

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15346

研究課題名(和文) 脂肪組織の褐色化と肥満の遺伝素因のゲノム・エピゲノム連関

研究課題名(英文) The Interplay between genome and epigenome in the browning of white fat cells and obesity

研究代表者

脇 裕典 (Waki, Hironori)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00466765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：白色脂肪組織は寒冷や薬物刺激により、熱産生でエネルギーを消費するUCP1を発現する褐色脂肪化を起こす。褐色化は抗肥満の治療戦略の一つとして注目されるが、褐色化のしやすさや肥満しにくさは、遺伝素因の影響が存在することが知られる。本研究では、褐色化のポテンシャルや肥満しにくさが異なるマウス近交系において、交感神経刺激による白色脂肪の褐色化、および皮下脂肪由来の初代培養脂肪細胞の褐色化について、遺伝子転写、エピゲノム解析を施行し、ゲノム多型情報と統合的に解析した。

研究成果の概要(英文)：Generation of brown-like fat cells that express UCP1--the critical protein that mediates energy dissipation in the form of heat--is observed in white adipose tissue of mice under a cold challenge or stimulation by an adrenergic agent. Browning potential of white adipose tissue and susceptibility for obesity are both known to be regulated by genetic factors. In this study, we conducted integrated genetic, epigenetic and gene transcriptional analyses on the browning of inbred mouse strains with different potential for browning.

研究分野：糖尿病・代謝内科学

キーワード：ゲノム エピゲノム オープンクロマチン エンハンサー SNP

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム上の DNA 塩基配列の多様性は疾患のかかりやすさを規定する。一塩基多型 (SNP) 情報を利用した疾患のゲノムワイド相関解析で同定される SNP の 90%以上は遺伝子から離れたゲノム領域に存在する。ENCODE プロジェクトなどによる網羅的なエピゲノム解析ではゲノム上の転写制御領域が遺伝子外の遠位エンハンサー領域として数多く存在し、そのような領域には疾患感受性 SNP が高頻度に存在することが示唆される。最近の系統的なヒト細胞の一連の解析では (Science 342:747-9, 2013; Science 342:744-7, 2013; Science 342:750-2, 2013)、ヒト集団においてヒストン修飾などのエピゲノムには予想以上に多様性があり世代間でも継承されること、また異なる系統のマウスのマクロファージを用いた検討では、炎症におけるエンハンサーがゲノム多型と関連する (Nature. 503: 487-92, 2013) などの知見から、ゲノム多型がエピゲノムを制御することが次第に明らかになりつつある。

エネルギーを蓄積する白色脂肪と対照的に、褐色脂肪はミトコンドリアの UCP1 を介してエネルギーを熱の形で消費し抗肥満に作用する。寒冷・薬剤などの環境要因により白色脂肪の褐色化することが知られる。ヒトに存在する褐色脂肪は年齢や肥満により減少し、寒冷刺激で活性が誘導される。白色脂肪組織の褐色化のしやすさ/しにくさ、過栄養環境下の太りやすさ/しにくさには、遺伝素因の影響が大きいことが、マウス近交系の研究で以前より知られるが、遺伝素因の影響が表現型の違いを及ぼすメカニズムは、長く明らかでなかった。

近年、次世代シーケンサーによるシーケンシング技術の発展により、遺伝素因を規定するゲノムや、遺伝子の転写制御を規定するエピゲノムを、網羅的に解析することが可能となった。近年の系統的なヒト細胞の一連の解析では、ヒトやマウスにおいてヒストン修飾などのエピゲノムはゲノム多型と密接に関連を有することなどの知見が得られており、エピゲノムとゲノムの関連の視点から、ゲノム背景の違いによる環境に誘導される白色脂肪の褐色化や肥満の発症が異なるメカニズムの解明が期待される。

## 2. 研究の目的

白色脂肪組織は寒冷や薬物刺激により、熱産生でエネルギーを消費する UCP1 を発現する褐色脂肪化を起こす。褐色化は抗肥満の治療戦略の一つであるが、褐色化のしやすさ・しにくさや太りやすさ・にくさ)は、遺伝素因の影響が存在することがマウス近交系の実験で知られ、治療のボトルネックとも考えられるがそのメカニズムは明らかでない。マウス近交系の脂肪組織でエピゲノム解析を行い、データベースで得られるゲノム多型 (SNP) や QTL 解析による褐色化を規定す

るゲノム領域と統合的な解析を行うことにより、「ゲノム多型」特異的なエピゲノム領域を同定し解析し、ゲノム多型が褐色化しやすさを規定するメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス近交系の脂肪組織

マウスの白色脂肪組織は、寒冷や薬剤投与などにより「褐色化」を起こすことが知られている。本研究では、A. 寒冷刺激としては脂肪組織の褐色化研究分野で標準的に用いられており熱産生遺伝子 UCP1 の mRNA 発現が十分に誘導される 4 °C、7 日間とし (Mol. Cell. Biol. 25: 8311-22, 2005.)、B. 薬剤投与としては、室温における 3 アドレナリン受容体および PPAR のアゴニスト (CL-316,243, 1 mg/kg; Rosiglitazone 10 mg/kg) の経口投与を行う。白色脂肪細胞は単径部皮下、生殖器周囲、後腹膜、腎周囲から褐色脂肪組織は肩甲骨間の組織を採取し、HE 切片を作成、抗 UCP1 抗体を用いた組織免疫染色により褐色化の程度を確認する。褐色化のゲノム背景の差が明確に表れるとされる後腹膜脂肪や皮下脂肪 (J. Clin. Invest. 102: 412-20, 1998) を重点的に解析する。

エピゲノム解析はベースラインとなる通常飼育時と、寒冷・薬剤などの褐色化誘導時に対して行う。脂肪組織における FAIRE (オープンクロマチン) は、浮遊しペレットが作れないという組織特有の手法上の困難点を解消したすでに最適化された方法を用いて施行する。脂肪組織における ChIP (クロマチン免疫沈降) は組織内に含まれる脂肪成分による免疫沈降の阻害を防ぐための方法を、細胞株での手技 (PLoS Genet. 7(10) e1002311, 2011) や既報 (Cell Metab. 17: 562-74, 2012, Mol. Cell. Biol. 32: 3452-63, 2012) をもとに核抽出を含めるプロトコルに最適化する。ChIP においては、エンハンサーやプロモーターなどの転写制御領域の同定に重要なヒストン修飾であるヒストン H3K4me3 (リジン 4 トリメチル化) H3K4me1 (リジン 4 モノメチル化) ヒストンアセチル化 (H3K27ac など) を、転写因子においては PPAR, C/EBP などの制御因子に対する特異抗体を用いる。qPCR によりゲノム上の褐色遺伝子近傍の褐色特異的なエンハンサー領域で、系統間の差がエンハンサーの違いに反映されていることを確認する。

### 2) マウス近交系の脂肪組織由来の脂肪細胞褐色化の解析

1) で計画する臓器におけるエピゲノム解析とは独立した初代培養細胞および由来する細胞株の実験系を確立する。初代培養細胞を用いた実験を行う目的は、脂肪を大量に含む脂肪組織特有の ChIP の困難性を回避すること、細胞株などのハンドリングしやすく再現しやすい安定した実験系を作ることに加えて、脂肪細胞の臓器における系統間

の差が、交感神経刺激や血流など他臓器からの影響の差に起因するか、細胞に内因性に内在する細胞自律的(cell autonomous)な相違に起因するかの鑑別に使用できることを含む。臓器の採取においては既報の脂肪組織からの初代培養細胞の単離プロトコルを(J. Vis. Exp.(73) 1-6, 2013)を参考にする。

### 3) マウス近交系のゲノム・エピゲノムの統合的解析

マウス近交系のゲノム(SNP)情報は、公開されているデータベースを用いる。マウス近交系でベースライン時および寒冷・薬剤による褐色化誘導時において、上記を系統間で比較する。実際にそのようなエンハンサー領域のエピゲノム変化が近傍の遺伝子の mRNA の転写に作用しているかどうかトランスクリプトーム解析により検討する。系統特異的なエピゲノム領域において、系統間のゲノム SNP の相違を合わせて解析することにより、「ゲノム多型」に特異的なエピゲノム領域を同定することができる。また、転写因子のモチーフ解析および褐色化を制御する転写因子の ChIP 情報とゲノム多型の情報を組み合わせることによりどのような因子が種選択的なエピゲノム変化を起こすか解析する。RNA 発現解析やゲノム領域間同士の近接性をみる Hi-C 法などにより検証する。

### 4. 研究成果

肥満しにくく白色脂肪が褐色化しやすいマウス近交系と肥満しやすく褐色化しにくいマウス近交系で、交感神経刺激による褐色化を行ったときに、組織レベル(HE 染色、UCP1 免疫組織化学)で白色脂肪の褐色化の誘導の程度にゲノム背景による差を認めた。また mRNA レベルでは褐色脂肪に特異的な UCP1 や他の遺伝子群の誘導がみられるが、マウス近交系によりその誘導の程度が異なった。

これらのマウス近交系の皮下脂肪組織と褐色脂肪組織から初代脂肪細胞およびそれ由来の不死化細胞の褐色脂肪化の培養条件を最適化させ確立した。褐色化のポテンシャルが異なるマウス近交系由来の褐色脂肪では、脂肪蓄積の程度や PPAR $\gamma$ , Fabp4 などの mRNA の発現量は同程度であるにもかかわらず、UCP1 などの mRNA の発現量は、個体レベルの白色脂肪の褐色化の差と同様に差を認め、脂肪細胞の臓器における系統間の差が、脂肪細胞に内因性に内在する細胞自律的(cell autonomous)な相違に起因することが示唆された。これらの細胞に対し、網羅的な mRNA 発現解析およびエピゲノム解析を施行し、褐色脂肪遺伝子群の近傍で種選択的なエンハンサー領域を見出した。また、褐色化のポテンシャルが異なる二つのマウス近交系を掛け合わせて得られた F1 マウスを作成し、その皮下脂肪から単離した褐色脂肪細胞分化系を確立した。これらの細胞における mRNA 発現およびエピゲノム解析を行い、その情報

とマウス近交系のゲノム(SNP)情報を統合した解析を行ったところ、上述の種選択的なオープンクロマチン領域の多くでは複数のゲノム多型が含まれていた。それらヘテロのゲノム多型の含まれる割合を検討すると、Input となるゲノム DNA では父母由来のそれぞれのアリルが 50%ずつ検出されるのに対して、種選択的なオープンクロマチン領域の一部の領域では褐色化のポテンシャルが高い種のゲノム多型がより多く含まれるアリルインバランスが認められ、これらのエンハンサー領域は cis に作用する重要な領域であることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計5件)

浅原俊一郎、木戸良明、脇裕典、山内敏正、門脇孝、糖尿病とエピジェネティクス、アンチ・エイジング医学、査読無、012(6)、2017、pp783-790

脇裕典、山内敏正、門脇孝、クレアチン無益回路はベージュ細胞のエネルギー消費と熱産生を制御する、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、43(4)、2016、pp338-342

脇裕典、山内敏正、門脇孝、【アディポサイエンス・フロンティア】アディポサイエンス・ベーシック エピジェネティクスのフロンティア、Diabetes Frontier、査読無、27(3)、2016、pp282-287

脇裕典、山内敏正、門脇孝、【臓器連関による代謝制御を中心とした恒常性維持と生活習慣病】褐色脂肪細胞と生活習慣病、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、42(5)、2016、pp329-336

青山倫久、脇裕典、山内敏正、門脇孝、肥満関連ゲノム領域と FT0/IRX3 の関連と意義、内分泌・糖尿病・代謝内科、査読無、40 巻 4 号、2015、pp306-311

#### [学会発表](計1件)

脇裕典、(シンポジウム 1A8 熱産生能の分子生物学)褐色脂肪特異的な遺伝子プログラムの制御と NFIA と PPAR の共局在、第 39 回 日本分子生物学会年会、2016 年 11 月、横浜

#### [図書](計1件)

脇裕典(章担当)、門脇孝、荒木栄一、稲垣暢也、植木浩二郎、羽田勝計、綿田裕孝(編集)、西村書店、糖尿病学 章:脂肪組

織（白色・褐色） 2015年、総 636 ページ

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇 裕典 (Hironori Waki)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：00466765

(2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

該当なし ( )