

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08496

研究課題名(和文) 膵 細胞エピゲノム変化に着目した肥満の成因における環境因子の役割の検討

研究課題名(英文) Clarifying the role of environment-induced epigenetic change in pancreatic beta-cells in the etiology of obesity

研究代表者

南茂 隆生 (Nammo, Takao)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：50594115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肥満には運動不足や過食など環境要因が関与するが、そのメカニズムは明らかではない。私たちは近交系マウスモデルを体重増加のリスク環境下に飼育後、膵島を採取してエピゲノム・遺伝子発現の網羅的解析を行い、対照サンプルと比較した。H3K27ac ChIP-Seq上、環境因子によるエピゲノム変化が明らかとなったが、H3K27ac増加を認めたゲノム領域には、モデル間に共通して転写因子NRF1結合配列のエンリッチメントを認めた。本研究により、体重増加の際に膵島で活性化される細胞内シグナルの存在が示唆され、膵島機能変化のメカニズムおよび成因の解明に役立つ知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満の臨床像は経過、合併症および内科的治療効果などの点で多様である。食事療法や運動療法に抵抗性の症例には、背景として膵 細胞の自律的な機能変化が関与する可能性を本研究は示唆している。このメカニズムに着目して研究を展開できれば、新たな観点に基づいた肥満治療法に道が拓かれる可能性がある。そして、特に難治症例について患者の負担が軽減されるとともに治療効果が向上する可能性があり、合併疾患の減少を通じて社会的にも医療費削減など重要な成果につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：A range of environmental factors, such as sedentary life style and overfeeding, can cause obesity, while the underlying mechanisms had not been clarified. To address this issue, we performed genome-wide epigenomic analyses of pancreatic islets derived from inbred mouse strains housed under conditions linked to weight gain. ChIP-Seq of H3K27ac, a marker of cis-elements, revealed epigenomic changes in the overweight mice relative to controls. The analyses also identified a binding motif of NRF1 as the most enriched in increased H3K27ac regions in two independent experimental models, suggesting common upstream signals. Since we found a previously uncharacterized role of NRF1 in insulin secretion from pancreatic beta-cells, it was speculated that the environment-induced epigenomic change could be involved in the etiology of obesity. Taken together, we suggest that the epigenomic modulation of beta-cells through mechanisms related to NRF1 could be a potential intervention for obesity.

研究分野：糖尿病学

キーワード：環境因子 エピゲノム 膵島 肥満 2型糖尿病 モデルマウス インスリン分泌 遺伝素因

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満と2型糖尿病 (T2D) は多因子疾患の代表であるが、決め手となる内科的治療法は未だに存在せず、患者数の増加が続いている ()。これらはしばしば同一個人に集積する傾向があり、メタボリックシンドロームとして重要性の認識も高まっている ()。しかし、食事療法や運動療法といった内科的治療に抵抗性の症例も存在し、病態の分子基盤に基づいた、負担の出来るだけかからない新たな治療法が必要である。

(2) これら疾患の成因には運動不足や過食といった共通の環境要因が関与している。多因子疾患の研究領域においては環境因子とゲノム機能調節を媒介するメカニズムとしてエピゲノムが注目されてきた。私達はかつて、T2D と最も相関の高い *TCF7L2* 遺伝子イントロンの一塩基多型 (SNP) rs7903146 がヒト膵島において、クロマチン構造の変化と共にエンハンサー活性の変化をともなって遺伝子発現に影響することを示した ()。さらにその後、代謝疾患の成因を解明するために、環境因子がモデルマウス膵島のエピゲノムおよび遺伝子発現に及ぼす影響について、次世代シーケンサーを用いた網羅的な検討を行ってきた。雄性 C57Bl/6J マウスを用い、長期間に及ぶ高脂肪食摂取による食事誘導性肥満モデルを作成し、膵島エピゲノム・遺伝子発現の網羅的解析を行った。これにより、環境因子がヒストン H3K27 アセチル化 (H3K27ac) の変化を介した遺伝子発現変化を起こすことを見出した。約 14,000 か所の H3K27ac 領域が HFD 膵島において、対照よりもシグナルが増加していることが判明し、遺伝子転写開始点の近傍に最も多く分布することを見出した。

(3) 最近のゲノムワイド相関解析 (GWAS) の成果から、組織特異的なヒストン修飾 H3K4me3 領域に対する肥満の疾患感受性一塩基多型 (SNP) の集積は膵島が最も有意であることが示された ()。H3K4me3 は、転写活性のある遺伝子の転写開始点近傍に多いヒストン修飾であり、膵島においてこの領域の多型は膵内分泌機能を変化させて肥満の成因に関与する可能性を示唆している。この報告の以前にも GWAS 研究によって、膵内分泌組織が肥満の成因に関与する可能性が示されてきた ()。膵細胞特異的ノックアウトによりマウスが肥満やインスリン抵抗性を示す遺伝子も知られている ()。以上から、環境因子によって誘導される膵島エピゲノム変化が肥満の成因に寄与する可能性を考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

代謝疾患 (肥満・T2D) において、環境因子により膵島エピゲノムが変化するゲノム領域にエンリッチする転写因子結合配列に着目し、成因の分子メカニズムを明らかにすることによって新規治療法開発の分子標的の示唆を得る。

3. 研究の方法

(1) 雄性 C57Bl/6J マウスを用いた。10 週齢から 60%高脂肪食 (HFD) 摂取群と通常食摂取群に無作為に分けて飼育した。27 週間後に各群から膵島を採取し (10 匹分のプール)、ヒストン修飾 H3K27ac (活性のあるプロモーターおよびエンハンサーのマーカー) のクロマチン免疫沈降 (ChIP) およびトータル RNA 採取を行い、イルミナ社の次世代シーケンサー HiSeq 2000 による ChIP-Seq と RNA-Seq を行った ()。

(2) RNA-Seq データ (100bp ペアエンド法) に関しては、レファレンスゲノム (mm9) にアラインメントを行い、通常食群と比較し HFD 摂取群にて発現変動を示した遺伝子を抽出した。これら発現変動遺伝子は DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いたオントロジー解析により機能的な検討を行った。

(3) H3K27ac ChIP-Seq データを得て、レファレンスゲノム (mm9) にアラインメントを行い、SICER (<https://home.gwu.edu/~wpeng/Software.htm>) によって、通常食群と比較し HFD 摂取群にてシグナル変動を示した H3K27ac 領域を検出した。これらのゲノム領域に対し、既知情報を用いない de novo 転写因子結合モチーフ検索を行うために HOMER (<http://homer.ucsd.edu/homer/motif/>) による検討を行った。

(4) 着目した遺伝子の機能解析を行うために、ラット由来膵細胞株の INS-1 を用いて siRNA による発現抑制実験を行った。また、INS-1 細胞あるいは単離膵島の機能評価のために、グルコース応答性インスリン分泌刺激試験 (GSIS) を行った。

(5) 自然発症 T2D モデルである KK/Ta マウスを環境因子負荷のもとに飼育し、対照とともに単離した膵島を用いて H3K27ac ChIP-Seq と RNA-Seq を行った。HFD 摂取 C57Bl/6J マウスと同様、発現変動遺伝子と変動 H3K27ac 領域の同定を行い、DAVID、GREAT

(<http://great.stanford.edu/public/html/>) HOMER といった 3 次分析を行った。

4 . 研究成果

(1) HFD を摂取した 27 週間後において、C57BL/6J マウスの体重は通常食摂取の対照マウスと比較し約 1.5 倍となった。随時血糖の平均は 1.3mmol/l の高値であり、腹腔内グルコース負荷テストを行うと、耐糖能異常の所見を示した。

(2) RNA-Seq を行ったところ、HFD 群において 303 遺伝子の発現上昇、269 遺伝子の発現低下を認めた ($P < 0.1$)。DAVID を用いたオントロジー解析を行うと、発現上昇遺伝子には Extracellular exosome、Endoplasmic reticulum といったタームがエンリッチしていた。また、発現低下した遺伝子には、DNA replication-independent nucleosome assembly、DNA replication-dependent nucleosome assembly、DNA methylation on cytosine など、エピゲノム調節と関連したタームがエンリッチしていた。

(3) H3K27ac ChIP-Seq からは、HFD 群・対照群の両者を合わせて 39,350 か所のマージ H3K27ac 領域を認めた。HOMER を用いた de novo 転写因子モチーフ解析を行ったところ、これらのうち 13,369 か所の増加領域には NRF1 ($P = 10^{-42}$)、GABPA ($P = 10^{-40}$)、MEF2A ($P = 10^{-34}$) といった転写因子の結合配列がエンリッチしていた。また、4,610 か所の減少領域には、転写因子 MAFK ($P = 10^{-14}$) の結合配列がエンリッチしていた。RNA-Seq データも考慮したところ、H3K27ac の上昇は近接遺伝子の発現上昇に、減少は発現低下と関連していた。

(4) Nrf1 (nuclear respiratory factor 1)、Gabpa、Mef2a の膵細胞における意義は未知であったため、INS-1 細胞を用い、siRNA トランスフェクションにより発現抑制を行ったところ、GSIS 試験により 3mmol/l グルコース下においてインスリン分泌の亢進が認められた。また、これらのモチーフが関与するエピゲノム変化は、遊離脂肪酸の酸化に重要な遺伝子の発現を調節する可能性も示された。

(5) 自然発症 T2D モデルである KK/Ta マウスを 9 週齢にて単独飼育群と群飼育群に分けたところ、単独飼育個体は群飼育と比較して運動量が低下するにもかかわらず摂餌量の増加と体重増加速度の上昇を認め、糖尿病をより早期に発症した。11 週齢は単独飼育群の発症直前の時期にあたり、膵島を採取して H3K27ac ChIP-Seq を行ったところ、群飼育群と比較してマージ H3K27ac のシグナル変化は 5,995 か所で減少、21,153 か所で増加、20,851 か所で不変であり、RNA-Seq データとの統合解析によってやはり遺伝子発現変動とは関連性が認められた。また、変動するマージ H3K27ac 領域に対して HOMER による de novo 転写因子モチーフ解析を行ったところ、増加領域には転写因子 NRF1 の結合配列の有意なエンリッチメントが明らかとなった ($P = 10^{-64}$)。

(6) ゲノムのシス調節領域は、細胞内シグナリング経路と遺伝子転写調節の接点としての役割を担っている。本研究において、C57Bl/6J マウスと KK/Ta マウスに行った環境的介入は異なっており、病態も異なっていたが、増加したマージ H3K27ac 領域にはいずれの場合にも転写因子 NRF1 の結合配列がエンリッチしていたことから、エピゲノム変化には共通のメカニズムが存在する可能性がある。Nrf1 は H3K4me3 が豊富に存在する転写開始点近傍の CpG アイランドに結合する転写因子であり、上述した siRNA による発現制御実験の結果からは、結合領域周辺の H3K27ac 増加により細胞のインスリン分泌は抑制的になると考えられる。そして実際に、44 週間 HFD を摂取させた C57Bl/6J マウスから単離した膵島は対照と比較して、GSIS 試験によりインスリン分泌低下を示すことを見出した()。ところで脂肪細胞においては、Nrf1 は Lsd1 と協調的に作用し、抑制性のヒストン H3K9 の脱メチル化によって褐色脂肪組織選択的遺伝子を正に制御して browning を促進することが知られる()。また、GWAS によって NRF1 遺伝子が obesity-related traits の疾患感受性遺伝子であることも示されている()。これらデータから、個体が体重増加を起こす際に、Nrf1 活性化状態は体重増加に抑制的に作用し、Nrf1 抑制状態は病態促進的な意義を持つこと、NRF1 の作用メカニズムは少なくとも膵島と脂肪組織において発揮される可能性があることが示唆された。今後は、NRF1 の作用にマウス系統間の相違が生じるメカニズムについても検討を行う必要があると考えられた。

< 引用文献 >

- Diabetes Res Clin Pract. 128:40-50, 2017.
- Ann Med. 39:482-494, 2007.
- Nat Genet. 42:255-259, 2010.
- Nat Genet. 49:1458-1467, 2017.
- Nature. 518:197-206, 2015.
- Nat Genet. 47:1228-1235, 2015.

Diabetologia. 57:157-166, 2014.

Antioxid Redox Signal. 22:819-31, 2015. (この文献中の Nrf1 は正式名称 Nfe2l1 の遺伝子。本研究の Nrf1 遺伝子とは異なる。)

Genes Dev. 30:502-507, 2016.

Diabetologia. 61:2608-2620, 2018.

Nat Commun. 5:4093, 2014.

PLoS One. 7:e51954, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Udagawa Haruhide, Hiramoto Masaki, Kawaguchi Miho, Uebanso Takashi, Ohara Imaizumi Mica, Nammo Takao, Nishimura Wataru, Yasuda Kazuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of the taste receptor related G protein, gustducin, in pancreatic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 814 ~ 822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13214	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nammo Takao, Udagawa Haruhide, Funahashi Nobuaki, Kawaguchi Miho, Uebanso Takashi, Hiramoto Masaki, Nishimura Wataru, Yasuda Kazuki	4. 巻 61
2. 論文標題 Genome-wide profiling of histone H3K27 acetylation featured fatty acid signalling in pancreatic beta cells in diet-induced obesity in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 2608 ~ 2620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-018-4735-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南茂隆生, 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 川口美穂, 上番増喬, 平本正樹, 西村渉, 安田和基
2. 発表標題 自然発症糖尿病モデルマウスにおいて環境因子が膵島エピゲノムに及ぼす影響の網羅的検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南茂隆生, 宇田川陽秀, 舟橋伸昭, 川口美穂, 上番増喬, 平本正樹, 西村渉, 安田和基
2. 発表標題 高脂肪食にて活性増加する膵島cis 調節領域の網羅的検討から見出された結合因子Nuclear respiratory factor 1 (Nrf1) の機能的検討
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	安田 和基 (Yasuda Kazuki) (80311611)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	研究相談・協力

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------