

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07215

研究課題名(和文) 骨格筋のエネルギー代謝を調節する栄養応答型エピゲノムに関する研究

研究課題名(英文) Epigenetic mechanisms of metabolic reprogramming under nutritional stress

研究代表者

日野 信次郎 (Hino, Shinjiro)

熊本大学・発生医学研究所・准教授

研究者番号：00448523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は、力学的耐久性に優れ糖代謝の活発な速筋と、持久性に優れミトコンドリア呼吸の活発な遅筋で構成されている。これらの筋線維の組成は、栄養や運動などの環境要因によって変化し、その結果として体質や代謝疾患リスクに影響を及ぼす。本研究は、環境応答性の筋線維型を可能にする遺伝子発現調節、特にエピゲノム制御機構を解明することを目的として実施した。その結果、ヒストン脱メチル化酵素であるLSD1が遅筋形成に関わる遺伝子群の発現を抑制すること、このLSD1の機能が様々なホルモンによって調節を受けることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、骨格筋の機械的性質とエネルギー代謝特性を連動させる遺伝子発現調節機構が明らかとなった。また、栄養環境が長期的な筋線維組成に反映される仕組みが明らかになった。これらの成果は、環境によって動物の体質が可塑的に変化する仕組みを理解する上で大きな手掛かりとなる。また、生活習慣病などの慢性疾患の発症機序解明に貢献できると考えられ、予防法や治療法の開発に資する。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle is composed of two different fiber types, fast- and slow-twitch fibers. While the fast is specialized for dynamic movements and glycolytic metabolism, the slow is specialized for endurance and show active mitochondrial respiration. Composition of these fiber types is highly influenced by environmental factors such as exercise and diet, and is associated with the risks of chronic diseases such as diabetes. This study was aimed at elucidating the mechanisms by which fiber types are determined under the influence of environmental factors. We found that a histone demethylase, LSD1, represses both slow fiber and respiration associated genes to promote fast fiber traits. In addition, we found that glucocorticoid, a hormone secreted in undernutrition state, promotes the degradation of LSD1 leading to the enhanced slow fiber formation. Our findings uncover the molecular mechanisms that link environment to muscle fiber, and would contribute to understanding chronic diseases.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ヒストン脱メチル化 代謝リプログラミング 筋線維型

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

栄養や運動などの環境因子が長期的な体質や慢性疾患リスクに投影される。DNAメチル化やヒストン修飾などのエピゲノムを介した細胞記憶がその基盤メカニズムであると考えられているが、その実態は不明な点が多い。特に、環境因子がエピゲノム・クロマチン制御因子を介して特異的なエピゲノム変化を誘導する仕組みはよくわかっていない。

骨格筋は、二つの線維型、力学的強度が高く高負荷運動に適した速筋と、持久性に富み姿勢維持に適した遅筋により構成されており、両者は環境に応じて可塑性を示す。しかし、環境に応じたエピゲノム変化により線維型が可塑的に調節される仕組みはわかっていない。また、速筋と遅筋は、それぞれ解糖系と好気呼吸に特化したエネルギー代謝を行うが、機械的性質と代謝特性がエピゲノム制御を介して協調する仕組みもわかっていない。

骨格筋の機能低下は、慢性代謝疾患やフレイルの素因であり、超高齢社会である日本にとって重要な医療課題である。慢性疾患における筋機能低下には、線維型選択性があり、個々の環境因子が線維型特異的に作用する仕組みがわかれば、現実に即した予防や治療法の開発が期待できる。

研究代表者は、これまでにヒストン H3K4 脱メチル化酵素である LSD1 が脂肪細胞やがん細胞の代謝型形成に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた (Hino et al. Nat Commun 2012, Sakamoto et al. Cancer Res 2015)。また、LSD1 の機能は様々な環境因子の影響を受ける。これらのことから、筋肉の線維・代謝可塑性に LSD1 が寄与する可能性がある。

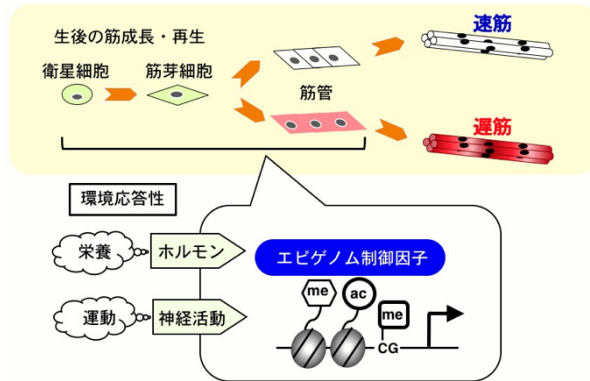


図1. 筋線維型決定におけるエピゲノム制御

2. 研究の目的

上記の状況を踏まえて、栄養環境に応じた骨格筋代謝や線維型決定に関わるエピジェネティック制御機構を解明する目的で、以下の個別課題に取り組んだ。

- 1) 筋分化過程の LSD1 依存性エピゲノム形成の網羅的解析
- 2) LSD1 と代謝ホルモンシグナルの相互作用による選択的遺伝子制御機構の解明
- 3) マウス骨格筋可塑性における LSD1 の役割の解明

3. 研究の方法

線維型及び代謝制御における LSD1 の役割を検討するために、分化誘導により速筋型の筋管を作るマウス由来 C2C12 筋芽細胞を用いた。分化中の様々な時点で細胞を LSD1 阻害剤で処理し、遺伝子発現、エピゲノムやエネルギー代謝の解析を行った。網羅的発現解析には、発現マイクロアレイ解析を実施した。エネルギー代謝特性の評価には細胞外フラックスアナライザー XF24 を用いた。

LSD1 により直接調節を受ける遺伝子を同定するために、クロマチン免疫沈降法-高速シーケンス (ChIP-seq) 解析を行い、LSD1 阻害細胞のヒストン H3K4 メチル化変化やマウスゲノム上の LSD1 結合領域を同定した。

環境ストレスによる LSD1 機能調節を調べるために、栄養センシングに関わるホルモンで細胞を処理した。同様に、マウスにホルモンを投与した後、骨格筋を切除し解析に供試した。

4. 研究成果

1) 筋分化過程の LSD1 依存性エピゲノム形成の網羅的解析

筋分化過程の代謝表現型形成における LSD1 の役割を解明する目的で、LSD1 阻害下で形成された筋管の代謝解析を行った。その結果、LSD1 阻害下では好気呼吸活性の顕著な上昇が認められたことから、遅筋形成が促進されたことが示唆された。この結果と一致して、発現マイクロアレイ解析の結果、LSD1 阻害により好気呼吸遺伝子や遅筋線維遺伝子が発現上昇を示した。これらの結果から、LSD1 は遅筋関連遺伝子の発現を抑制することにより、速筋型を誘導することが示唆された。

次に、骨格筋分化過程における LSD1 によるエピゲノム制御の全体像を明らかにする目的で、抗 LSD1 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。分化初期と比較して分化後ではゲノム DNA 上の

LSD1 結合領域が大きく減少していたことから、LSD1 は分化初期の遺伝子制御において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、LSD1 阻害下におけるヒストン H3K4 メチル化の変化を網羅的に解析した結果、LSD1 の結合が強く認められた領域では LSD1 阻害によりトリメチル H3K4 の亢進が顕著に認められた。このことから LSD1 は H3K4 メチル化バランスを調整する役割を担っていることが示唆された。重要なことに、好気呼吸及び遅筋線維遺伝子において LSD1 が直接結合し、H3K4 メチル化レベルを調節していることがわかった。

2) LSD1 と代謝ホルモンシグナルの相互作用による選択的遺伝子制御機構の解明

内分泌因子が LSD1 タンパク質量に及ぼす影響をウェスタンブロット法にて検討したところ、グルココルチコイドのアナログであるデキサメタゾン (Dex) により LSD1 量が有意に減少することがわかった。Dex 処理で LSD1 mRNA 発現は変化しなかったこと、プロテアソーム阻害剤処理により効果が消失したことから、グルココルチコイドが LSD1 タンパク質の分解を促進することが示唆された。さらに、グルココルチコイド受容体 (GR) を介したユビキチン E3 リガーゼ Jade-2 の発現誘導が LSD1 の分解に関わることがわかった。また、Dex 持続投与マウスの骨格筋において LSD1 減少と Jade-2 誘導が見られたが、GR 欠損マウスでは認められなかった。

グルココルチコイドは、速筋線維形成を抑制し、好気呼吸を促進することが知られている。この点を踏まえて、分化過程の筋芽細胞を Dex と LSD1 阻害剤で同時処理したところ、遅筋遺伝子及び好気呼吸遺伝子の発現が相乗的に上昇した。これらのことから、グルココルチコイドシグナルによる遅筋誘導において、LSD1 分解を介したエピゲノム変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

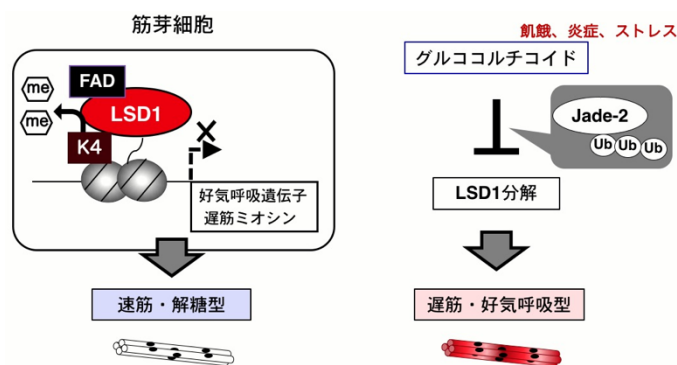


図2. LSD1は骨格筋分化において遅筋遺伝子を抑制し、速筋型を誘導する

栄養環境に応じて LSD1 によるエピゲノム制御の選択性や持続性がどのように変化するかを解明する目的で、プロテオミクス解析による LSD1 結合タンパク質の網羅的同定を試みた。多くの既知 LSD1 結合タンパク質が内分泌刺激下でも影響を受けなかったのに対し、多くの新規同定タンパク質が環境依存的な LSD1 結合を示した。また、核内外に局在するタンパク質が幅広く見いだされたことから、LSD1 の細胞内局在がダイナミックに変化する可能性が示唆された。

3) マウス骨格筋可塑性における LSD1 の役割の解明

マウス骨格筋線維型における LSD1 の役割を明らかにする目的で、骨格筋特異的 Lsd1 欠損 (KO) マウスを作製した。前年度までの研究で、遺伝子発現の線維型特異的は、筋芽細胞の分化初期に固定化されることを明らかにした。そこで、当該時期に特異的な Lsd1-KO を薬剤で誘導できるマウスを作出した。生後の様々な時期に環境ストレスを加えると同時に Lsd1-KO を誘導し、遺伝子発現解析を行った。その結果、環境ストレスに応じた遺伝子発現変化は、Lsd1 欠損の影響を強く受けることが明らかとなった。

以上の成果から、LSD1 が骨格筋分化過程における線維型及びエネルギー代謝型決定に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、グルココルチコイドのような全身性栄養状態にตอบสนองして分泌されるホルモンにより、LSD1 機能が調節されることがわかった。これらの点から、LSD1 は環境に応じて骨格筋の質を決定する重要なエピジェネティクス因子であることが示唆された。本研究の成果により、環境に応じた体質形成の仕組みの一端が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 16 件)

- ① Acebedo AR., Suzuki K., Hino S., Alcantara MC., Sato Y., Haga H., Matsumoto K., Nakao M., Shimamura K., Takeo T., Nakagata N., Miyagawa S., Nishinakamura R., Adelstein RS. and Yamada G. Mesenchymal actomyosin contractility is required for androgen-driven urethral masculinization in mice. Commun. Biol. 2: Article No. 95, 2019. DOI:

- ② Takase R., Hino S.*, Nagaoka K., Anan K., Kohrogi K., Araki H., Hino Y., Sakamoto A., Nicholson TB., Chen T. and Nakao M.* (*corresponding authors) Lysine-specific demethylase-2 is distinctively involved in brown and beige adipogenic differentiation. *FASEB J.* DOI: 10.1096/fj.201801422RR
- ③ Anan K., Hino S.*, Shimizu N., Sakamoto A., Nagaoka K., Takase R., Kohrogi K., Araki H., Hino Y., Usuki S., Oki S., Tanaka H., Nakamura K., Endo F. and Nakao M.* (*corresponding authors) LSD1 mediates metabolic reprogramming by glucocorticoids during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res.* 46: 5441-5454, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky234
- ④ Kimura T., Hino K., Kono T., Takano A., Nitta N., Ushio N., Hino S., Takase R., Kudo M., Daigo Y., Morita W., Nakao M., Nakatsukasa M., Tamagawa T., Rafiq AM., Matsumoto A., Otani H., Udagawa J. Maternal undernutrition during early pregnancy inhibits postnatal growth of the tibia in the female offspring of rats by alteration of chondrogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 260: 58-66, 2018. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.12.008
- ⑤ Tanaka H., Takebayashi S., Sakamoto A., Igata T., Nakatsu Y., Saitoh N., Hino S., and Nakao M. The SETD8/PR-Set7 methyltransferase functions as a barrier to prevent senescence-associated metabolic remodeling. *Cell Rep.* 18: 2148-2161, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.021
- ⑥ Nakamoto M., Ishihara K., Watanabe T., Hirose A., Hino S., Shinohara M., Nakayama H., and Nakao M. The Glucocorticoid Receptor Regulates the ANGPTL4 Gene in a CTCF-Mediated Chromatin Context in Human Hepatic Cells. *PLOS One* 12: e0169225, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169225.
- ⑦ Tsutsumi T., Iwao K., Hayashi H., Kawaji T., Inoue T., Hino S., Nakao M. and Tanihara H. Potential Neuroprotective Effects of an LSD1 Inhibitor in Retinal Ganglion Cells via p38 MAPK Activity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57: 6461-6473, 2016. DOI: 10.1167/iovs.16-19494.
- ⑧ Hino S.*, Kohrogi K. and Nakao M.* (*corresponding authors) Histone demethylase LSD1 controls the phenotypic plasticity of cancer cells. *Cancer Sci.* 107: 1187-92, 2016. DOI: 10.1111/cas.13004.
- ⑨ Miyazato P., Katsuya H., Fukuda A., Uchiyama Y., Matsuo M., Tokunaga M., Hino S., Nakao M. and Satou Y. Application of targeted enrichment to next-generation sequencing of retroviruses integrated into the host human genome. *Sci. Rep.* 6: Article No. 28324, 2016. DOI: 10.1038/srep28324.
- ⑩ Xi Y., Shen W., Ma L., Zhao M., Zheng J., Bu S., Hino S. and Nakao M. HMG2 promotes adipogenesis by activating C/EBP β -mediated expression of PPAR γ . *Biochem. Biophys. Res. Com.* 472: 617-623, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.015.
- ⑪ 阿南浩太郎、日野信次朗、中尾光善「ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 による骨格筋細胞の代謝リプログラミング」*生化学* 91 (1):31-37, 2019
- ⑫ 荒木裕貴、日野信次朗、中尾光善「食事はメモリーされる:栄養・代謝とエピゲノム」*Diabetes Frontier* 28 (6): 617-621, 2017
- ⑬ 日野信次朗「肝糖代謝とヒストンメチル化修飾」*肝胆膵* 75 (1): 11-15, 2017
- ⑭ 日野信次朗「エネルギー代謝のエピジェネティクス」*最新医学* 72:672-677, 2017
- ⑮ 日野信次朗、阿南浩太郎、高瀬隆太、興梠健作、中尾光善「FAD 依存性ヒストン脱メチル化酵素による遺伝子制御」*実験医学* 34:2486-2492, 2016
- ⑯ 興梠健作、日野信次朗、中尾光善「環境エピゲノムとヒトの疾患」*BIO Clinica.* 31: 455-459, 2016

〔学会発表〕（計 15 件）

- ① Hino S. Hormone-Responsive Epigenetic Mechanisms Underlying Metabolic Reprogramming in the Muscle. The 14th International Symposium on Geriatrics and Gerontology Bridging Dementia and Frailty ~ From Pathogenesis to Prevention~. Dec. 1, 2018. Obu, Aichi.
- ② Takase R., Hino S., Nagaoka K., Anan K., Kohrogi K., Araki H. and Nakao M. Epigenetic control of white and brown adipogenesis by a histone demethylase, LSD2. JSPS and NUS Joint 2nd Symposium. Jan. 19, 2018, Kumamoto.
- ③ Hino S. Regulation of cellular metabolism by histone demethylase LSD1. The 12th Japan-China Cooperative Life Science Symposium. Nov. 14, 2016. Kumamoto
- ④ Hino S. Regulation of cellular metabolism by histone demethylase LSD1. The 26th Hot Spring Harbor International Symposium. Trans-omics: New Approaches in Biology and Medicine 2016. Nov. 2, 2016. Fukuoka
- ⑤ 日野信次朗「フラビン依存性ヒストン脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御」産総研バイオメディカル研究部門セミナー 2018年7月5日 茨城県つくば市
- ⑥ 日野信次朗、興梠健作、阿南浩太郎、高瀬隆太、荒木裕貴、中尾光善「LSD1による白血球細胞系譜に応じた代謝制御機構」2018年5月24-25日 第12回日本エピジェネティクス研究会年会 札幌市
- ⑦ 日野信次朗「フラビン依存性ヒストン脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御」熊本大学血液内科カンファレンス 2018年4月17日 熊本市
- ⑧ 日野信次朗「フラビン依存性脱メチル化酵素によるエピゲノム制御と代謝疾患」第55回日本臨床分子医学会学術集会（スポンサーセミナー：細胞増殖を取り巻く多彩な生命現象-免疫、代謝、脂質、エピゲノム-）2018年4月13日 京都府京都市
- ⑨ 日野信次朗、阿南浩太郎、高瀬隆太、興梠健作、中尾光善「ヒストン脱メチル化酵素 LSD1による酸素環境応答と代謝可塑性」ConBio2017（ワークショップ：分子状酸素による遺伝子発現調節から紐解く疾患生物学）2017年12月8日 兵庫県神戸市
- ⑩ 日野信次朗「環境に応じた代謝可塑性を司るエピジェネティクス機構」山口大学大学院連合獣医学研究科 大学院生企画セミナー2017年10月3日 山口市
- ⑪ 日野信次朗「LSD1による代謝調節とがん」第5回がんと代謝研究会 2017年7月14日 北海道大学 札幌市
- ⑫ 日野信次朗、阿南浩太郎、高瀬隆太、興梠健作、中尾光善「ホルモン応答性エピゲノム制御による骨格筋代謝制御機構」2017年4月20日 第90回日本内分泌学会学術集会 京都市
- ⑬ 日野信次朗「FAD依存性ヒストン脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御機構」第302回発生研セミナー 2017年2月21日 熊本市
- ⑭ 日野信次朗「FAD依存性ヒストン脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御機構」東京大学医科学研究所学友会セミナー 2017年1月16日 東京都港区
- ⑮ 日野信次朗「ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を介した環境応答と細胞記憶の形成」第39回日本分子生物学会年会（フォーラム：マルチオミクス統合解析が解き明かす生命現象-発生から疾患まで-）2016年11月30日 横浜市

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：浮遊性細胞のリアルタイム測定トレイと測定装置、ならびにそれを用いた測定方法

発明者：中尾光善、日野信次朗、興梠健作、岩佐卓哉、熊谷聡士

権利者：国立大学法人 熊本大学、日本バイリン株式会社

種類：特許

番号：特願 2018-178967

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：神経変性疾患治療剤

発明者：谷原秀信、岩尾圭一郎、中尾光善、林秀樹、日野信次郎、堤孝之

権利者：国立大学法人 熊本大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/002244

出願年：2017

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学発生医学研究所 HP (<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：阿南浩太郎

ローマ字氏名：(ANAN, Kotaro)

研究協力者氏名：高瀬隆太

ローマ字氏名：(TAKASE, Ryuta)

研究協力者氏名：興梧健作

ローマ字氏名：(KOHROGI, Kensaku)

研究協力者氏名：荒木裕貴

ローマ字氏名：(ARAKI, Hirotaka)

研究協力者氏名：日野裕子

ローマ字氏名：(HINO, Yuko)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。