメチル化は代表的なエピゲノム修飾であり、多くの場合は遺伝子転写を抑制する。研究代表者らは既に、妊娠期~授乳期の母獣マウスの栄養状態に応じて新生仔マウスのDNAメチル化状態が大きく変化すること、特に、離乳後の新生仔マウスの肝臓では核内受容体型転写因子であるperoxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)を介して脂肪酸 β 酸化経路のDNA脱メチル化が生じて遺伝子発現が亢進することを証明した(Diabetes 61: 2442-2450, 2012; Diabetes 64: 775-784, 2015) (図1)。

(3) 糖脂質代謝制御の鍵分子であるfibroblast growth factor 21 (FGF21; *Fgf21*)はPPAR α の代表的な標的遺伝子である。研究代表者らは既に、胎仔期~新生仔期のマウス肝臓においてリガンドにより活性化されたPPAR α を介して糖脂質代謝制御の鍵分子である*Fgf21*がDNA脱メチル化されること、この時期のDNAメチル化状態は成獣期まで変化することなく維持されることを予備的に見出した。

2. 研究の目的

本研究課題では、エピゲノム記憶を担う分子基盤としてDNAメチル化に焦点を当て、エピゲノム記憶遺伝子と想定されるPPAR α の標的遺伝子である*Fgf21*を例とし、胎仔期~乳仔期の栄養環境がどのようにしてエピゲノム記憶されるのか、このエピゲノム記憶が成獣期まで維持されるのか、糖脂質代謝を中心とする成獣期マウスの表現型に影響するのか否かを明らかにする。更に、胎仔期~新生仔期のマウス肝臓において新たなエピゲノム記憶遺伝子の探索を試みる。



(図2) 産仔マウスの肝臓における*Fgf21*のDNAメチル化の経時変化
Nat. Commun. 9: e636, 2018

3. 研究の方法

(1) *Fgf21*に焦点を当てたDNA脱メチル化の経時変化の検討

胎仔期~乳仔期のマウス肝臓におけるPPAR α 依存的な*Fgf21*のDNA脱メチル化の経時変化を詳細に検討した。妊娠後期~授乳期の母獣マウス(野生型マウス、PPAR α 欠損マウスなどを用いる)にPPAR α の人工リガンドであるWy14643を投与し、バイサルファイトシークエンス法により、胎仔期後期(E14.5)、生後2日(D2)、16日(D16)、4週(4W)および14週(14W)の産仔マウスの肝臓における*Fgf21*のDNAメチル化状態を検討した。又、胎仔期、新生児期あるいは成獣期にWy14643を投与して*Fgf21*のDNAメチル化状態がどの時期に変化するのかについて検討した。

(2) *Fgf21*に焦点を当てたエピゲノム記憶の機能的意義の検討

胎仔期~乳仔期にDNAメチル化状態が一旦確立し、成獣期まで記憶・維持された場合、*Fgf21*のDNAメチル化状態の差異が肝臓における*Fgf21*の発現や血中FGF21濃度にもたらす効果を検討した。具体的には、妊娠後期~授乳期の母獣マウスにWy14643を投与し、母獣マウス(Wy14643投与群と対照群)が出産する産仔マウス(Wy投与群、非投与群)の成獣期において、Wy14643単回投与あるいは絶食・再摂食や高脂肪食負荷などにより栄養状態を変化させ、胎仔期~新生

仔期に一旦確立した *Fgf21* の DNA メチル化状態が変化するか否かを検討した。*Fgf21* の DNA メチル化状態の異なる Wy 投与群と非投与群を高脂肪食負荷により肥満を誘導し、体重や脂肪組織重量、脂肪組織における脂肪分解関連酵素の遺伝子発現などの代謝関連表現型を検討した。更に、FGF21 の関与を明らかにするために FGF21 欠損マウスを用いて同様に検討した。

(3) 新しいエピゲノム記憶遺伝子の探索

胎仔期～乳仔期のマウス肝臓において PPAR α の標的遺伝子以外に DNA メチル化状態が変化し、成獣期までエピゲノム記憶される遺伝子の同定を試みた。具体的には乳仔期に確立する糖新生関連酵素と転写因子である hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4 α ; *Hnf4a*) に着目し、パイサルフアイトシーケンス法により、DNA メチル化の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) *Fgf21* に焦点を当てた DNA 脱メチル化の経時変化の検討

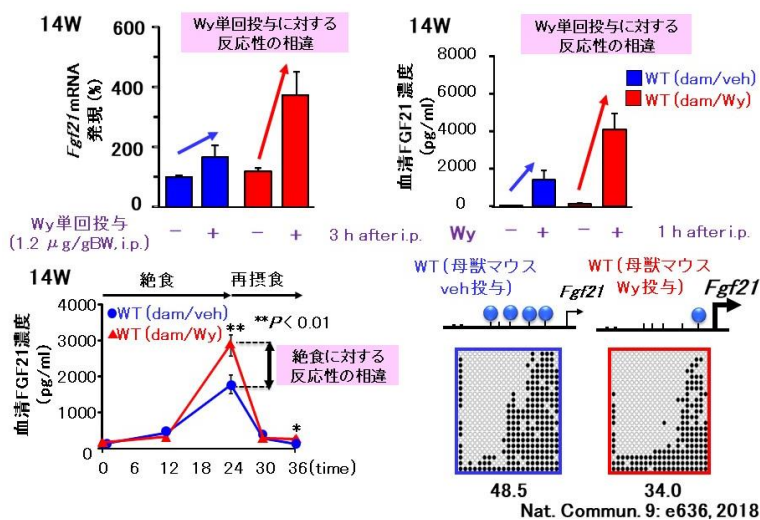
野生型マウスの肝臓では E14.5 から D16 までの間に *Fgf21* の DNA 脱メチル化が進行し、D16 までに形成された DNA メチル化状態は 4W、14W では変化せずに成獣期まで維持されていた。*Fgf21* の DNA 脱メチル化は PPAR α 欠損マウスでは認められず、PPAR α の人工リガンドである Wy14643 を妊娠後期～授乳期の母獣マウスに投与すると、産仔マウスの肝臓における *Fgf21* の DNA 脱メチル化が促進されることが明らかになった (*Nat. Commun.* 9: e636, 2018) (図 2)。以上により、胎仔期～新生仔期のマウス肝臓における *Fgf21* の DNA 脱メチル化は PPAR α 依存性であること、*Fgf21* の DNA メチル化状態は乳仔期の乳汁成分により容易に制御できることが示唆された。一方、胎仔期のみあるいは成獣期に Wy14643 をマウスに投与しても *Fgf21* の DNA 脱メチル化は誘導されず、マウス肝臓における *Fgf21* の DNA 脱メチル化は乳仔期に特異的であることが示唆された。

(2) *Fgf21* に焦点を当てたエピゲノム記憶の機能的意義の検討

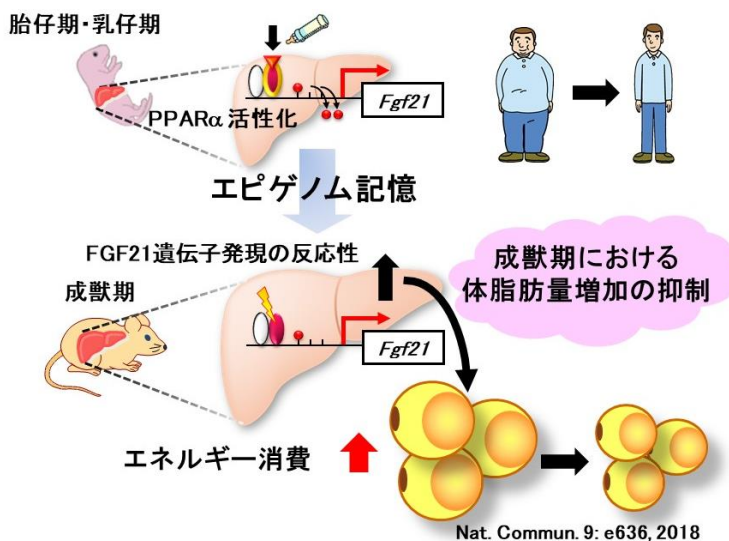
周産期の母獣マウスに Wy14643 を投与した Wy 投与群は対照群と比較して乳仔期における *Fgf21* の DNA 脱メチル化の促進が認められ、DNA メチル化状態は成獣期までエピゲノム記憶された。PPAR α 欠損マウスでは成獣期まで一貫して DNA 脱メチル化は生じなかったが、成獣期において *Fgf21* の発現と血中 FGF21 濃度には両群間で有意差は認められなかった。一方、Wy 単回投与や絶食による PPAR α 活性化により、*Fgf21* の DNA メチル化が亢進している Wy 投与群では非投与群と比較して *Fgf21* の発現と血中濃度の有意な増加が認められた (*Nat. Commun.* 9: e636, 2018) (図 3)。高脂肪食負荷においても Wy 投与群と非投与群の DNA メチル化状態の差異は維持されており、DNA 脱メチル化が亢進している Wy 投与群では対照群と比較して、*Fgf21* の発現の増加と血中 FGF21 濃度の有意な上昇が認められた。Wy 投与群の摂食量は非投与群と有意差はないものの、体重増加の有意な抑制と白色脂肪組織量の低下とともに脂肪分解関連遺伝子群の発現上昇が認められた。これらの代謝表現型は FGF21 欠損マウスにおいて有意にキャンセルされた。以上により、乳仔期までに確立した *Fgf21* の DNA メチル化状態が長期間エピゲノム記憶され、成獣期において環境要因に対する遺伝子発現の応答性を規定すること、これにより肝臓における産生が亢進した FGF21 が高脂肪食誘導性肥満の改善に関連することが示唆された (*Nat. Commun.* 9: e636, 2018) (図 4)。

(3) 新しいエピゲノム記憶遺伝子の探索

乳仔期のマウス肝臓において HNF4 α の DNA メチル化が D2 に比較して D16 で低下していることを見出した。更に、標的遺伝子である糖新生関連遺伝子である phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (*Pck1*) と glucose-6-phosphatase (*G6pc*) のプロモーター領域の DNA 脱メ



(図3) DNAメチル化によるFGF21の反応性の相違



(図4) *Fgf21* のエピゲノム記憶と肥満発症

チル化が徐々に亢進すること、DNA メチル化の程度と遺伝子発現が逆相関することが明らかになった。以上により、HNF4αが乳仔期のマウス肝臓において糖新生関連遺伝子の DNA 脱メチル化に関連する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. 小川 佳宏、橋本 貢士、肥満のゲノム・エピゲノムを考える、**日本内科学会雑誌**、105: 376-382, 2016.
2. 辻本 和峰、橋本 貢士、袁 勳梅、川堀 健一、榛澤 望、小川 佳宏、エネルギー代謝と DNA メチル化制御、**実験医学増刊**、34: 95-101, 2016.
3. 橋本 貢士、小川 佳宏、肥満と DOHaD 仮説、**実験医学**、34: 351-336, 2016.
4. Y. Hatazawa, Y. Ono, Y. Hirose, S. Kanai, N.L. Fujii, S. Machida, I. Nishino, T. Shimizu, M. Okano, Y. Kamei, and Y. Ogawa. Reduced Dnmt3a increases Gdf5 expression with suppressed satellite cell differentiation and impaired skeletal muscle regeneration. **FASEB J.** 32: 1452-1467, 2018.
5. 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. Shimano, T. Takai-Igarashi, Y. Kamei, and Y. Ogawa. Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. **Nat. Commun.** 9: e636, 2018.
6. K. Kawahori, K. Hashimoto, X. Yuan, K. Tsujimoto, N. Hanzawa, M. Hamaguchi, S. Kase, K. Fujita, K. Tagawa, H. Okazawa, Y. Nakajima, N. Shibusawa, M. Yamada, and Y. Ogawa. Mild maternal hypothyroxinemia during pregnancy induces persistent DNA hypermethylation in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene in mouse offspring. **Thyroid** 28: 395-406, 2018.
7. 橋本 貢士、小川 佳宏、代謝メモリーと Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)学説、**最新醫學**、72: 678-684, 2018.
8. K. Hashimoto and Y. Ogawa. Epigenetic switching and neonatal nutritional environment. **Adv. Exp. Med. Biol.** 1012: 19-25, 2018.

[学会発表] (計8件)

1. 辻本 和峰、橋本 貢士、袁 勳梅、川堀 健一、榛澤 望、小川 佳宏、Fibroblast growth factor 21 遺伝子発現エピゲノム制御と機能的意義、**第37回日本肥満学会**、2016.
2. 橋本 貢士、小川 佳宏、DOHaD 仮説における糖脂質代謝関連遺伝子発現のエピゲノム記憶とその機能的意義 (シンポジウム)、**第37回日本肥満学会**、2016.
3. 小川 佳宏、糖脂質代謝のエピゲノム制御と機能的意義、**第39回日本分子生物学会年会 (シンポジウム)**、2016.
4. 小川 佳宏、エピゲノム記憶の分子機構と生活習慣病、**第44回日本毒性学会学術年会 (シンポジウム)** (招待講演)、2017.
5. 小川 佳宏、DOHaD 仮説の概念と分子基盤、**第53回日本周産期・新生児医学会総会・学術集会** (教育講演) (招待講演)、2017.
6. 小川 佳宏、エピゲノム記憶の分子機構と病態生理的意義、**第3回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム〜ゲノムとエピゲノムの交差点〜群馬大学・秋田大学連携、第6回生体情報研究シンポジウム** (招待講演)、2017.
7. Yoshihiro Ogawa, Role of DNA methylation in early life and its impact in later life, **Keystone Symposia: Drivers of Type2 Diabetes: From Genes to Environment**, 2018 (招待講演) .
8. 小川 佳宏、エピゲノム記憶の分子機構と病態生理的意義、**愛媛大学プロテオサイエンスセンター 第6回学術シンポジウム** (招待講演)、2019.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院病態制御内科学 (第三内科)

<http://www.intmed3.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：橋本 貢士、袁 勳梅、辻本 和峰、川堀 健一、榛澤 望

ローマ字氏名：Hashimoto Koshi, Yuan Xunmei, Tsujimoto Kazutaka, Kawahori Kenichi, Hanzawa Nozomi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。