

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390240

研究課題名(和文) DNAメチル化に着目したメタボリックメモリーの分子機構の解明と医学応用

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Metabolic Memory via a DNA Methylation and Its Medical Application

研究代表者

小川 佳宏 (Ogawa, Yoshihiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70291424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：新生仔期の肝臓では新規脂肪合成の律速酵素GPAT1遺伝子プロモーター領域がDNAメチル化されているために抑制されるが、離乳期にはDNA脱メチル化により誘導されることが判明し、GPAT1遺伝子発現と肝臓脂肪合成はDNAメチル化により制御されることが示唆された。一方、出生直後から離乳前の新生仔マウスの肝臓ではDNAメチル化が減少して発現が増加する遺伝子の多くが脂肪酸酸化経路を構成する酵素群であり、このDNA脱メチル化はPPAR依存的事であることが明らかになった。以上より、胎仔期～新生仔期の肝臓における脂質代謝のエピゲノム制御には乳中の脂質リガンドが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed epigenetic regulation of lipid metabolism in mouse liver in perinatal periods. In neonatal periods, DNA methylation of de novo lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1) gene (Gpam) promoter suppresses the gene expression, whereas Gpam expression is induced in the weaning period via a DNA demethylation mechanism. This suggests de novo mouse hepatic lipogenesis in perinatal periods is regulated by DNA methylation. We also analyzed DNA methylation in neonatal mouse liver from the birth to weaning. It revealed that fatty acid beta-oxidation enzymes were highlighted among the genes, which showed DNA demethylation and increased gene expression in postnatal periods. We also demonstrated that the DNA demethylation is peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha dependent. This study shed a light on the importance of intrinsic lipid ligands in milk in the epigenetic regulation of lipid metabolism in perinatal mouse liver.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：DNAメチル化 肝臓 脂肪酸 酸化 PPAR 新規脂肪合成 新生仔

### 1. 研究開始当初の背景

過食や運動不足に代表される生活習慣の欧米化に伴って急増している生活習慣病は、環境因子と遺伝素因の複雑な相互作用により発症する代表的な多因子疾患であり、この相互作用の分子基盤の一つとして DNA やヒストンの後天的な修飾による遺伝子発現制御 (エピジェネティクス) の機序が関与すると考えられている。

多くの疫学調査や動物モデルを用いた研究により、胎生期の栄養環境と成人期に発症する肥満や生活習慣病の関連が指摘されている (Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD)。すなわち胎生期 (= 妊娠期) ~ 新生児期 (= 授乳期) の栄養環境が何らかの形で特定の遺伝子のエピゲノムに記憶され (メタボリックメモリー)、成人期における生活習慣病に対する疾患感受性が決定される可能性が示唆されている。

新生児期のマウスの肝臓では *de novo* (新規) 脂肪合成は比較的低いが、離乳とともに急増することが知られており、これは母乳中には糖質が少なく脂質が豊富なため糖質から脂質を合成する必要がないことによるとされている。このため、新生児期の栄養環境や離乳の時期が成獣期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性がある。我々は、離乳後に新規脂肪合成の律速酵素である glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1) の遺伝子発現が増加すること、成獣期では新生児期に比較してプロモーター領域の sterol regulatory element binding protein (SREBP) 応答配列 (SRE) の DNA メチル化が減少することを見出した。さらに、離乳前の新生児マウスの肝臓では、GPAT1 遺伝子プロモーターの SRE に *de novo* DNA メチル化酵素である DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b) が結合すること、成獣期では DNA メチル化の減少に並行して結合が減弱することを証明した。これらの研究成果により、胎仔期あるいは個体の成長が著しい新生児期では全身臓器の可塑性が高い時期であるため、胎生期や離乳前後の急激な栄養環境の変化が DNA メチル化によるメタボリックメモリーとしてエピゲノムに記憶され、成獣期に発症する生活習慣病に対する疾患感受性を決定する可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来全く知見のなかった新生児期の肝臓における脂質代謝のエピゲノム記憶の分子機構の解明を目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、マウスの新生児期にプロモーター領域の DNA メチル化と遺伝子発現が変動する肝脂肪合成酵素を同定し、成獣期に発症する肥満やインスリン抵抗性あるいは脂肪肝との関連を検討した。更に MIAMI 法 (Microarray-based Integrated Analysis of

Methylation by Isoschizomers) (Oncogene 25: 3059-3064, 2006) を用いて、出生直後から離乳前の新生児マウスの肝臓においてプロモーター領域の DNA メチル化の変化を網羅的に解析した。この MIAMI 法と遺伝子発現アレイのデータを組み合わせて解析することで DNA メチル化と遺伝子発現が逆相関する遺伝子群を同定した。

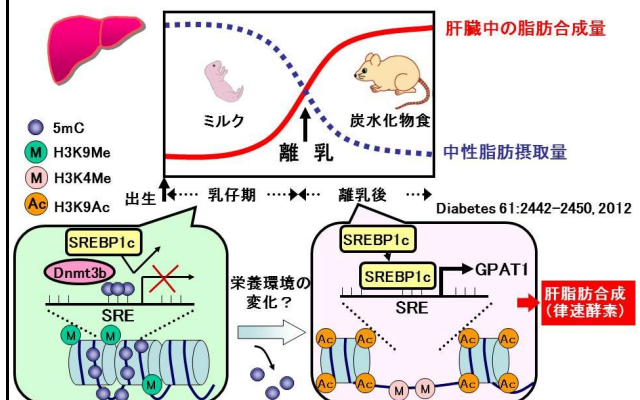
### 4. 研究成果

肝臓新規脂肪合成の律速酵素 GPAT1 遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化の程度は遺伝子発現と逆相関していた。DNA メチル化の変化は GPAT1 遺伝子プロモーターに特異的であり、他の脂肪合成遺伝子 (FAS、SCD1) には認められなかった。

また培養細胞を用いた検討により、DNA メチル化を有する GPAT1 遺伝子プロモーターは DNA メチル化を有しないものと比較して転写活性が抑制されることが明らかになった。

以上より、マウスの胎仔期 ~ 新生児期にかけて肝臓において DNA メチル化の変化により GPAT1 遺伝子はエピゲノム制御を受けることが示唆された。さらに新生児期の肝臓では、DNA メチル化酵素 Dnmt3b により GPAT1 遺伝子プロモーター領域が DNA メチル化されることにより転写因子 Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)-1c のリクルートが阻害され、GPAT1 の遺伝子発現が誘導されず、一方、離乳期には脱メチル化されて SREBP-1c がリクルートされるようになり、GPAT1 の遺伝子発現が誘導され、脂肪合成が行われることが判明した。すなわち GPAT1 遺伝子発現と肝臓脂肪合成は DNA メチル化により制御を受けることが示唆された。我々はこれらの知見をまとめて論文発表した (Diabetes 61: 2442-2450, 2012)。DNA 脱メチル化の分子機構の解明は今後の課題である (図)。

## GPAT1 遺伝子発現のエピゲノム制御



DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法により、出生直後から離乳前の新生児マウスの肝臓においてプロモーター領域の DNA メチル化と遺伝子発現が逆相関する脂質代謝関連遺伝子を多数同定した。興味深

いことに、これらの多くが脂肪酸β酸化経路を構成する酵素群であることが判明した。

さらに転写因子結合モチーフ解析により、一連の遺伝子プロモーター領域に核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor-α (PPARα) との結合配列が高頻度に出現することを見出した。

PPARα 欠損マウスを用いた検討と母獣マウスの PPARα リガンド投与実験により、出生直後から離乳前の新生仔マウスにおける脂肪酸β酸化経路の DNA 脱メチル化は、PPARα 依存的であることを明らかにした。以上により、塩基配列特異性を有する核内受容体 PPARα が活性化されて標的遺伝子のプロモーター領域に DNA メチル化制御因子をリクルートして DNA メチル化と転写活性の変化をもたらすことが示唆された。

#### 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10件)

- (1) 亀井康富, 橋本貢士, 小川佳宏 内分泌基礎分野での進歩 胎児期~新生児期の環境とエピジェネティクス制御 **Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌** 2014 138-144, 2014
- (2) Takahashi M, Kamei Y, Ehara T, Yuan X, Suganami T, Takai-Igarashi T, Hatada I, Ogawa Y. Analysis of DNA methylation change induced by Dnmt3b in mouse hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 434: 873-878, 2013.
- (3) Takizawa F, Mizutani S, Ogawa Y, Sawada N Glucose-independent persistence of PAI-1 gene expression and H3K4 tri-methylation in type 1 diabetic mouse endothelium: implication in metabolic memory. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 433: 66-72, 2013
- (4) Kohmura YK, Kanayama N, Muramatsu K, Tamura N, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Aoe S, Sasaki T, Suganami T, Ogawa Y, Itoh H Association between body weight at weaning and remodeling in the subcutaneous adipose tissue of obese adult mice with undernourishment in utero **Reprod. Sci.** 20: 813-827, 2013.
- (5) Yogosawa S, Mizutani S, Ogawa Y, Izumi T Activin receptor-like kinase 7 suppresses lipolysis to accumulate fat in obesity through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . **Diabetes** 62:115-123, 2013
- (6) 亀井康富, 小川佳宏 基礎講座 体質からみた糖尿病 ジェネティクス・エピジェネティクス **糖尿病とエピジェネティクス Diabetes Frontier** 24: 447-452, 2013

- (7) 亀井康富, 小川佳宏【エピジェネティクスと病気】(第2章)エピジェネティクスと病気 環境相互作用・多因子疾患 **糖尿病 遺伝子医学 MOOK** 25: 112-116, 2013
- (8) Ehara T, Kamei Y, Takahashi M, Yuan X, Kanai S, Tamura E, Tanaka M, Yamazaki T, Miura S, Ezaki O, Suganami T, Okano M, Ogawa Y. Role of DNA methylation in the regulation of lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver. **Diabetes**.61: 2442-2450, 2012.
- (9) 亀井康富, 小川佳宏【糖尿病とその合併症の成因~最新の知見~】**エピゲノムと糖尿病 最新医学** 67: 27-31, 2012
- (10) 江原達弥, 亀井康富, 高橋真由美, 袁勳梅, 小川佳宏【世代を超えて伝わる代謝エピジェネティクス】**栄養環境と代謝のエピジェネティクス 実験医学** 29: 2217-2222, 2011

[学会発表](計9件)

- (1) Ogawa Y Regulation of Metabolic Genes by DNA Methylation. **8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease** 2013年11月17日~20日 SUNTEC, Singapore (招待講演)
- (2) 江原達弥, 亀井康富, 袁勳梅, 高橋真由美, 田村江梨奈, 菅波孝祥, 高井貴子, 畑田出穂, 橋本貢士, 小川佳宏 乳仔期のマウス肝臓における代謝関連遺伝子の DNA メチル化変動の解析 **第34回日本肥満学会** 2013年10月11日~12日 東京
- (3) 亀井康富, 江原達弥, 高橋真由美, 袁勳梅, 小川佳宏 栄養とエピゲノム 肝臓脂質代謝のエピジェネティクス制御 **第67回日本栄養・食糧学会大会** 2013年5月24日~26日 名古屋
- (4) 小川佳宏 肝臓における糖脂質代謝のエピゲノム制御 **第56回日本糖尿病学会年次学術集会** (招待講演) 2013年05月16日~18日 熊本
- (5) 小川佳宏 肝臓における脂質代謝のエピゲノム **第35回日本分子生物学会年会** (招待講演) 2012年12月11日~14日 福岡
- (6) 亀井康富, 江原達弥, 高橋真由美, 袁勳梅, 金井紗綾香, 山崎聖美, 江崎治, 菅波孝祥, 岡野正樹, 小川佳宏 マウス新生仔肝臓の脂肪合成遺伝子の DNA メチル化制御 **第66回日本栄養・食糧学会大会** 2012年5月18日~20日 仙台
- (7) 小川佳宏, 亀井康富 栄養環境がもたらすエピゲノム変化 **第6回日本エピジェネティクス研究会年会** (招待講演) 2012年05月14日~15日 東京
- (8) 亀井康富, 小川佳宏 栄養とエピジェネティクス 生活習慣病と DNA メチル化

**第 65 回日本栄養・食糧学会大会 2011**

年 5 月 13 日～15 日 東京

- (9) 江原達弥, 亀井康富, 金井紗綾香, 高橋真由美, 袁勳梅, 菅波孝祥, 小川佳宏 **グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素 (GPAT1) 遺伝子の DNA メチル化による発現制御** 第 31 回日本肥満学会 2010 年 10 月 1 日～2 日 前橋

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 橋本貢士, 小川佳宏 **疾患とエピジェネティクス 糖尿病 イラストで徹底理解するエピジェネティクスキーワード事典** 牛島俊和、眞貝洋一編 羊土社 2013
- (2) 栄養とエピジェネティクス - 食による身体変化と生活習慣病の分子構造 - ネスレ栄養科学会議 監修 小川佳宏, 加藤茂明, 塩田邦郎, 中尾光善, 酒井寿郎, 福岡秀興 共著 建帛社 2012

〔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

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子内分泌代謝学分野

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/index.html>

!

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川佳宏 (Ogawa, Yoshihiro)

(東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授)

研究者番号：70291424

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

岡野正樹 (Okano, Masaki)

(理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー)

研究者番号：50360863