

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16193

研究課題名(和文) エピジェネティック情報に基づく化学物質による脂肪細胞肥大化のリスク評価

研究課題名(英文) A risk assessment of adipocyte hypertrophy caused by environmental chemicals based on epigenetic information

研究代表者

新井 良和 (ARAI, YOSHIKAZU)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：90614769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の1つである肥満は、近年では子どもにおいても認められる。疫学調査より、母体環境中に存在する有害な化学物質が臍帯を通して胎児に作用し、肥満の原因となる脂肪細胞肥大化を引き起こす危険性が報告されている。本研究では、母体環境中の化学物質による脂肪細胞肥大化について、エピジェネティクスで評価した。5種類の化学物質(DEP, Hg, コチニン, Se, S-421)を母体血清中濃度で前駆脂肪細胞へ暴露した結果、ヘテロクロマチン形成に基づくエピジェネティクスへの影響は認められず、さらに脂肪細胞分化にも影響しなかった。以上より、解析した化学物質について脂肪細胞肥大化のリスク評価を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：One of lifestyle-related diseases, obesity, is also recognized in children in recent years. Epidemiological studies have reported that the harmful chemicals present in the maternal environment act on the fetus through cord blood and lead to adipocytes hypertrophy causing child's obesity. In this study, the risk of chemicals in maternal environment causing adipocyte hypertrophy was evaluated using epigenetic information. Exposure of five chemicals (DEP, Hg, cotinine, Se, S-421) to preadipocytes at maternal serum concentrations resulted in no effect on epigenetic status based on heterochromatin formation. Furthermore, these chemicals did not affect adipocyte differentiation in vitro, suggesting that analyzed five chemicals do not cause adipocyte hypertrophy at maternal serum concentrations. Collectively, a risk of adipocyte hypertrophy caused by analyzed chemicals could be evaluated based on epigenetic information.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 環境化学物質 脂肪細胞肥大化

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病の原因の1つである肥満は大きな社会問題であり、最近では子どもの肥満も多く知られている。肥満には生活習慣が大きく関与するが、一方で近年の疫学調査から、胎児が母体内で有害な化学物質に曝された影響が出生後も続き、肥満の原因となる脂肪細胞の肥大化に繋がる危険性が報告されている。これまでの多能性幹細胞を用いた研究で、母体環境中に存在する化学物質が、遺伝子の発現調節機構であるエピジェネティック制御を乱すこと、さらに細胞分化にも影響することが明らかとなっている (Arai et al. *BiolMed Res Int* 876047. 2015; Arai et al. *J Reprod Dev* 57(4): 507-517, 2011)。これらの研究結果をもとに、子どもの肥満発症機序として、胎児期における化学物質暴露が脂肪細胞分化過程のエピジェネティック制御を乱し、このことが将来における子どもの肥満につながるのではないかと、という着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では母体環境中から検出される化学物質が脂肪細胞肥大化を引き起こす危険性について、遺伝子の発現調節機構であるエピジェネティクスを指標に評価した。

3. 研究の方法

(1) プタ脂肪細胞/組織の DNA メチル化解析

化学物質による脂肪細胞肥大化のリスク評価の研究基盤として、ブタ組織(脂肪組織、心臓、肝臓、骨格筋)、さらに体外で培養したブタ前駆脂肪細胞と分化誘導させた成熟脂肪細胞について、遺伝子領域における DNA メチル化情報取得を試みた。約 200 ケ所の脂肪細胞関連遺伝子について PCR プライマーを設計し、バイサルファイト PCR によって目的遺伝子領域の PCR 産物を得た。得られた PCR 産物をもとにシーケン斯拉イブラリを構築し、次世代シーケンサー (MiSeq, イルミナ) を用いた高解像度 DNA メチル化解析を行った。

(2) ヘテロクロマチンを指標とするエピジェネティック解析

これまでの培養細胞を用いた研究で、母体環境中から検出される化学物質のうち、エピジェネティック状況を変化させる化合物 (エピ変異原) として、5 種類の化学物質 (DEP, コチニン, Hg, Se, S-421) を同定している (Arai et al. *J Reprod Dev* 57(4): 507-517, 2011)。これら 5 種類の化学物質について、先に同定した母体血清・臍帯血清中濃度を参考に、前駆脂肪細胞へ 48 時間の複合暴露を行った。暴露後、細胞を回収して塗抹標本作製し、DAPI による核染色を行ったのち蛍光顕微鏡 (BZ-9000, キーエンス) で核ごとのヘテロクロマチン数を計測・解析した。

(3) 脂肪分化への化学物質の影響解析

前駆脂肪細胞の培地を分化誘導培地 (DMEM High-glucose, 10% FBS, ITS-X, 0.25 μ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX) に替えて 4 日間培養し、さらに 4 日間、分化誘導培地から IBMX を抜いて脂肪細胞へ分化させた。この分化誘導系を用いて、5 種類の化学物質を母体血清中濃度で前駆脂肪細胞から脂肪細胞まで計 12 日間、複合暴露した。脂肪細胞への分化能については、Oil Red-O 染色、および脂肪細胞分化マーカー (*Pparg*, *Apoe*, *Cebpa*) を用いた RT-PCR で確認した。

4. 研究成果

(1) プタ脂肪細胞/組織におけるエピジェネティックデータベースの構築

ブタ脂肪細胞/組織について、脂肪細胞関連遺伝子を含む約 200 ケ所の DNA メチル化情報を、次世代のシーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンスで取得した。解析の結果、心臓、肝臓、骨格筋と比較して、脂肪組織で特異的な DNA メチル化状況を示す 39 個の遺伝子領域が同定できた。この中には、脂肪細胞分化に関連する *Igf1* や *Klf5* などが含まれていた。さらに、前駆脂肪細胞と分化誘導させた脂肪細胞との比較によって、脂肪細胞への分化過程で DNA メチル化状況が変化する 12 個の遺伝子領域を同定できた (図 1)。これらの結果は、脂肪細胞分化の分子メカニズムを解明する上で有用な情報であり、DNA メチル化情報をもとに、ブタ脂肪細胞/組織におけるエピジェネティックデータベースを構築できた。

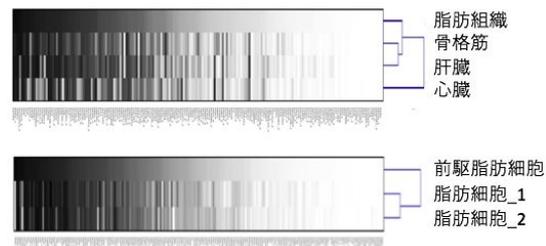


図 1

ブタ脂肪細胞/組織での DNA メチル化解析

ブタ組織 (脂肪組織、骨格筋、肝臓、心臓) (上段)、および体外で脂肪細胞へ分化誘導させた培養細胞 (下段) について、約 200 ケ所の遺伝子領域における DNA メチル化情報を取得し、DNA メチル化率をヒートマップで表示した。各遺伝子について、ヒートマップの色が黒に近づくほど高メチル化、白に近づくほど低メチル化状態にあることを示す。さらに、得られた DNA メチル化情報をもとに階層的クラスタリングを行った。前駆脂肪細胞と脂肪細胞の間で大きく枝分かれしたことから、脂肪分化前後で DNA メチル化状況が大きく変化することが示された。

(2)ヘテロクロマチンに基づくエピジェネティクスを指標とした化学物質のリスク評価

核内のクロマチン構造の1つであるヘテロクロマチンの形成には、DNAメチル化などのエピジェネティック修飾が関与することが知られている。これまでの多能性幹細胞を用いた研究でエピ変異原として同定された5種類の化学物質(DEP, Hg, コチニン, Se, S-421)について、母体血清中濃度で前駆脂肪細胞へ複合暴露し、ヘテロクロマチンを指標に化学物質によるエピジェネティクスへの影響を検証した。各サンプルについて、約200個の核のヘテロクロマチン数を計測した(図2)。解析の結果、化学物質暴露によるヘテロクロマチン数の変化は認められず、このことは解析した5種類の化学物質暴露は、前駆脂肪細胞のヘテロクロマチン形成に影響しないことを示唆する。

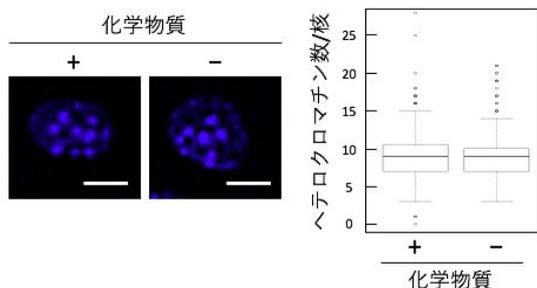


図2

前駆脂肪細胞でのヘテロクロマチン解析

5種類の化学物質を母体血清中濃度で前駆脂肪細胞に48時間複合暴露し、DAPI染色によってヘテロクロマチンを可視化したのち、ヘテロクロマチン数を指標に化学物質の影響を評価した。スケールバー, 10 μm; 化学物質+, 5種類の化学物質の複合暴露; 化学物質-, 溶媒のみの対照群

(3)化学物質の脂肪細胞分化への影響

5種類の化学物質による脂肪細胞分化への影響を検討するために、前駆脂肪細胞、および分化誘導後の細胞に母体血清中濃度を参考に化学物質を複合暴露した。脂肪細胞への分化能をOil Red-O染色による脂肪滴の大きさを指標に解析した結果、化学物質暴露による脂肪細胞分化への影響は認められなかった(図3)。さらに、脂肪細胞分化マーカーによるRT-PCRを用いた遺伝子発現解析からも、化学物質暴露の有無による発現量の違いは認められなかった。これらの結果は、解析した5種類の化学物質は、母体・臍帯血清中濃度の範囲内では、脂肪細胞分化に悪影響をもたらさないことを示唆する。以上より、解析した化学物質における脂肪細胞肥大化のリスク評価を行うことができた。

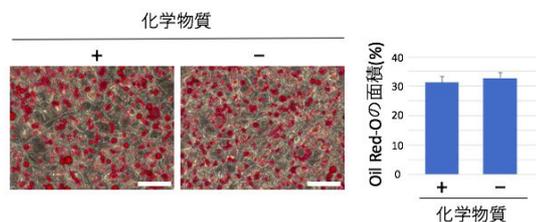


図3

脂肪分化における化学物質の影響評価

前駆脂肪細胞、および脂肪細胞分化過程で5種類の化学物質を母体・臍帯血清中濃度で複合暴露して、Oil Red-O染色による脂肪滴の大きさをもとに評価した。スケールバー, 50 μm; 化学物質+, 5種類の化学物質の複合暴露; 化学物質-, 溶媒のみの対照群

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6件)

1. Takasawa K, Arai Y, Yamazaki-inoue M, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, and Nishino K. DNA methylation enhanced telomerase reverse transcriptase expression in human-induced pluripotent stem cells. *Hum Cell* 31(1):78-86 (2018)
doi: 10.1007/s13577-017-019-x. 査読有
2. Maekawa R, Ito R, Iwasaki Y, Saito K, Akutsu K, Takatori S, Ishii R, Kondo F, Arai Y, Ohgane J, Shiota K, Makino T, and Sugino N. Evidence of exposure to chemicals and heavy metals during pregnancy in Japanese women. *Reprod Med Biol* 1-12 (2017)
doi:10.1002/rmb2.12049. 査読有
3. Arai Y, Umeyama K, Takeuchi K, Okazaki N, Hichiwa N, Yashima S, Nakano K, Nagashima H, and Ohgane J. Establishment of DNA methylation patterns of the Fibrillin1 (FBN1) gene in porcine embryos and tissues. *J Reprod Dev* 63(2):157-165 (2017)
doi:10.1262/jrd.2016-158. 査読有
4. Nagaya M, Watanabe M, Kobayashi M, Nakano K, Arai Y, Asano Y, Takeishi T, Umeki I, Fukuda T, Yashima S, Takayanagi S, Watanabe N, Onodera M, Matsunari H, Umeyama K, and Nagashima H. A transgenic-cloned pig model expressing non-fluorescent modified Plum. *J Reprod Dev* 62(5):511-520 (2016)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/62/5/62_2016-041/_pdf/-char/en
査読有

5. [Arai Y](#), Fukukawa H, Atozi T, Matsumoto S, Hanazono Y, Nagashima H, and Ohgane J. Ultra-Deep Bisulfite Sequencing to Detect Specific DNA Methylation Patterns of Minor Cell Types in Heterogeneous Cell Populations: An Example of the Pituitary Tissue. *PLoS One* 11(1): e0146498 (2016) doi:10.1371/journal.pone.0146498. 査読有
6. 竹内健太、牧野智宏、[新井良和](#)、大鐘潤、ハプロ不全優性遺伝病発症の新たな視点：分子メカニズムとしてエピジェネティクスが関与する可能性、明治大学農学部研究報告 第 65 巻-4 号：96-103 (2016)
https://m-repo.lib.meiji.ac.jp/dspace/bitstream/10291/17937/1/nogakubuhokoku_65_4_95.pdf 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. [新井良和](#)、梅山一大、竹内健太、八島紗耶香、中野和明、長嶋比呂志、大鐘潤、ハプロ不全優性遺伝病の発症機序解明に向けた新たなアプローチ：ブタフィブリリン 1 (Fbn1)のエピジェネティック解析、第 109 回 日本繁殖生物学会、神奈川 (2016)
2. [新井良和](#)、福川斐昭、飛知和尚美、松成ひとみ、長嶋比呂志、大鐘潤、体細胞各移植で継代されたクローンブタでのゲノムワイド DNA メチル化解析、第 10 回日本エピジェネティクス研究会、大阪 (2016)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet_biochem/top.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

新井 良和 (ARAI YOSHIKAZU)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：90614769