

二国間交流事業 共同研究報告書

令和4年4月18日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[代表者所属機関・部局]
 東京大学・先端科学技術研究センター
 [職・氏名]
 教授・岡本 晃充
 [課題番号]
 JPJSBP1 120199919

1. 事業名 相手国: セルビア (振興会対応機関: OP) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) メチルフィッシュ法による新規 DNA(脱)メチル化分子の同定: 糖尿病低減への応用

(英文) Identification of a novel DNA (de)methylating agents using MeFISH method: Potential application in the treatment of diabetes

3. 共同研究全実施期間 2019年4月1日 ~ 2022年3月31日 (3 年 0 ヶ月)

4. 相手国代表者(所属機関・職・氏名【全て英文】)

University of Belgrade • Group Leader • Melita Vidaković

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,770,000 円
内訳	1年度目執行経費	1,870,000 円
	2年度目執行経費	1,900,000 円
	3年度目執行経費	円

6. 共同研究全実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	4 名
相手国側参加者等	2 名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	2		0
2年度目			0
3年度目			0
4年度目			0

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 本委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入:相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は本委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流実績の概要・成果等

(1)研究交流実績概要(全期間を通じた研究交流の目的・研究交流計画の実施状況等)

MeFISH 用プローブ (ICON プローブ) 作製に関する打ち合わせに基づいて、観察に適した高感度な ICON プローブを設計・合成した。ICON プローブは CXCL12 遺伝子のプロモーターおよび第一イントロン領域の既知のプライマーを用いて設計された。

INS1-1: biotin-taagtagaggtgttgacBtccaatgagcgctttctgcagacctagcacca

INS1-2: biotin-taagtagaggtgttgacgtccaatgagcBctttctgcagacctagcacca

INS2-1: biotin-ctcctctcttacBtgaaacttttctctcctcaaccagcctatcttcca

INS2-2: biotin-tgtttcaacatggccctgtggatgcBcttctgccctgctggccctgt

INS3-1: biotin-acctggtgtgtggggagcBtggtcttctctacacccatgtcccgcgt

INS3-2: biotin-acacccatgtcccBccgtgaagtggaggaccacaaggtgagttctgcca

INS3-3: biotin-acacccatgtcccgccBtgaagtggaggaccacaaggtgagttctgcca

これらのプローブが合成されて、質量分析計を用いて構造の確認を行った。セルビアを訪問し、イメージング試料の受渡しおよび実験の指導(2019 年7月)を行った。その後、ICON プローブを用いた MeFISH による1細胞イメージングが進行中であり、新型コロナウイルス感染症による渡航自粛期間中は、ウェブ会議やメール会議を通じてディスカッションを行った。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

これまでの研究は、糖尿病状態におけるその遺伝子発現に影響を及ぼす CXCL12 遺伝子の DNA メチル化パターンの差異をゲル電気泳動やシーケンシングを用いて説明してきており、細胞間の多様性を犠牲にしてきた。糖尿病の減弱のための潜在的な薬物として使用することができる化合物を特定する潜在的可能性を示すためにも、細胞ごとにメチル化を視覚化することが重要である。岡本らが開発した MeFISH 法を用いることによって、解決できる可能性が出てきた。転写調節因子 PARP 1 が CXCL12 転写を部分的に抑制する効果を発揮する一方で、別の転写因子 YY1 は CXCL12 遺伝子の転写の強力に活性化する。DNA への特定の転写調節因子の結合に対して DNA のメチル化がどのように影響するか、およびこれが糖尿病における CXCL12 遺伝子発現へどのように影響するかを調べているところである。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

相手側研究者 Vidaković 博士は、これまで糖尿病に関連する CXCL12 遺伝子の転写について精力的に研究してきた。研究成果は、世界的に注目されており、Journal of Cell Biology、Journal of Molecular Biology、PLoS One などの国際一流誌に多数報告されている。当然のことながら遺伝子の転写は DNA のメチル化/脱メチル化によって強く制御されているわけで、CXCL12 遺伝子の転写について研究を進めていくうえで CXCL12 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態について調べるのが必須になる。Vidaković 博士は、CXCL12 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を効果的に可視化する方法を求めている。

一方、われわれは、最近、DNA のメチル化/脱メチル化の生成物である 5-メチルシトシンや 5-ヒドロキシメチルシトシンと選択的な化学反応とそれを効率化する化学プローブ (ICON プローブ) を創出している。これらは、他の区別すべき未修飾シトシンに対する反応性がきわめて低いため、染色体 DNA 内の修飾シトシンの配列選択的蛍光観察を可能にした。これは、Vidaković 博士が求めている CXCL12 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の可視化に有効な手法である。このように、われわれのシーズと候補者のニーズが良くマッチしており、それらの融合によって糖尿病研究に寄与する新手法が開発される可能性が出てきた。したがって、今回このような

協力研究を推進し、プローブの設計と合成を進め、いくつかの候補プローブを得た。現在、これらのプローブを用いて CXCL12 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の検出を進めている。

(4)社会的貢献(社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

糖尿病は洋の東西を問わず、大きな社会問題であり、薬剤投与によって簡便に体調が改善できるようになることが望ましい。DNA メチル化の視点から、糖尿病状態におけるその遺伝子発現に影響を及ぼす CXCL12 遺伝子の DNA メチル化パターンに着目した研究は、薬剤投与による DNA メチル化ダイナミクスにおける基礎的なデータを与えるだけではなく、DNA メチル化をベースにした細胞診断技術の開発と発展に役立つだろう。特に核酸レベルでの詳細な解析を必要とする糖尿病診断において強力なデータを提供するものと考ええる。また、糖尿病研究に力を入れているセルビアでは、本技術を最先端の DNA メチル化細胞診断に用いることが可能であり、DNA メチル化レベルからの詳細な細胞の解析への応用に対する発展が期待される。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取り組み、成果)

日本側の研究室の博士課程学生にとって、先進的な欧米諸国だけでなく、セルビアなどの東欧諸国の研究者とも接して幅広い国際感覚を身に着けることが必要である。また、セルビアの最先端病院での研究を現地で直に目の当たりにすることは、これからの学生の意識向上にとって極めて有意義である。当研究を遂行するためには化学合成、細胞計測、生物物理、分子生物学、細胞生物学などの多分野における先端的知識や技術が必要であり、学際的かつ橋渡しの思考を持つ若手研究者を育成するには非常に適した研究と言える。本研究は、スタッフや大学院生がセルビアの研究者と研究交流することができ、有意義な経験を提供することができた。

(6)将来発展可能性(本研究交流事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本研究交流事業を実施したことにより、CXCL12 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の検出のための足掛かりを得ることができた。膵β細胞の生存に不可欠である CXCL12 ケモカイン CXCL12 遺伝子の単一の CpG における DNA メチル化状態を顕微鏡で視覚化し、最終的な目標、カフェイン、アザシチジン、カルチニンが及ぼす CXCL12 遺伝子 DNA メチル化・脱メチル化への影響を明らかにしたい。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記述してください)

相手側研究者 Vidaković 博士を 2022 年 6 月に長期招へい研究者として、研究室へ迎える予定である。