

令和 2 年 9 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01840

研究課題名(和文) FGF21遺伝子のPPAR によるDNA脱メチル化の分子機構と機能的意義の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism and functional meaning of PPARalpha-dependent DNA demethylation of FGF21 gene

研究代表者

袁 勲梅 (Yuan, Xunmei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70392404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：FGF21遺伝子は授乳期においてPPAR 活性化を介するDNA脱メチル化を受け、DNA脱メチル化状態が成獣期まで記憶・維持され、肥満の発症・進行の抑制に関与することが示唆された。一方FGF21ノックアウトマウスにおいてPPAR 活性化による肥満の抑制が軽減され、FGF21遺伝子が肥満の抑制に重要な役割を担っていると考えられた。

CRISPR-dCas9-TET1CD系を用いてFGF21遺伝子特異的DNA脱メチル化をHepa1-6細胞およびPPAR ノックアウトマウスで誘導することに成功した。「エベゲノム編集」の応用が期待される。PPAR 依存的DNA脱メチル化の分子機構について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、乳仔期に確立した代謝関連遺伝子のDNAメチル化状態が長期間記憶・維持され、肥満の発症・進展に関連することを初めて示した。乳児期のエピゲノム記憶が成人期の肥満のなりやすさに影響する分子機構の一つを明らかにした画期的な成果であると考えられる。将来の疾患の罹りやすさを予測して適切な介入により、疾患の発症が軽くなる理想的な医療が可能とされている。またCRISPR-dCas9-TET1CD系を用いた「エベゲノム編集」の研究は肝臓で脂質代謝遺伝子の働きを改善し、遺伝病や肝臓病などの治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We showed that the fibroblast growth factor 21 gene (FGF21 gene), a metabolic hormone implicated in the regulation of energy homeostasis, is subject to peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) -dependent DNA demethylation in the liver during the postnatal period. The DNA demethylation status of FGF21 gene is relatively stable and remains into adulthood, which may account in part for the improvement of diet-induced obesity. Metabolic phenotypes were alleviated in FGF21-KO indicating that FGF21 may play a major role in the developmental programming of obesity. We also showed successful targeted site-specific DNA demethylation of FGF21 gene both in Hepa1-6 cells and PPAR -deficient mice, using the dCas9-SunTag and single-chain variable fragment (scFv)-TET1 catalytic domain (TET1CD) system. This study implies great potential of epigenome editing for novel therapies. Molecular mechanism underlying PPAR -dependent DNA demethylation was also discussed.

研究分野：応用健康科学

キーワード：PPAR FGF21 DNAメチル化 エピジェネティクス DOHaD

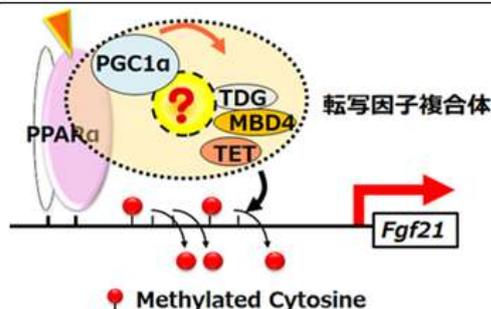
1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らはDNAメチル化の網羅的解析法であるMIAMI法(Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers)を用いた解析により、マウス乳仔期において核内受容体型転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) が標的遺伝子の転写調節のみならず、エピゲノム修飾であるDNA脱メチル化を制御することを見出した。さらに母乳由来の脂質リガンドなどで活性化された PPAR α は、糖脂質代謝改善作用を有する Fibroblast growth factor 21 (FGF21) 遺伝子のDNA脱メチル化を促進し、そのDNA脱メチル化状態は「エピゲノム記憶」として長期間維持され、高脂肪食誘導性の肥満を抑制することを基盤研究(C) (26350884、平成26-28年度)で報告した。しかし FGF21 そのものの生産が代謝表現型に寄与しているかどうかは不明である。

(2) 前回の基盤研究(C)ではマウス乳仔期肝臓において PPAR α 活性化に誘導された乳仔期までに確立された FGF21 遺伝子のDNA脱メチル化状態が成獣期まで維持され、このDNAメチル化状態が環境変化に対する Fgf21 の発現応答性を規定していることを明らかにした。しかしこの系は FGF21 遺伝子以外に他の PPAR α 標的遺伝子も含まれており、Fgf21 特異的なDNA脱メチル化状態の機能的意義は不明である。最近、CRISPR-dCas9にDNA脱メチル化酵素である Ten-eleven translocation (TET) 1の catalytic domain (CD)を融合させた系(CRISPR-dCas9-TET1CD)を用いた塩基配列特異的なDNA脱メチル化の導入が報告された(Nat. Biotechnol. 2016)。研究者らはこの系を用いて FGF21 遺伝子プロモーター領域に特異的にDNA脱メチル化を導入し、その機能的意義を解明する。

(3) 出生を境に哺乳類のエネルギー源は糖質が中心の臍帯血から脂質が主体である母乳にシフトするが、それに伴い肝臓の機能は造血から代謝へと大きく変化する。その変化に応じてマウス乳仔期肝臓において脂肪酸 β 酸化遺伝子の転写およびDNAの脱メチル化を大きく動かしているのが核内受容体転写因子 PPAR α である。しかし、PPAR α がどのようにしてDNA脱メチル化を引き起こすのかについては未だ不明である。PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator-1 alpha) は核内受容体 PPAR γ による転写を活性化する転写共役因子として同定され、肝臓、褐色脂肪組織および骨格筋などエネルギー代謝や熱消費に関わる多くの臓器、組織に発現する。一方我々は脂肪酸 β 酸化関連遺伝子が胎仔期から乳仔期のマウス肝臓において、PPAR α 依存的なDNA脱メチル化を介して発現制御を受けていることを見出した。しかしその分子機構は分かっていない。PPAR α は母乳由来の脂肪酸がリガンドとなって活性化されることにより転写因子複合体を形成し、DNA脱メチル化因子を標的遺伝子にリクルートしDNA脱メチル化を引き起こすことが想定される。PPAR α の転写共役因子である PGC1 α を含む転写因子複合体の同定が、PPAR α によるDNA脱メチル化の分子機構解明のカギであると考えられる(図1)。

(図1) PPAR α によるDNA脱メチル化の分子機構



2. 研究の目的

(1) 本研究では FGF21 遺伝子のエピゲノム記憶そのものが成獣期における肥満などの生活習慣病の発症に関連するのかを検討する。

(2) FGF21 遺伝子特異的DNA脱メチル化の機能的意義を検討する。

(3) PPAR α によるDNA脱メチル化の分子機構を検討する。

3. 研究の方法

(1) 生後4週の野生型マウスに高脂肪食負荷下にヒトリコンビナント FGF21 を4週間投与し、その代謝表現型を解析した。また妊娠・授乳期の FGF21 ノックアウト母獣マウスに PPAR α の人工リガンド Wy14643 (Wy) を投与し、生後4週齢の産仔に高脂肪食を10週間負荷し、その代謝表現型を解析した。

(2) CRISPR-dCas9にDNA脱メチル化酵素である Ten-eleven translocation (TET) 1の catalytic domain (CD)を融合させた系(CRISPR-dCas9-TET1CD) (Nat. Biotechnol. 2016)を用いて、FGF21 遺伝子プロモーター領域に塩基配列特異的にDNA脱メチル化を導入した。まず Fgf21 特異的なガイドRNAをもつ GFP 標識した CRISPR-dCas9-TET1CD を作製し、マウス肝細胞株 Hepa1-6 およ

び PPAR α KO マウスの肝臓に導入した。その DNA メチル化状態および *Fgf21* 発現の変化を解析した。

(3) CRISPR-Cas9 を用いて PPAR α 遺伝子の開始コドンのすぐ後に V5 タグを挿入した V5-tag ノックイン PPAR α マウスを作製した。乳仔期 V5-PPAR α マウスに PPAR α の人工リガンドで刺激し、PPAR α の標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR で確認し、V5-PPAR が正常に機能するかどうかを検討した。V5 タグの免疫共沈による PPAR α と相互作用する因子を同定する。

(4) PGC1 α -floxed マウスおよび $\alpha 1$ -antitrypsin-Cre マウスを用いて乳仔期マウス肝臓特異的 PGC1 α 欠損マウスを作製し、MIAMI 法により DNA メチル化状態を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化の亢進が成獣期のエネルギー消費に直接影響を及ぼすかどうか、ヒトリコンビナント FGF21 および FGF21 ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。生後 4 週野生型マウスに高脂肪食負荷下にヒトリコンビナント FGF21 を 4 週間投与したところ、体重増加抑制効果および白色脂肪組織の重量減少を認めた。野生型マウス母獣の妊娠期から授乳期に PPAR α のリガンドである Wy を投与すると、その産仔の肝臓における FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が亢進し、成獣期に高脂肪食を与えると対照群と比較して体重増加抑制や白色脂肪組織重量の減少を認めた。一方 FGF21 ノックアウト (KO) マウスに同様の実験を行っても対照群と Wy 投与群の体重および白色脂肪組織の重量に有意差は認められなかった。以上の結果から、野生型マウスで認められた Wy 投与群での体重増加抑制および白色脂肪組織の重量減少は、FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態の差異によって生じた可能性が示唆された。

(2) FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が直接代謝表現型に影響を及ぼしているかはいまだ不明であるため、CRISPR-dCas9-TET1CD 系を用いた FGF21 遺伝子の塩基配列 (CpG 部位) 特異的 DNA 脱メチル化を導入し、その機能的意義を検討した。

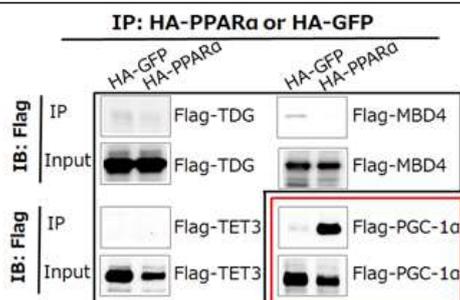
まずマウス肝臓細胞株 Hepa1-6 において *Fgf21* 特異的 DNA 脱メチル化を導入することに成功した。*Fgf21* 特異的 DNA 脱メチル化は、定常状態における *Fgf21* 発現には影響しないが、PPAR α の活性化刺激により *Fgf21* の発現を上昇させた。DNA 脱メチル化状態が進んだほうがより顕著となり、DNA メチル化状態は遺伝子の発現応答性を規定していることが示唆された。

さらに CRISPR-dCas9-TET1CD 系を用いて HTVi 法により PPAR α KO マウスの肝臓に *Fgf21* 特異的 DNA 脱メチル化を導入した。Fasting 刺激で上昇したコルチコステロンにより FGF21 の発現が有意に上昇した。*in vitro*、*in vivo* いずれにおいても *Fgf21* 特異的 DNA 脱メチル化が刺激応答性を規定し、DNA メチル化状態の程度が刺激応答量を規定していることを明らかにした。*Fgf21* 特異的脱 DNA メチル化の *in vivo* へ応用が期待された。

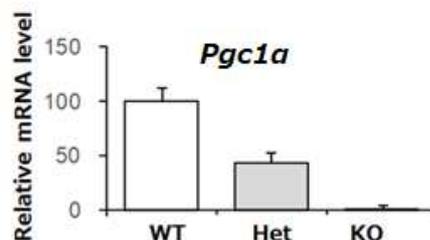
(3) PPAR α と相互作用する DNA 脱メチル化関連因子を探索ために、CRISPR-Cas9 を用いた V5-tag ノックイン PPAR α マウスを作製した。乳仔期に PPAR α リガンドを刺激したところ、V5-PPAR α マウスにおいて PPAR α の標的遺伝子 *Fgf21* の発現上昇が見られ、V5-PPAR α は機能的に働いていることが検証された。V5 タグ付加蛋白は抗 V5 抗体による免疫沈降の効率が良いことが知られている (J Biol Chem 2015)。授乳期の V5-PPAR α ノックインマウスの母獣に Wy などのリガンドを投与し、仔の肝臓から核蛋白を抽出し抗 V5 抗体で免疫沈降を行った。現在は共同研究により免疫沈降で得られた複合体を質量分析により解析し、乳仔期特異的リガンド刺激により活性化された PPAR α と相互作用する蛋白因子を同定している。

(4) DNA 脱メチル化関連因子に関して、DNA 脱メチル化酵素 Ten-eleven translocation (TET) に加え、Thymine DNA glycosylase (TDG)、Methyl-CpG Domain Protein 4 (MBD4) などが知られ

(図2) DNA脱メチル化関連因子との相互作用

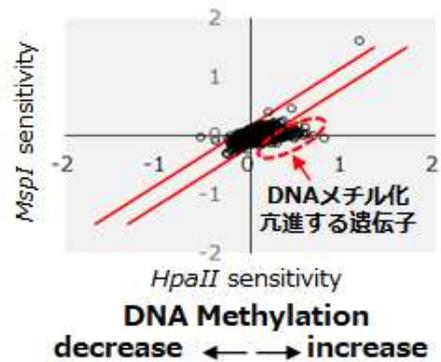


(図3) 生後1日目のPGC1 α 欠損マウスにおける*Pgc1 α* 遺伝子の発現



ている (Nature 2013)。研究代表者は転写因子 PPAR α が DNA 脱メチル化関連蛋白と相互作用あるかどうかについて免疫沈降法を用いて検討した。しかし PPAR α とは DNA 脱メチル化関連蛋白との直接相互作用は認められなかった。一方 293T 培養細胞を用いた免疫沈降実験では PPAR α と PGC1 α との相互作用を認めた (図 2)。PGC1 α -floxed マウスおよび α 1-antitrypsin-Cre マウスを用いて肝臓特異的 PGC1 α 欠損マウスを作製し、PGC1 α 欠損マウスでは出生頃から肝臓での PGC1 α の発現が欠損した (図 3)。遺伝子発現および DNA メチル化状態の網羅的解析を行ったところ、野生型に比べ PGC1 α 欠損マウスの肝臓においては DNA メチル化が亢進した (図 4)。今後は PGC1 α による DNA 脱メチル化は PPAR α とどのように関わるかを解析すると考えている。

(図4) PGC1 α KOマウスにおける DNAメチル化網羅的解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hanzawa N, Hashimoto K, Yuan X, Kawahori K, Tsujimoto K, Hamaguchi M, Tanaka T, Nagaoka Y, Nishina H, Morita S, Hatada I, Yamada T and Ogawa Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeted DNA demethylation of the Fgf21 promoter by CRISPR/dCas9-mediated epigenome editing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1038/s41598-020-62035-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Asakawa M, Itoh M, Suganami T, Sakai T, Kanai S, Shirakawa I, Yuan X, Hatayama T, Shimada S, Akiyama Y, Fujiu K, Inagaki Y, Manabe I, Yamaoka S, Yamada T, Tanaka S and Ogawa Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Upregulation of cancer-associated gene expression in activated fibroblasts in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1038/s41598-019-56039-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawahori K, Hashimoto K, Yuan X, Tsujimoto K, Hanzawa N, Hamaguchi M, Kase S, Fujita K, Tagawa K, Okazawa H, Nakajima Y, Shibusawa N, Yamada M, Ogawa Y,	4. 巻 28
2. 論文標題 Mild maternal hypothyroxinemia during pregnancy induces persistent DNA hypermethylation in the hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene in mouse offspring	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 395-406
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1089/thy.2017.0331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuan X, Tsujimoto K, Hashimoto K, Kawahori K, Hanzawa N, Hamaguchi M, Seki T, Nawa M, Ehara T, Kitamura Y, Hatada I, Konishi M, Itoh N, Nakagawa Y, Shimano H, Takai-Igarashi T, Kamei Y & Ogawa Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-03038-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuan X, Hashimoto K, Ogawa Y.
2. 発表標題 Molecular Mechanism and Physiological Meaning of Epigenetic Regulation of FGF21 Gene Expression
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors (ICoFF) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 袁勳梅、橋本貢士、榛澤望、濱口美穂、辻本 和峰、山田哲也、小川佳宏
2. 発表標題 PGC1 欠損マウスを用いたDNAメチル化の網羅的解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榛澤望、橋本貢士、袁勳梅、辻本和峰、川堀健一、濱美穂、畑田出穂、小川佳宏、山田 哲也
2. 発表標題 CRISPR-dCas9系を用いたFibroblast growth factor 21 (FGF21) 遺伝子特異的DNA脱メチル化の導入とその機能的意義
3. 学会等名 第4回第4回生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 袁勳梅、榛澤望、濱口美穂、橋本貢士、辻本和峰、山田哲也、小川佳宏、
2. 発表標題 マウス乳仔期肝臓でのDNA脱メチル化における転写共役因子PGC1 の役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 袁勳梅、辻本和峰、川堀健一、榛澤望、濱口美穂、橋本貢士、小川佳宏
2. 発表標題 FGF21遺伝子発現のエピゲノム制御：その分子機構と機能の意義
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/member/personal/en.html

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
連携研究者	小川 佳宏 (Ogawa Yoshihiro) (70291424)	九州大学・大学院医学研究院・教授 (17102)	
連携研究者	橋本 貢士 (Hashimoto Koshi) (30396642)	獨協医科大学埼玉医療センター・糖尿病内分泌・血液内科・教授 (32203)	
連携研究者	稲垣 毅 (Inagaki Takeshi) (10507825)	群馬大学・生体調節研究所・教授 (12301)	