

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09018

研究課題名(和文) FGF21遺伝子のエピゲノム記憶の分子機構とその生体における機能的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of epigenetic memory of FGF21 gene and its functional significance in vivo.

研究代表者

橋本 貢士 (Hashimoto, Koshi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：30396642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：FGF21遺伝子特異的にDNA脱メチル化をCRISPR-dCas9-TET1CD系を用いてマウス株細胞およびマウス肝臓に導入しその機能的意義を検討したところ、FGF21遺伝子のDNAメチル化状態の差異は、定常状態におけるFGF21遺伝子発現には反映されないが、FGF21遺伝子発現を活性化するような環境刺激に対する反応性の発現応答の程度を規定することが示唆された。すなわちFGF21遺伝子のDNAメチル化によるエピゲノム制御は、遺伝子発現のON-OFFを決める「スイッチ」ではなく、発現量のマグニチュードを決める「ボリューム」であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子特異的にDNA脱メチル化を導入するエピゲノム改変の研究は世界的にもまだ少なく、本研究は先駆的である。CRISPR-dCAS9-TET1CD系を用いてFGF21遺伝子特異的なDNA脱メチル化を細胞とマウス肝臓に導入した。本研究によりFGF21遺伝子のDNA脱メチル化によるエピゲノム制御の機能的意義が初めて明らかになった。またCRISPR-dCAS9-TET1CD系とPPAR α ノックアウトマウスを用いた「遺伝子特異的エピゲノム改変動物」は代謝分野において世界で初めての試みである。今後このエピゲノム改変動物を解析することにより、代謝におけるエピゲノム記憶の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, we reported PPAR α -dependent DNA demethylation of the Fgf21 promoter in the postnatal mouse liver, where reduced DNA methylation is associated with enhanced gene expression after PPAR α activation. However, there is no direct evidence for the effect of site-specific DNA methylation on gene expression. We employed the dCas9-SunTag and single-chain variable fragment (scFv)-TET1 catalytic domain (TET1CD) system to induce targeted DNA methylation of the Fgf21 promoter both in vitro and in vivo. We succeeded in targeted DNA demethylation of the Fgf21 promoter both in Hepa1-6 cells and PPAR α -deficient mice, with increased gene expression response to PPAR α synthetic ligand administration and fasting, respectively. This study provides direct evidence that the DNA methylation status of a particular gene may determine the magnitude of the gene expression response to activation cues.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：CRISPR-dCas9-TET1CD系 遺伝子特異的DNA脱メチル化 FGF21 PPAR α エピジェネティクス エピゲノム制御 エピゲノム記憶

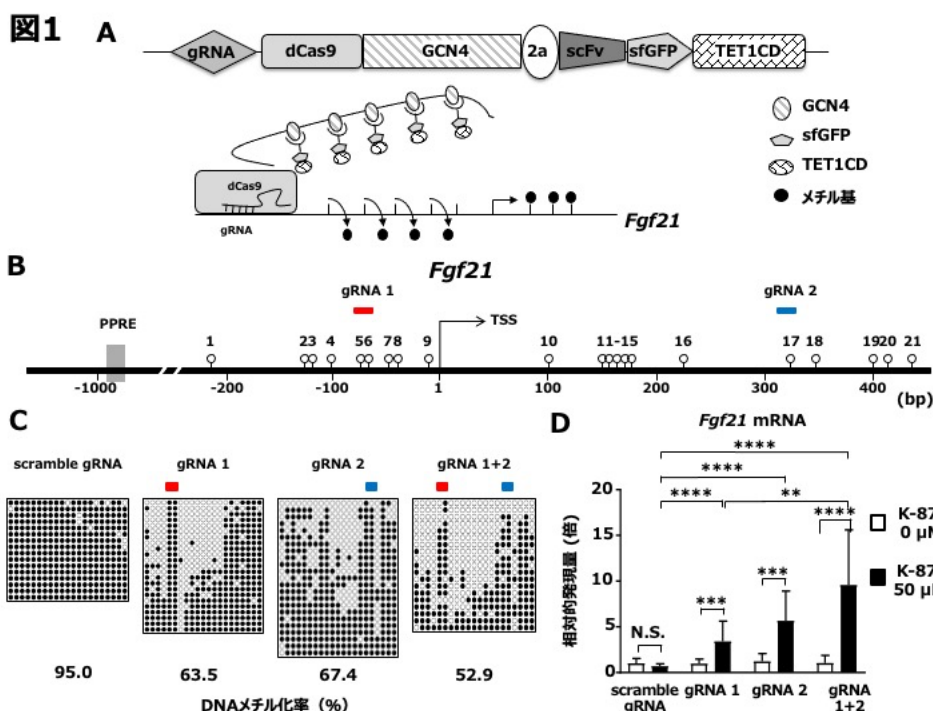
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 は主に肝臓で産生されるホルモンであり、糖脂質代謝の鍵分子である。研究代表者らは先行研究により FGF21 遺伝子が、乳仔期のマウス肝臓において核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α 依存的に生理的な DNA 脱メチル化を受けることを明らかにした (Ehara T and Hashimoto K et al, *Diabetes* 2015)。また DNA メチル化状態が成獣期まで維持され、「エピゲノム記憶」を呈することをみだした。さらに妊娠期から授乳期に PPAR α の人工リガンドを投与した母獣からの産仔では FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が促進されており、その成獣期に高脂肪食を投与すると、対照群と比較して血清 FGF21 濃度の有意な増加を認め、体重増加抑制および白色脂肪組織重量の減少を呈しエネルギー消費の亢進が示唆された (Yuan X and Hashimoto K et al, *Nat Commun* 2018)。しかし FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態のこの代謝表現型への直接的な影響は不明であった。

2. 研究の目的

遺伝子特異的に DNA 脱メチル化酵素である Ten-Eleven Translocation1(TET1) の catalytic domain(CD)



を誘導することで人工的 DNA 脱メチル化を導入しうるエピゲノム編集技術である CRISPR-dCas9-TET1CD 系 (Nat Biotechnol. 2016) (図 1 A) を用いて、FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化を、マウス株細胞およびマウス肝臓に導入し、単

一の糖脂質代謝関連遺伝子の DNA メチル化状態の改変が、細胞内の遺伝子発現および生体における代謝表現型にどのような影響を及ぼすかを解析することを試みた。そして単一の糖脂質代謝関連遺伝子のエピゲノム修飾がもつ生理的、機能的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

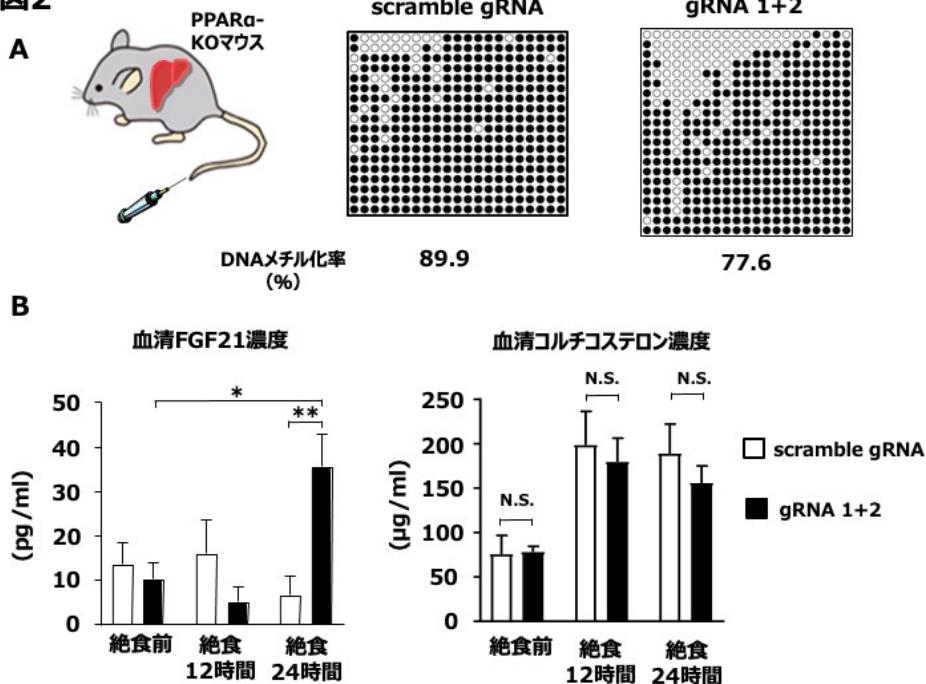
本研究では、まずマウス肝臓由来の株細胞である Hepa1-6 細胞に CRISPR-dCAS9-TET1CD 系によって、マウス FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化が導入できるかを検討した。さらに FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化の導入が、Hepa1-6 細胞の他の遺伝子の DNA メチル化状態及び発現にどのような影響を与えるか (オフターゲット効果の有無) をプロモーターメチル化アレイ及び発現マイクロアレイで検討した。これらの細胞での検討を行った上で、マウスの肝臓において CRISPR-dCAS9-TET1CD 系により、FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化を導入した。導入には CRISPR-dCas9-TET1CD 系とガイド RNA (gRNA) がすべて組み込まれた all-in one ベクターを用いた。

4. 研究成果

CRISPR-dCas9-TET1CD 系を用いて、FGF21 遺伝子特異的 DNA 脱メチル化をマウス肝細胞由来の株細胞である Hepa1-6 細胞に導入し、FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化に成功した (図 1 B, C)。gRNA は転写開始点の上流 (gRNA1)、および下流 (gRNA2) に設定した (図 1 B)。コントロールとしては scramble gRNA を用いた。DNA 脱メチル化効果は gRNA1 と gRNA2 の間では有意差はなかったが、gRNA1 と gRNA2 を両方導入すると (gRNA1+2)、DNA 脱メチル化効果は相加的に上昇した (図 1 C)。なお CRISPR-dCas9 系による「オフターゲット効果」は極めて軽微

であった。さらに FGF21 遺伝子特異的な DNA 脱メチル化が導入された Hepa1-6 細胞における FGF21 遺伝子の発現は、対照群と比較して定常状態では発現に有意な差異は認めなかったが、核内受容体 PPAR α の特異的リガンド (SPPARM α) である K-877 (ペマフィブラート)を添加して

図2



刺激に対する発現応答反応の程度を規定することが示唆された。さらに *in vivo* での FGF21 遺伝子特異的 DNA 脱メチル化の導入とその効果を検討するため、FGF21 遺伝子が高度に DNA メチル化を受けている PPAR α ノックアウトマウスに、Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi)法を用いて尾静脈から all-in one ベクターを注入した(図2A左)。導入後6日に肝臓のDNAメチル化状態を確認したところ、scramble gRNAと比較して、gRNA1+2導入群で有意にDNA脱メチル化が誘導されており、*in vivo*においてもCRISPR-dCas9-TET1CD系を用いてFGF21遺伝子特異的DNA脱メチル化を誘導できることが明らかとなった(図2A右)。絶食下ではコルチコステロンの分泌が亢進し、Glucocorticoid Receptorを介してPPAR α 非依存的にFGF21遺伝子の発現が上昇することが知られている。そこでPPAR α ノックアウトマウスを用いてHTVi4日後から24時間の絶食を行ったところ、血清コルチコステロンはscramble群、gRNA1+2群のいずれでも上昇し、かつこの2群で有意差を認めなかった(図2B右)。一方、血清FGF21濃度は、有意差をもってgRNA1+2群で上昇し、gRNA1+2群ではFGF21遺伝子特異的なDNA脱メチル化が誘導されたことでコルチコステロンによるFGF21遺伝子発現の刺激に対する応答性が上昇したものと考えられた(図2B左)。このようにCRISPR-dCas9-TET1CD系によるFGF21遺伝子特異的DNA脱メチル化の導入により、FGF21遺伝子のDNAメチル化状態の差異は、定常状態におけるFGF21遺伝子発現には反映されないが、FGF21遺伝子発現を活性化するような環境刺激に対する反応性の発現応答の程度を規定することが示唆された。

(図の説明)

図1 CRISPR-dCas9-TET1CD系によるFGF21遺伝子特異的DNA脱メチル化の導入

A: CRISPR-dCas9-TET1CD系の模式図。all-in oneベクター(上段)にはガイドRNA (gRNA)に22アミノ酸リンカーで5つに分割されたGCN4ペプチドが融合したdCas9が結合しており、スパーサー(2a)を挟んでsingle-chain variable fragment (scFv)とsuper folder GFP(sfGFP)およびTET1CDが融合している。all-in oneベクターからのタンパク発現時にスパーサー(2a)部分で2つに分かれる。gRNA-dCas9によって標的配列近傍に誘導された5つのGCN4ペプチドにミニ抗体であるscFvが結合することでTET1CDが働き、標的配列近傍でDNA脱メチル化をおこす(下段)。

B: マウスFGF21遺伝子(*Fgf21*)プロモーターとCpGサイトの位置(模式図)

*Fgf21*プロモーター周辺のCpGサイト、すなわちDNAメチル化変化を受ける部位を○で示す。全部で21のCpGサイトが存在する。TSS: Transcription start site(転写開始点)。網掛けはPPRE(PPAR応答領域)。gRNA1とgRNA2の設定位置をバー(横棒)で示す。bp:塩基対。

C: バイサルファイトシークエンス法による*Fgf21*のDNAメチル化状態の解析

トランスフェクション後2日目(day2)にall-in oneベクターに組み込まれているGFPを標識とし、蛍光フローサイトメトリーにてセルソーティングを行い、バイサルファイトシークエンス法でDNAメチル化状態を確認。白丸がDNA脱メチル化を、黒丸がDNAメチル化を受けたCpGサイトを表す。

D: *Fgf21* mRNA発現変化

FGF21遺伝子の発現を促進すると、FGF21遺伝子特異的なDNA脱メチル化が導入されたHepa1-6細胞におけるFGF21遺伝子の発現は、対照群と比較して有意に上昇することが明らかとなった(図1D)。さらにその上昇の程度はDNA脱メチル化の程度を反映していた。すなわちある遺伝子のDNAメチル化状態は

all-in one ベクターをトランスフェクションした後の day2 に K-877 を投与し、day4 に細胞を回収し発現を逆転写 PCR 法で確認した。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, N.S., not significant

図 2 Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法による *Fgf21* 特異的 DNA 脱メチル化の導入とその機能解析

A: all-in one ベクターをマウス尾静脈から注入し、day6 に肝臓の DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンス法で確認した。白丸が DNA 脱メチル化を、黒丸が DNA メチル化を受けた CpG サイトを表す。

B: 絶食処置による血清 FGF21 (左) およびコルチコステロン濃度 (右) の変化

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, N.S., not significant

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hanzawa Nozomi, Hashimoto Koshi, Yuan Xunmei, Kawahori Kenichi, Tsujimoto Kazutaka, Hamaguchi Miho, Tanaka Toshiya, Nagaoka Yuya, Nishina Hiroshi, Morita Sumiyo, Hatada Izuho, Yamada Tetsuya, Ogawa Yoshihiro	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） 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 Kawahori Kenichi, Kondo Yoshitaka, Yuan Xunmei, Kawasaki Yuki, Hanzawa Nozomi, Tsujimoto Kazutaka, Wada Fumiko, Kohda Takashi, Ishigami Akihito, Yamada Tetsuya, Ogawa Yoshihiro, Hashimoto Koshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Ascorbic acid during the suckling period is required for proper DNA demethylation in the liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77962-7	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 橋本 貢士	4. 巻 53
2. 論文標題 周産期栄養とエピジェネティクス	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児内科	6. 最初と最後の頁 1818-1824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋本 貢士	4. 巻 39
2. 論文標題 DOHaD学説における肥満症の個人差と精密医療への展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 767-774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 橋本 貢士	4. 巻 276
2. 論文標題 2型糖尿病および肥満におけるDNAメチル化の最新知見	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 453-457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 橋本貢士
2. 発表標題 DOHaD 学説とエピゲノム記憶
3. 学会等名 第42回日本臨床栄養学会総会・第41回日本臨床栄養協会総会 第18回大連合大会 シンポジウム 「栄養シグナルと食物アレルギー」 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koshi Hashimoto
2. 発表標題 Epigenetics in early life, which affects obesity in later life
3. 学会等名 The International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups 2020 meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本貢士
2. 発表標題 CRISPR/dCas9 系による Fibroblast growth factor 21 遺伝子特異的 DNA 脱メチル化の導入
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第4回大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本貢士
2. 発表標題 Developmental Origins of Health and Disease(DOHaD)学説の見地に立った肝臓でのDNA脱メチル化におけるビタミンCの重要性
3. 学会等名 日本ビタミン学会第73回大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔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