

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293209

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞特異的転写制御におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割

研究課題名(英文) Chromatin Dynamics and Epigenetic Regulation of Brown-Fat-Specific Transcription

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) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：褐色脂肪の発生のメカニズムを明らかにする目的で、マウス褐色脂肪組織、白色脂肪組織において、in vivoのFAIRE-seqを施行し、褐色脂肪に特異的な転写制御を担う新たな転写因子としてNFIAを見出した。ChIP-seqによるゲノム上の結合領域の解析や培養細胞および欠損マウスの解析を通して、NFIAが白色脂肪のマスターレギュレーター転写因子であるPPAR γ をエンハンサー上にリクルートすることで、褐色脂肪特異的な転写制御をする機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To gain insight into the underlying mechanism of brown fat development, we performed formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements analysis coupled with high-throughput sequencing (FAIRE-seq) of murine brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT). Through motif analysis of BAT-specific open chromatin regions and expression analysis, we identified NFIA as a novel regulator of brown adipocyte differentiation. Using cell culture, NFIA knockout mice, and chromatin immunoprecipitation coupled with high-throughput sequencing (ChIP-seq), we demonstrated that NFIA controls the BAT-specific gene program by activating the cell-type-specific enhancers and facilitating the binding of the adipogenic master regulator, PPAR

研究分野：糖尿病・代謝内科学

キーワード：褐色脂肪細胞 脂肪細胞 エピゲノム クロマチン 遺伝子 転写制御 分化 肥満

1. 研究開始当初の背景

肥満とそれに起因するメタボリックシンドロームは本邦を含め世界中で増加の一途をたどっている(WHO,2012)。肥満研究において、近年褐色脂肪細胞の生物学が注目されている。その背景には(1)ヒト成人においても機能的な褐色脂肪組織が存在することが相次いで報告されたこと(N Engl J Med 2009: 1500-8, 1518-25, 1509-17, Diabetes 2009:1526-31)、(2)褐色脂肪細胞分化制御の分子メカニズムや分化系統が示されたこと(Cell metabolism 2007 38-54, Nature 2008 961-7, Nature 2009 1154-1158)、(3)古典的褐色脂肪細胞とは由来が異なる誘導型の褐色脂肪細胞(Beige/BRITE 細胞)の存在があげられる。

90年代から分子メカニズムが研究された白色脂肪細胞分化と比較して褐色脂肪細胞の分化過程や転写制御の特異性は未だ不明な点が残されている。褐色脂肪細胞分化や転写制御に重要な役割を果たす PRDM16 や PGC1 α は DNA に直接結合しない「コファクター」としてその大部分の作用を発揮しているが、PRDM16 や PGC1 α の既知結合因子である PPAR γ や C/EBP β は褐色と白色脂肪細胞に共通する因子である。褐色細胞「特異的」な転写制御メカニズムの研究に、次世代シーケンサーを用いた FAIRE-seq/ChIP-seq 及びモチーフ解析など「ゲノム DNA 結合」レベルでの解析は他の手法で得られない有用な情報を生み出すと予測され本研究を施行した。

2. 研究の目的

近年注目されている褐色脂肪細胞について、in vivo の褐色脂肪細胞・白色脂肪細胞、また in vitro の筋細胞から褐色脂肪細胞へのリプログラミング系において、FAIRE-seq や ChIP-seq を用いたクロマチン構造変化とエピゲノムの解析を施行し、褐色特異的な転写制御メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

In vivo の褐色脂肪組織と皮下・生殖器周囲白色脂肪組織、in vitro の褐色脂肪細胞リプログラミング系において次世代シーケンサーを用いた FAIRE-seq と ChIP-seq によるエピゲノム解析を施行する。Bioinformatics による結合モチーフ解析により褐色脂肪特異的な転写制御の新規因子を探索する。得られた候補因子について、その組織発現プロファイリング、過剰発現やノックダウン、ノックアウトマウスなどの遺伝子工学的手法を用いることにより、その生理的な役割を検討する。また、白色・褐色脂肪のマスターレギュレーターである PPAR γ との機能的、直接的な相互作用がないか明らかにする。

4. 研究成果

In vivo の脂肪組織を用いてオープンクロ

マチン領域を同定する FAIRE の手法を最適化した。次世代シーケンサーを用いて、褐色脂肪組織と皮下・生殖器周囲白色脂肪組織について FAIRE-seq を施行し、全ゲノム上でそれぞれ、24,322、10,012、12,656 か所のオープンクロマチン領域を同定した。褐色脂肪特異的なオープンクロマチン領域は、褐色脂肪特異的な遺伝子の黄近傍に存在していた。この領域のゲノム DNA 配列のモチーフ解析を施行したところ、既知の褐色脂肪の転写制御因子として知られる EBF2 や C/EBP β の結合モチーフとともに、転写因子 NFI の結合モチーフが同定された。NFI のアイソフォームのうち NFIA は特に骨格筋や白色脂肪と比較して、褐色脂肪での発現量が高かった。褐色脂肪と系譜を同一にする筋芽細胞に NFIA を導入すると、脂肪滴の蓄積が認められ、網羅的な遺伝子発現パターンや酸素消費量の測定結果から、機能的にも褐色脂肪に変換していた。一方ノックダウンの実験では、褐色特異的な遺伝子の発現低下を認め、生理的に重要な役割を果たしていることが示唆された。

NFIA の ChIP-seq によるゲノム上の結合領域を検討したところ、褐色脂肪特異的なオープンクロマチン領域の多くに NFIA が結合しており、その発現パターンは白色・褐色共通の脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ の結合領域ともオーバーラップしていた。NFIA の結合、もしくは NFIA と PPAR γ が共存しているエンハンサーは白色のそれと比較し、褐色脂肪遺伝子の近傍に濃縮していた。NFIA と PPAR γ はこれらのエンハンサーで共存しており、機能的には NFIA が PPAR γ の褐色脂肪特異的なエンハンサーへの結合を促進した。

新生児期の NFIA 欠損マウスを用いた解析では、褐色脂肪の発生や組織の大きさは保たれていたものの、褐色脂肪特異的な遺伝子群の発現が有意に減弱しているのに対し、筋遺伝子群の発現が上昇していた。さらに、ヒト褐色脂肪においても NFIA の発現上昇が認められた。

以上の成果から、NFIA が褐色脂肪特異的なエンハンサー上で、PPAR γ と共局在することにより褐色脂肪特異的な転写を実現することが明らかになった。

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9件)

脇裕典, 山内敏正, 植木浩二郎, 門脇孝, 明らかにする褐色脂肪組織の機能:今,第三の細胞が目覚める ヒト褐色脂肪細胞の細胞系譜 古典的褐色脂肪細胞か,ページU/Brite 細胞か?, 細胞工学, 査読無し, 32(7), 2013年6月, p759-762

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝, 糖尿病と遺伝子 4. 糖尿病とエピゲノム、**糖尿病**、査読無し、57(2)、2014年2月、p91-93

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝, エピゲノムと肥満症、**医学のあゆみ** (第5土曜特集 肥満の医学: 臨床と研究の最先端)、査読無し、250(9)、2014年8月、p797-801

中村正裕, 脇裕典, III プロトコール エピゲノム C.クロマチンアクセシビリティ解析 2. オープンクロマチンを同定する FAIRE-seq、**実験医学別冊 次世代シーケンス解析スタンダード**、査読無し、2014年9月、p195-203

脇裕典, 褐色細胞組織の機能制御とその破綻 (第5土曜特集 糖尿病のすべて) -- (基礎研究の最前線)、**医学のあゆみ**、査読無し、252(5)、2015年1月、p415-419

平池 勇雄, 脇裕典, エネルギー代謝と遺伝子発現調節 (第5回) 脂質代謝調節転写因子 PPAR、*The Lipid*、査読無し、26(4)、2015年10月、p403-407

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝, 糖尿病のエピゲノム研究の展開、*Diabetes Journal* 糖尿病と代謝、査読無し、44(1)、2016年1月、p1-7

脇裕典, 山内敏正, 門脇孝, 【生活習慣病と栄養~カルシウム・ミネラル管理の側面より~】 エピジェネティクスと生活習慣病、*Clinical Calcium*、査読無し、26(3)、2016年3月、p426-432

Hiraike Y, Waki H, Yu J, Nakamura M, Miyake K, Nagano G, Nakaki R, Suzuki K, Kobayashi H, Yamamoto S, Sun W, Aoyama T, Hirota Y, Ohno H, Oki K, Yoneda M, White AP, Tseng YH, Cypess AM, Larsen TJ, Jaspersen NZ, Scheele C, Tsutsumi S, Aburatani H, Yamauchi T, Kadowaki T. NFIA co-localizes with PPAR γ and transcriptionally controls the brown fat gene program. *Nature Cell Biology*. 査読有り、19(9)、2017年9月、p1081-1092.

[学会発表] (計27件)

Hironori Waki. Genome-wide Profiling of Brown Fat-Specific Open Regulatory Regions Identifies NFIA as a Transcriptional Regulator of Brown Fat-Muscle Cell Lineage Specification. Small RNAs to stem Cells & Epigenetics Reprogramming ASIA-2013 Meeting (2013.11.25-26, Tokyo, Japan)(oral presentation)

Yuta Hiraike, Jing Yu, Hironori Waki, Masahiro Nakamura, Wei Sun, Tomohisa Aoyama, Megumi Tomioka, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki. Genome-wide Profiling of Brown Fat-Specific Open Regulatory Regions Identifies NFIA as a Transcriptional Regulator of Brown Fat-Muscle Cell Lineage Specification. Exploring the Role of Brown Fat in Humans (2014.2.25-26, NIH, Bethesda, MD) (Poster)

Hironori Waki, Yuta Hiraike, Jing Yu, Kana Miyake, Masahiro Nakamura, Ken Suzuki, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki. Genome-wide Profiling of Brown Fat-Specific Open Regulatory Regions Identifies NFIA as a Transcriptional Regulator of Brown Fat Muscle Cell Lineage Specification. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (2014.9.13, Kyoto, Japan) (Poster)

Hironori Waki, Yuta Hiraike, Jing Yu, Kana Miyake, Masahiro Nakamura, Ken Suzuki, Wei Sun, Megumi Tomioka, Yusuke Hirota, Tomohisa Aoyama, Masato Iwabu, Miki Okada-Iwabu, Kohjiro Ueki, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi and Takashi Kadowaki. Genome-wide Profiling of Brown Fat-Specific Open Regulatory Regions Identifies NFIA as a Transcriptional Regulator of Brown Fat Differentiation. International Symposium for the Study of Obesity "Molecular Basis and Disorders of Control of Appetite and Fat Accumulation" (2014.10.26, Miyazaki, Japan) (Oral presentation)

Yuta Hiraike, Jing Yu, Hironori Waki, Masahiro Nakamura, Kana Miyake, Ken Suzuki, Wei Sun, Tomohisa Aoyama, Yusuke Hirota, Megumi Tomioka, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki. NFIA Controls Brown-Fat Gene Program by Differential Chromatin Remodeling of Cell Type-Specific Enhancers. Keystone Symposia, Beige and Brown Fat: Basic Biology and Novel Therapeutics (2015.4.17-22, Snowbird, USA) (poster)

Yuta Hiraike, Jing Yu, Hironori Waki, Masahiro Nakamura, Kana Miyake, Hirofumi Kobayashi, Ken Suzuki, Wei Sun, Tomohisa Aoyama, Yusuke Hirota, Megumi Tomioka, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki. NFIA Controls the Brown Fat Gene Program by Co-Localizing with PPAR γ at

Cell-Type-Specific Enhancers. Keystone Symposia, Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies (T2) (2015.10.25-29, Kyoto, Japan) Short Talk

Hironori Waki. NFIA Controls the Brown Fat Gene Program by Co-Localizing with PPAR γ at Cell-Type-Specific Enhancers. The 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meeting of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction (2015.11.21-22, Hong Kong, China)

Yuta Hiraike, Hironori Waki, Jing Yu, Kana Miyake, Masahiro Nakamura, Ken Suzuki, Ryo Nakaki, Hirofumi Kobayashi, Takahito Wada, Wei Sun, Tomohisa Aoyama, Yusuke Hirota, Gaku Nagano, Haruya Ohno, Kenji Oki, Masayasu Yoneda, Syuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Toshimasa Yamauchi and Takashi Kadowaki. NFIA Controls the Brown-Fat Gene Program by Co-Localizing with PPAR γ at Cell Type-Specific Enhancers.. Keystone Symposia: Metabolism, Transcription and Disease (Snowbird, Utah, U.S.A.,2016.1)

脇 裕典. ワークショップ:次世代シーケンサーが開く新しい腎臓基礎研究の展開 脂肪細胞分化におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割. 第56回日本腎臓学会学術総会(2013年5月11日 東京)(口演発表)

脇 裕典. 脂肪細胞分化におけるクロマチン構造とエピゲノム制御の役割. 第6回臓器間ネットワークと血管生物学から読み解くメタボリックシンドローム研究会(2013年9月7日 東京)

脇裕典、山内敏正、中村正裕、于静、平池勇雄、孫威、青山倫久、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤 修一、油谷浩幸、門脇孝. FAIRE-seq を用いた褐色脂肪細胞特異的な転写制御領域のゲノムワイド解析. 第34回日本肥満学会(2013年10月 東京)

脇 裕典、山内 敏正、平池 勇雄、于 静、青山 倫久、中村 正裕、孫 威、富岡 恵、若林 賢一、岩部 真人、岡田 美紀、堤 修一、児玉 龍彦、酒井 寿郎、植木 浩二郎、油谷 浩幸、門脇 孝: 「シンポジウム3」白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造とエピゲノム制御. 第34回日本肥満学会(2013年10月 東京)

脇裕典、平池勇雄、于静、山内敏正、中村正裕、孫威、青山倫久、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤 修一、油谷浩

幸、門脇孝. 褐色脂肪細胞特異的な転写制御領域の FAIRE-seq による新規制御因子の同定. 第36回日本分子生物学会年会(2013年12月 神戸)

脇 裕典. 白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造とエピゲノム制御. 第38回徳島大学糖尿病臨床・研究開発センター講演会(2014年2月18日 徳島)

脇裕典、平池勇雄、于静、山内敏正、中村正裕、孫威、青山倫久、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤 修一、油谷浩幸、門脇孝. ゲノムワイド FAIRE-seq を用いた褐色脂肪細胞特異的な転写制御機構における NFIA の役割の同定. 第87回日本内分泌学会学術総会(2014年4月26日 福岡)(口演発表)

脇裕典、平池勇雄、于静、山内敏正、中村正裕、孫威、青山倫久、富岡恵、岩部真人、岩部美紀、植木浩二郎、堤 修一、油谷浩幸、門脇孝. 褐色脂肪細胞特異的な転写制御領域の FAIRE-seq による新規制御因子の同定. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会(2014年5月24日 大阪)(口演発表)

脇 裕典. 白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割. 第32回内分泌代謝学サマーセミナー(2014年7月11日 山梨)(口演発表)

脇裕典、平池勇雄、于静、中村正裕、鈴木顕、孫威、青山倫久、富岡恵、杉山拓也、植木浩二郎、堤 修一、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝. 褐色脂肪分化と遺伝子制御における NFIA の役割. 第29回日本糖尿病合併症学会(2014年10月3日東京)(口演発表)

脇裕典、平池勇雄、于静、中村正裕、青山倫久、孫威、鈴木顕、若林賢一、井上剛、武和巳、富岡恵、三宅加奈、廣田雄輔、岩部真人、岩部美紀、杉山拓也、和田洋一郎、植木浩二郎、堤 修一、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝. 白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割. 第35回日本肥満学会(2014年10月25日宮崎)(口演発表)

脇裕典. 白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造変化とエピゲノム制御の役割. AdipoScience in Hiroshima (2014年10月31日広島)(口演発表)

②脇裕典、平池勇雄、于静、中村正裕、孫威、三宅加奈、鈴木顕、青山倫久、富岡恵、廣田雄輔、植木浩二郎、堤修一、油谷浩幸、山内敏正、門脇孝. 褐色脂肪特異的な転写制御・エピゲノム制御における NFIA の役割

の解明. 日本糖尿病・肥満動物学会 (2015年2月14日京都)(口演発表)

②③ 脇 裕典. 白色・褐色脂肪細胞におけるクロマチン構造とエピゲノム制御の役割. 第49回 糖尿病学の進歩 (2015年2月20日岡山)(口演発表) シンポジウム4 ゲノム・エピゲノムと糖尿病

②④ 脇 裕典. NFIA による細胞特異的エンハンサーのクロマチンリモデリングを介した褐色脂肪遺伝子プログラムの制御. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 (2015年5月21-24日 下関) シンポジウム10 アディポバイオロジー -代謝中枢としての脂肪組織

②④ 脇 裕典、平池 勇雄、于 静、三宅 加奈、中村 正裕、鈴木 顕、仲木 竜、小林 博文、孫 威、青山 倫久、廣田 雄輔、富岡 恵、長野 学、大野 晴也、沖 健司、米田 真康、堤 修一、油谷 浩幸、山内 敏正、門脇 孝. NFIA による細胞特異的エンハンサーのクロマチンリモデリングを介した褐色脂肪遺伝子プログラムの制御. 第9回 Diabetes Leading-edge Conference (2015年8月8-9日 大津)

②⑤ 脇 裕典、平池 勇雄、于 静、三宅 加奈、中村 正裕、鈴木 顕、仲木 竜、小林 博文、孫 威、青山 倫久、廣田 雄輔、富岡 恵、長野 学、大野 晴也、沖 健司、米田 真康、堤 修一、油谷 浩幸、山内 敏正、門脇 孝. NFIA によるクロマチンリモデリングを介した褐色脂肪遺伝子の転写制御メカニズム. 第20回アディポサイエンス・シンポジウム (2015年8月22日 大阪) セッション1 白色・褐色脂肪細胞の分化・増殖と機能.

②⑥ 脇 裕典、平池 勇雄、油谷 浩幸、山内 敏正、門脇 孝. NFIA による細胞特異的エンハンサーのクロマチンリモデリングを介した褐色脂肪遺伝子プログラムの制御. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 (2015年12月2日 神戸) ワークショップ: マルチオミックス統合解析の新機軸

②⑦ 脇 裕典、平池 勇雄、于 静、三宅 加奈、鈴木 顕、仲木 竜、中村 正裕、小林 博文、孫 威、青山 倫久、廣田 雄輔、富岡 恵、長野 学、大野 晴也、沖 健司、米田 真康、堤 修一、油谷 浩幸、山内 敏正、門脇 孝. NFIA は褐色脂肪遺伝子エンハンサー選択的なPPAR γ との共局在により褐色脂肪の遺伝子プログラムを制御する. 第10回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム (2016年2月13日 東京)

〔図書〕(計1件)

脇 裕典、西村書店、糖尿病学 1章13
脂肪組織(白色・褐色) 2015年5月、B5・
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
特になし

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
なし

(3)連携研究者
なし