

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15989

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝疾患の病態形成におけるヒストンメチル化修飾の役割

研究課題名（英文）Role of histone methylation modifications in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease.

研究代表者

中塚 拓馬（Nakatsuka, Takuma）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50772042

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪肝の形成過程において様々なエピゲノム変化が関与することが知られる。ヒストンメチル化酵素G9aを肝特異的に欠損したマウスを用い、G9aが欠損した肝では高脂肪食を摂取した際の脂肪肝の形成が抑制されるとともに、体重増加やインスリン抵抗性の改善も見られることを明らかにした。マウス肝を用いた網羅的遺伝子解析により、G9a欠損肝においては高脂肪食摂取時にPPAR、LXR、RXRといった脂質代謝に関与する転写因子により制御される遺伝子群が変動していた。特に肝細胞への脂肪酸取り込みに関与するCd36の発現がG9a欠損肝で低下しており、脂肪肝改善に関与す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

非アルコール性脂肪性肝疾患は世界中で増加しており健康保健上の大きな問題となっているが、未だ有効な薬物療法が存在しない。生活習慣病を含む様々な病態にエピゲノム異常が関与することが知られているが、本研究の成果によりエピゲノム修飾因子のひとつであるヒストンメチル化酵素G9aが脂肪肝形成やインスリン抵抗性に重要な役割を担うことが明らかとなった。G9a阻害剤により脂肪肝の病態進展を抑制できる可能性があり、脂肪肝に対する新規創薬のたーでつととなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Numerous epigenomic modifications have been established to contribute to the development of hepatic steatosis. Our study employed mice harboring a liver-specific knock out (KO) of the histone methyltransferase G9a, and our findings indicate a decrease in the formation of fatty liver in G9a-KO hepatic tissues upon exposure to a high-fat diet (HFD). Furthermore, these G9a-KO mice exhibited enhanced weight gain and improved insulin sensitivity. Through an comprehensive gene expression analysis of mouse liver samples, we observed alterations in a subset of genes regulated by transcription factors associated with lipid metabolism, PPAR, LXR, and RXR, within the G9a-KO livers during HFD intake. Notably, the expression of Cd36, a pivotal mediator of fatty acid uptake into hepatocytes, was found to be reduced in G9a-KO livers, thereby suggesting its potential involvement in the amelioration of hepatic steatosis.

研究分野：消化器内科 肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 脂肪肝 エピゲノム異常 ヒストン修飾 ヒストンメチル化 G9a

## 1. 研究開始当初の背景

肥満者の増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は世界中で増加の一途を辿っている。我が国の NAFLD 有病率は実に 30%前後であり、そのうち約 10-15%が肝硬変・肝癌へと進展しうる進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) と考えられている。NAFLD とそれに伴う肝不全・肝癌の克服は喫緊の課題であるが、中心となる治療は運動療法や食事療法といった自助努力に依存しているため改善が難しい。新規薬剤開発は世界中で行われているが未だ有効なものがなく、新たな創薬のためには何らかのブレイクスルーが必要である。

NAFLD の発症・進展要因として PNPLA3 遺伝子多型に代表される遺伝素因が知られる一方、生活習慣や環境素因によるエピゲノム変化も病態形成に大きく寄与している。エネルギー供給量に応じた細胞内代謝制御にはエピゲノム修飾による緻密な代謝関連遺伝子群の発現調整が関与しており、実際に脂肪肝の形成過程においても様々なヒストンメチル化修飾因子の発現変化が見られる (Nat Rev Genet.2006;7:715-727)。脂肪肝の進展に伴い、特に脂質代謝遺伝子のクロマチン構造にはヒストン H3 の 4 番目リシン (H3K4) や 9 番目リシン (H3K9) のメチル化修飾が蓄積することが知られ、脂肪肝進展とヒストンメチル化修飾の密接な関連が示唆される (PLoS One.2012;7:e44345)。申請者は H3K9 脱メチル化酵素 KDM3A が脂肪肝からの発癌に促進的に作用することを明らかにしたが (Oncogene.2017;36:6262-6271。) 脂肪肝形成への関与は未解明である。エピゲノム修飾因子はその酵素活性を阻害することで治療標的となるため、NAFLD におけるエピゲノム異常の解明は新規創薬につながる可能性がある。

H3K9 メチル化酵素 G9a は様々な細胞内現象に関与するが、脂肪・筋組織において脂質代謝制御に寄与することが知られる (EMBO J.2013;32:45-59., Diabetes.2020 Sep;db200437.) そこで申請者は、肝脂質代謝における G9a の関与を検討するため、肝特異的 G9a 欠損マウスを用いて G9a が NAFLD/NASH の有望な治療標的となりうるか検討した。

## 2. 研究の目的

本研究は、脂肪肝形成・進展における H3K9 メチル化酵素 G9a の意義を明らかにし、NAFLD 治療における新規エピゲノム医薬創出への橋渡しとなる成果を得ることを目的とする。エピゲノム医薬はすでに一部の悪性腫瘍の治療薬として認可されているが、エネルギー代謝とエピゲノム変化のクロストークは近年非常に注目されており、NAFLD への応用も期待される。しかし、肝代謝システムにおけるエピゲノム修飾の役割はまだ解明すべき点が多く、中でも G9a の肝脂質代謝における役割については培養細胞やマウスを用いた短期間の観察研究の報告のみで、真に生体内での機能を検討した報告はない。そこで、本研究では以下の点について検討した。

- (1) 生体内での脂肪肝進展における G9a の役割
- (2) G9a が制御する代謝関連遺伝子の同定
- (3) G9a が肝代謝に及ぼす影響

## 3. 研究の方法

### (1) 生体内での脂肪肝進展における G9a の役割

G9a<sup>flox/flox</sup> マウスと肝細胞特異的に cre を発現する Albumin-Cre マウスを交配して、肝細胞特異的 G9a ノックアウトマウス (KO) を作成した。このマウスに高脂肪食を摂取させ、脂肪肝形成における G9a の影響を検討した。

### (2) G9a が制御する代謝関連遺伝子の同定

通常食または高脂肪食を摂取したコントロールマウス (WT) および G9a KO マウスの肝臓を用いて、RNA シークエンスにより網羅的遺伝子発現解析を実施した。さらに代謝に関連した遺伝子発現の変化につき解析した。

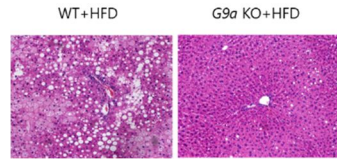
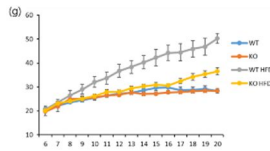
### (3) G9a が肝代謝に及ぼす影響

上述のコントロールマウス (WT) と G9a KO マウスの肝臓を用いて、メタボローム解析を行い、G9a KO による肝代謝の変化につき検討した。

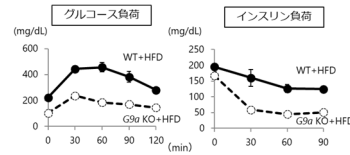
## 4. 研究成果

( 1 ) 生体内での脂肪肝進展における G9a の役割

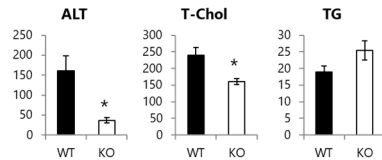
高脂肪食を摂取した際、WT に比較して G9a KO では体重の増加が抑制され、さらに肝臓の脂肪蓄積が著明に抑制されることが明らかとなった。(右図)



また、グルコース負荷試験では G9a KO により血糖値の上昇が抑制されていた。インスリン負荷試験では G9a KO では血糖値が低下しやすく、インスリン感受性が改善していることが示唆された。(右図)



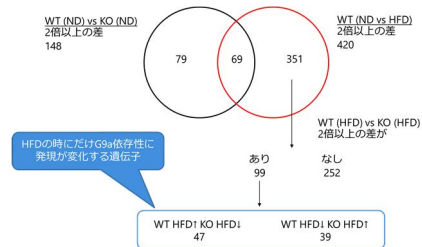
さらに血液検査結果からは、G9aKO では血中のトランスアミナーゼが低く、肝臓の炎症が抑制されていることが示唆された。また、総コレステロールの低下も見られた。(右図)



これらデータから、肝臓での G9a 抑制により脂肪肝のみならず、体重増加や耐糖能異常、脂質代謝が改善できる可能性が示唆された。

( 2 ) G9a が制御する代謝関連遺伝子の同定

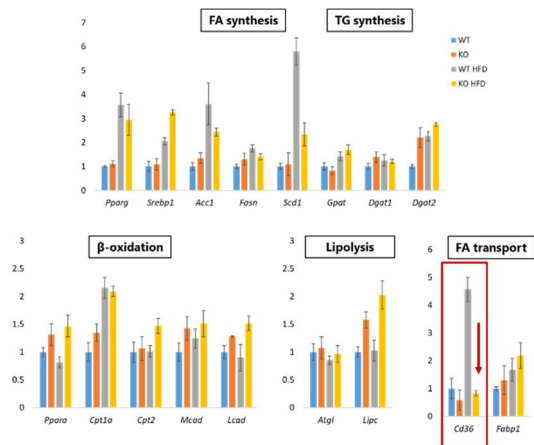
通常食 (ND) または高脂肪食 (HFD) を摂取した WT と G9a KO マウスの計 4 群の肝臓を用いて RNA シークエンスを実施し、網羅的遺伝子発現解析を行った。特に脂肪肝形成において G9a がどのように作用しているかを検証するため、高脂肪食負荷を行った際のみ WT と G9a KO で発現が大きく異なる遺伝子群に着目することにした。右図のように、ND 摂取時の WT と G9a KO で差がないもののうち、WT マウスにおいて HFD 摂取時に発現が 2 倍以上の差を持って変化する遺伝子 351 個を抽出し、さらにその中から G9a KO によって発現が回復する遺伝子 99 個を抽出した。(すなわち HFD 摂取時に G9a 依存性に発現が変化する遺伝子群)



これら 99 個の遺伝子につき、Enrichment analysis を実施した。Biological pathway 解析ではコレステロール・脂質代謝に関連した遺伝子が特に変動していることが明らかとなった。また転写因子との関連で解析すると、LXR、RXR、PPAR といった脂質代謝に関与する転写因子により制御される遺伝子群が変動していることが明らかとなった。(右図)

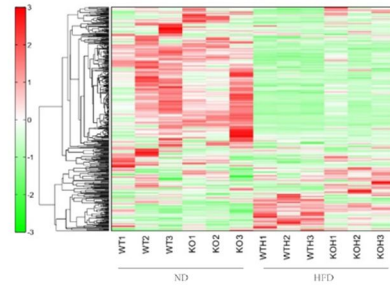
| Rank | Term   | P-value |
|------|--|---------|
| 1    | LXR_22158963_Chip-Seq_LIVER_Mouse                | 0.0000  |
| 2    | RXR_22158963_Chip-Seq_LIVER_Mouse                | 0.0000  |
| 3    | EGR1_23403033_Chip-Seq_LIVER_Mouse               | 0.0000  |
| 4    | ESR1_17901129_Chip-Seq_LIVER_Mouse               | 0.0000  |
| 5    | PPARA_22158963_Chip-Seq_LIVER_Mouse              | 0.0000  |
| 6    | CEBPA_23403033_Chip-Seq_LIVER_Mouse              | 0.0002  |
| 7    | PPARG_19300518_Chip-PET_3T3-L1_Mouse             | 0.0298  |
| 8    | STAT5_23275557_Chip-Seq_MAMMARY-EPITHELIUM_Mouse | 0.0324  |
| 9    | SPI1_26923725_Chip-Seq_MACROPHAGESS_Mouse        | 0.0457  |

さらに、肝脂肪蓄積に関与する遺伝子発現につき個別に確認した。脂肪酸合成に関与する Scd1 は HFD 摂取の際 G9a KO で抑制された。中性脂肪合成や酸化や脂肪分解に関与する遺伝子発現には大きな差が見られなかったが、肝細胞への脂肪酸取り込みに関与する遺伝子の中で Cd36 は特に HFD 摂取の際 G9a KO によって発現上昇が顕著に抑制されていた。(右図)



### (3) G9a が肝代謝に及ぼす影響

WT と G9a KO マウスの ND 摂取時と HFD 摂取時の肝臓を用いて、各群 3 ずつでメタボローム解析( CE-TOFMS によるイオン性代謝物質解析と LC-TOFMS による使用性代謝物質解析)を行い、G9a KO による肝代謝の変化につき検討した。検出された 464 の候補化合物につき、階層的クラスタリングを実施した。右図に示す通り ND 摂取時の WT と G9a KO にはあまり差が見られなかった。HFD 摂取時には両マウスとも大きく代謝産物の変動するが、WT と G9a KO で肝内代謝産物に違いがあることが分かる。



### (4) 考察と今後の予定

Cd36 はヒトの脂肪肝の病勢やインスリン抵抗性と関連していることが知られている ( Gut. 2011;60(10):1394-402. )。また、肝臓特異的に Cd36 をノックアウトしたマウスは、HFD 摂取時の肝脂肪蓄積が抑制され、インスリン抵抗性が改善することが知られており ( Endocrinology. 2016;157(2):570-85. )。G9a KO マウスと表現型が類似している。したがって G9a KO によって Cd36 が発現抑制されることで肝への脂肪酸取り込みが抑制されている可能性が考えられる。

G9a を含むヒストン修飾因子は、転写因子と共役して下流の遺伝子発現を制御することが知られている。また一方で CD36 は PPAR により発現制御される分子として知られているため、今後 G9a と PPAR、LXR、RXR といった転写因子がどのように関連して下流の CD36 の発現制御を実施しているかの検証が必要である。免疫沈降クロマチンシーケンスなどによりそのメカニズムにつき明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Nakatsuka Takuma, Tateishi Ryosuke, Koike Kazuhiko | 4. 巻<br>8          |
| 2. 論文標題<br>Changing clinical management of NAFLD in Asia     | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Liver International                                | 6. 最初と最後の頁<br>1-14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/liv.15046                 | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|