

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16193

研究課題名（和文）エピジェネティックな機序を介したNAD代謝による脂肪細胞分化制御機構の解明

研究課題名（英文）NAD mediated mechanism of adipocyte differentiation through epigenetics

研究代表者

岡部 圭介（Okabe, Keisuke）

富山大学・附属病院・客員講師

研究者番号：00770702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肥満の病態、脂肪細胞分化のメカニズムは代謝疾患治療において重要な分野となっている。脂肪細胞分化機序は古くから研究されているが、分化と代謝の変化との関連はこれまでほとんどわかっていなかった。本研究では、3T3-L1細胞分化に伴う代謝の変化を解析し、NAD産生亢進に伴うケトグルタル酸の増加により脂肪細胞分化の主要制御因子であるPPAR α のプロモーター領域のヒストン脱メチル化が引き起こされ、PPAR α の発現を活性化するという“エピゲノムを介した代謝による分化制御機構”を初めて明らかにした。この研究成果から“代謝”や“エピゲノム”が糖尿病等の新たな治療ターゲットになる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により脂肪細胞分化に伴う細胞内代謝の変化が、分化の単なる結果ではなく、エピゲノムを介して分化を制御していることが明らかとなった。これは、“代謝”や“エピゲノム”が肥満症や肥満に関連する代謝疾患の治療標的となりうることを示しており、当該分野における新薬開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Obesity has become a serious problem in public health worldwide. It causes the inflammation in adipose tissue and systemic metabolic disorders. Intracellular metabolic state changes during cell differentiation and it affects the cell fate or the differentiation through epigenetic mechanism. However, it is unknown how metabolic state changes and how it affects in preadipocyte differentiation. In this study, we conducted targeted metabolomics to elucidate the metabolic reprogramming events that occur during 3T3-L1 preadipocyte differentiation. We found that the tricarboxylic acid (TCA) cycle was enhanced, which correlated with upregulated NAD synthesis. Additionally, increased alpha-ketoglutarate (α -KG) contributed to histone H3K9 demethylation in the promoter region of PPAR α , leading to its transcriptional activation. Thus, we concluded that NAD-centered metabolic reprogramming is necessary for the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：NAD ケトグルタル酸 脱メチル化 脂肪細胞分化 肥満症 エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は2型糖尿病をはじめ高血圧症や脂質異常症、メタボリック症候群の基礎を成す病態として重要であり、我が国でも公衆衛生上の大きな問題となっている。肥満の病態を理解するうえで脂肪細胞分化は非常に重要であり、以前から盛んに研究されてきた。これまでの多くの研究からC/EBPファミリーやPPAR γ など転写因子のカスケードによる分化制御機構が明らかとなっており、さらにこれら転写因子の発現にヒストンやDNAのメチル化、ポリADPリボシル化などのエピゲノムが関わっていることが報告されている。エピジェネティックな遺伝子発現調節には様々な代謝物が関わっていることが知られているが、脂肪細胞分化に伴う代謝物の変化とエピゲノム、分化との関連はよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

脂肪細胞分化と分化に伴う細胞内代謝の変化との関連を明らかにすること、さらにこれを肥満症や糖尿病等の肥満に関連する代謝疾患に対する新しい治療開発につなげること。

3. 研究の方法

脂肪細胞分化モデルである3T3-L1前駆脂肪細胞に分化誘導を行い、細胞内代謝の変化を液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)を用いて解析した。また、リアルタイムPCRにより遺伝子発現解析を行った。ニコチンアミドモノヌクレオチド(NAD)合成酵素Namptに対する阻害剤FK866を加え3T3-L1細胞分化に対するNAD代謝の影響を解析した。フラックスアナライザーを用いて解糖系、ミトコンドリアでのエネルギー代謝の変化を解析した。脱メチル化酵素阻害剤JIB-04、クロマチン免疫沈降法を用いてエピゲノム、ヒストン脱メチル化と3T3-L1細胞分化との関連を解析した。野生型マウスにジメチル α ケトグルタル酸を投与し体重の推移を観察するとともに腹腔内ブドウ糖負荷試験(ipGTT)、腹腔内インスリン負荷試験(ipITT)を行い耐糖能、インスリン抵抗性への影響を評価した。また脂肪組織重量、脂肪細胞形態・サイズ、脂肪組織での遺伝子発現解析、メタボローム解析を行った。

4. 研究成果

代謝リプログラミングが本当に脂肪細胞分化に影響を及ぼすのか明らかにするため、3T3-L1前駆脂肪細胞を用いたメタボローム解析、遺伝子発現解析を行うと分化に伴って補酵素であるNADとその前駆体であるニコチンアミドモノヌクレオチド(NMN)の量が著明に増加していることがわかった(図1A)。また、ニコチンアミドからNMNを合成する酵素Namptの発現も分化に伴って誘導されていた(図1B)。そこで、NADの増加が脂肪細胞分化に必要なかどうか明らかにするため、Nampt特異的阻害薬であるFK866で3T3-L1細胞を処理すると、分化に伴うNAD合成が阻害され、成熟脂肪細胞への分化は顕著に抑制された(図1C、D)。一方で、FK866処理と同時にNMNを添加してNADを補充するとFK866で抑制された脂肪細胞分化が回復することがわかった(図1C、D)。

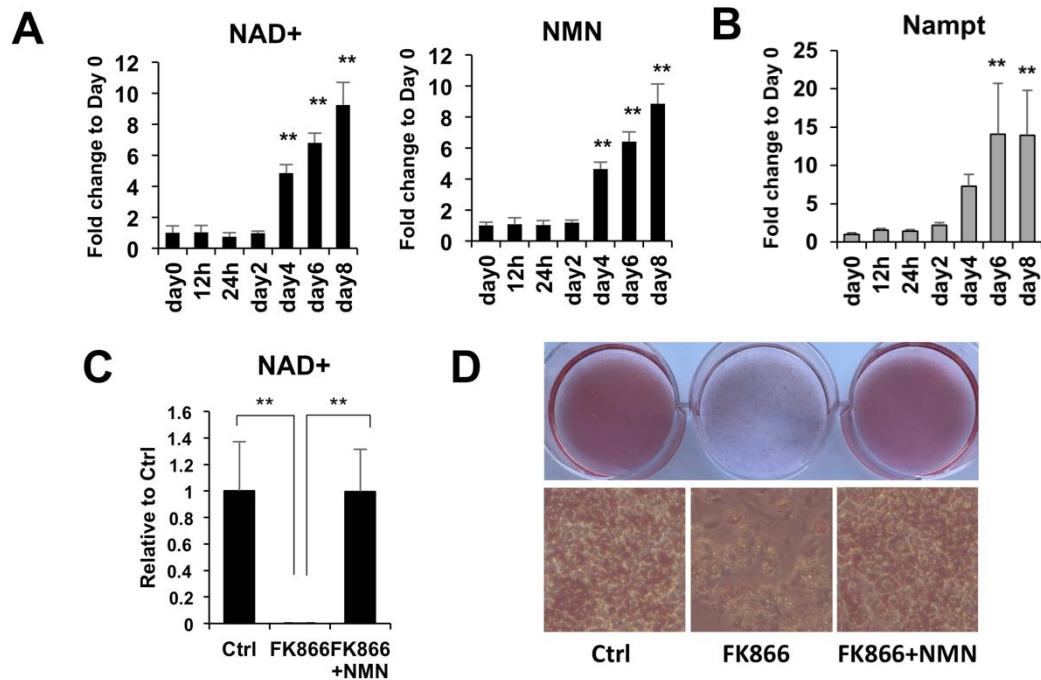


図 1. 前駆脂肪細胞の分化には NAD 代謝の活性化が必要である

このときの脂肪細胞分化に関わる遺伝子発現を解析したところ、分化初期に上昇する転写因子 C/EBP β 、C/EBP δ の発現は FK866 処理による影響を受けない一方、次いで上昇する PPAR γ 、C/EBP α の発現は FK866 による NAD 合成阻害により著明に抑制されていた。これらの結果から NAD レベルの上昇は脂肪細胞分化に必要であり、PPAR γ 、C/EBP α の発現制御に関わることが示唆された。

NAD は細胞内で多くの酸化還元反応・エネルギー産生に関わる補酵素として重要であるが、研究代表者は 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いたメタボローム解析およびフラックスアナライザーによるエネルギー代謝解析から、脂肪細胞分化に伴い解糖系や TCA サイクルでの代謝、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化が亢進することを見出した。さらに、この代謝の変化（代謝リプログラミング）は FK866 処理で阻害されることから、NAD レベルの上昇に依存することを見出した（図 2A）。中でも TCA サイクルの中間体である α -ケトグルタル酸（ α KG）は分化に伴って著明に上昇し、NAD 合成阻害によりその上昇は有意に抑制されていた（図 2B）。 α KG は多くのヒストン脱メチル化酵素のコファクターとなることが知られている¹⁾。また、脂肪細胞分化では複数のヒストンメチル化・脱メチル化が遺伝子発現制御に関与していることが報告されており、特にヒストン H3K9 の脱メチル化は PPAR γ の遺伝子発現に重要であることが報告されている²⁾。そこで次に、NAD 合成亢進に伴う α KG レベルの変化が、脂肪細胞分化時のヒストン H3K9 の脱メチル化ならびに、PPAR γ 遺伝子発現に影響を及ぼすか、クロマチン免疫沈降法を用いて検討した。すると通常、分化に伴い促進される PPAR γ プロモーター領域での H3K9me3 の脱メチル化および PPAR γ の遺伝子発現は FK866 による NAD 合成の阻害により抑制され、 α KG の補充によってレスキューされることがわかった（図 2C）。また、FK866 で阻害された脂肪細胞分化は α KG の添加で解除されていた（図 2D）。以上の結果から、NAD が代謝リプログラミングを介し、 α KG による脱メチル化を中心としたエピジェネティックな機序により脂肪細胞分化を制御していることが示唆された。

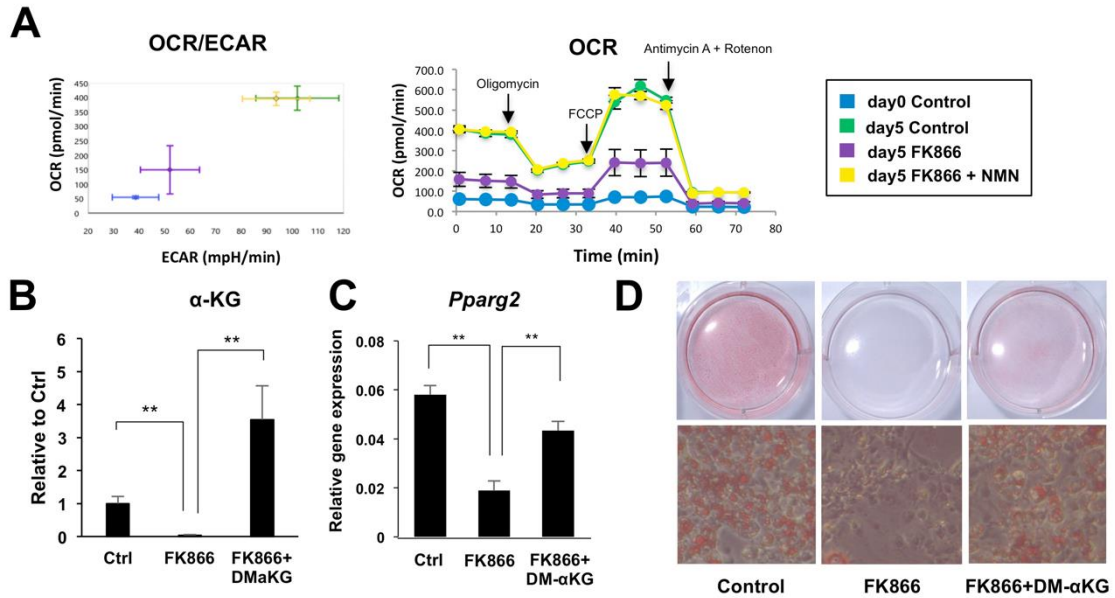


図2. NAD代謝は α ケトグルタル酸を介したエピジェネティックな機序により PPAR γ 、C/EBP α の発現を上昇させることで、前駆脂肪細胞の分化を制する

次に生体での脂肪細胞分化への影響を検証するため野生型 C57BL/6 マウスに高脂肪高ショ糖食を与え肥満を誘導するとともに、飲水に1.5%ジメチル α ケトグルタル酸 (DM- α KG) を添加し同時に摂取させた。すると DM- α KG により食事誘導性肥満および脂肪細胞の肥大化は著明に抑制され (図 3A, B)、白色脂肪組織での *Pparg* をはじめとする脂肪細胞分化に関連する遺伝子発現が増加していた (図 3C)。さらに腹腔内ブドウ糖負荷試験、腹腔内インスリン負荷試験では、肥満の改善に伴い耐糖能、インスリン抵抗性の改善がそれぞれ認められた (図 3C)。

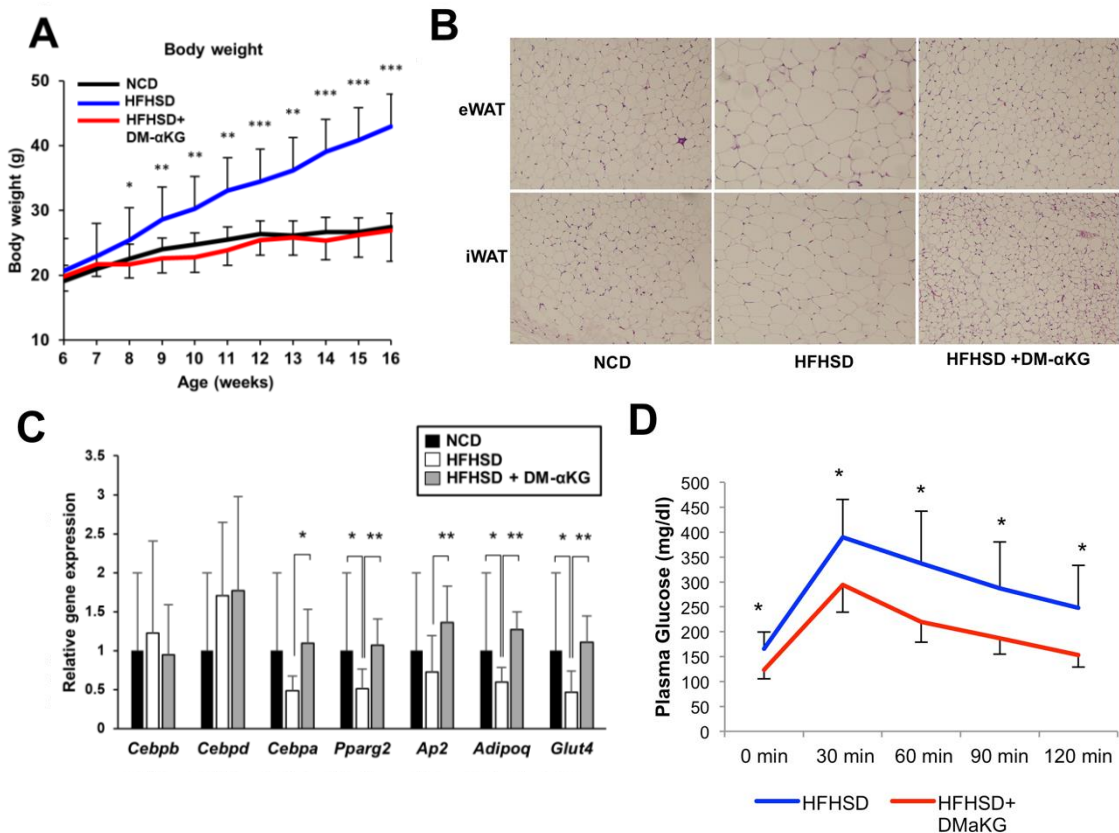


図3. α ケトグルタル酸は脂肪細胞の分化を正常化させることで肥満を抑制する

以上より、脂肪細胞分化に伴って NAD 合成が亢進し、その結果、解糖系や TCA サイクル、ミトコンドリア呼吸鎖などのエネルギー代謝が活性化することがわかった。そして TCA サイクルの中間体である α KG が増加することで、PPAR γ 遺伝子プロモーター領域でのヒストン脱メチル化というエピジェネティックな変化が起こり、脂肪細胞分化での主要な転写因子である PPAR γ の発現が調整されていることを明らかにした。また、高脂肪食誘導肥満マウスにおいても α KG の投

与は、脂肪細胞の分化を促進し、肥満やインスリン抵抗性を改善できることを明らかにした。本研究は、脂肪細胞分化の制御機構を遺伝子発現と細胞内代謝のクロストークという新たな切り口から解明した研究であり、肥満症や糖尿病等の代謝疾患に対する“代謝物”や“エピゲノム”をターゲットとする新規治療薬開発の可能性を示すものである。

<引用文献>

1) Carey BW, Finley LW, Cross JR, Allis CD, Thompson CB (2015) Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 518, 413-416

2) Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, Yoshida A, Kano Y, Kimura H, Tanaka T, Tsutsumi S, Nakao M, Doi T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, Sakai J (2015) H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation. *Mol Cell*, 60, 584-596

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takikawa Akiko, Usui Isao, Fujisaka Shiho, Tsuneyama Koichi, Okabe Keisuke, Nakagawa Takashi, Nawaz Allah, Kado Tomonobu, Jojima Teruo, Aso Yoshimasa, Hayakawa Yoshihiro, Yagi Kunikimi, Tobe Kazuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1411-1418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Hikosaka Keisuke, Nakagawa Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 NAD Metabolism in Cancer Therapeutics	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2018.00622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nawaz Allah, Mehmood Arshad, Kanatani Yukiko, Kado Tomonobu, Igarashi Yoshiko, Takikawa Akiko, Yamamoto Seiji, Okabe Keisuke, Nakagawa Takashi, Yagi Kunimasa, Fujisaka Shiho, Tobe Kazuyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Publisher Correction: Sirt1 activator induces proangiogenic genes in preadipocytes to rescue insulin resistance in diet-induced obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-32600-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okabe Keisuke, Usui Isao, Yaku Keisuke, Hirabayashi Yoshio, Tobe Kazuyuki, Nakagawa Takashi	4. 巻 504
2. 論文標題 Deletion of PHGDH in adipocytes improves glucose intolerance in diet-induced obese mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 309-314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.08.180	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gulshan Maryam, Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Mahmood Arshad, Sasaki Tsutomu, Yamamoto Masashi, Hikosaka Keisuke, Usui Isao, Kitamura Tadahiro, Tobe Kazuyuki, Nakagawa Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Overexpression of Nmnat3 efficiently increases NAD and NGD levels and ameliorates age-associated insulin resistance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e12798-e12798
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ace1.12798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Nakagawa Takashi	4. 巻 47
2. 論文標題 NAD metabolism: Implications in aging and longevity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ageing Research Reviews	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.arr.2018.05.006	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 Yaku Keisuke, Okabe Keisuke, Nakagawa Takashi	4. 巻 32
2. 論文標題 Simultaneous measurement of NAD metabolome in aged mice tissue using liquid chromatography tandem-mass spectrometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Chromatography	6. 最初と最後の頁 e4205-e4205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bmc.4205	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 Okabe K, Nawaz A, Nishida Y, Yaku K, Usui I, Tobe K, Nakagawa T	4. 巻 8
2. 論文標題 NAD ⁺ Metabolism Regulates Preadipocyte Differentiation by Enhancing -Ketoglutarate-Mediated Histone H3K9 Demethylation at the PPAR Promoter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 586179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.586179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okabe K, Yaku K, Tobe K, Nakagawa T	4. 巻 26
2. 論文標題 Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Science	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12929-019-0527-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Okabe K, Nishida Y, Nawaz A, Fujisaka S, Yagi K, Kado A, Igarashi Y, Usui I, Nakagawa T, Tobe K
2. 発表標題 Namp1 deletion changes metabolism in adipose tissue and prevents diet-induced obesity.
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡部圭介, 西田康弘, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 八木邦公, 角朝信, 五十嵐喜子, 薄井勲, 中川崇, 戸邊一之.
2. 発表標題 NADは代謝リプログラミングを介して脂肪細胞分化を制御する.
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Okabe, Yasuhiro Nishida, Allah Nawaz, Shiho Fujisaka, Kunimasa Yagi, Tomonobu Kado, Yoshiko Igarashi, Isao Usui, Takashi Nakagawa, Kazuyuki Tobe
2. 発表標題 NAD-mediated metabolic reprogramming epigenetically regulates gene expression to promote preadipocyte differentiation
3. 学会等名 American Diabetes Association 78th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡部圭介, 西田康弘, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 八木邦公, 角朝信, 五十嵐喜子, 薄井勲, 中川崇, 戸邊一之
2. 発表標題 NAD合成酵素Namp1は代謝リプログラミングを介して前駆脂肪細胞分化を制御する
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

1. 発表者名 岡部圭介, 西田康弘, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 八木邦公, 角朝信, 五十嵐喜子, 薄井勲, 中川崇, 戸邊一之
2. 発表標題 NAD合成酵素Namp1は代謝リプログラミングを介して前駆脂肪細胞分化を制御する
3. 学会等名 第23回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡部圭介, 西田康弘, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 八木邦公, 角朝信, 五十嵐喜子, 薄井勲, 中川崇, 戸邊一之
2. 発表標題 NADは代謝リプログラミングを介して前駆脂肪細胞分化を制御する
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡部圭介, 西田康弘, Allah Nawaz, 藤坂志帆, 八木邦公, 角朝信, 五十嵐喜子, 薄井勲, 中川崇, 戸邊一之
2. 発表標題 NADは代謝リプログラミングを介して前駆脂肪細胞分化を制御する
3. 学会等名 第30回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡部圭介、Allah Nawaz、中川崇、戸邊 一之
2. 発表標題 NAD+- ケトグルタル酸によるエピジェネティックな脂肪細胞分化制御
3. 学会等名 第41回日本肥満学会 ・ 第38回日本肥満症治療学会学術集会
4. 発表年 2021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

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