

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19513

研究課題名（和文）Epigenome readerによる環境記憶形成機構の解明

研究課題名（英文）Roles of epigenome readers in environmental adaptation

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：飢餓や飽食などの栄養環境ストレスの蓄積が体質形成に影響を及ぼし、後年のメタボリックシンドロームなどの慢性代謝疾患の罹りやすさに投影されると考えられているが、その実体をなす仕組みは不明である。本研究では、飢餓、ミトコンドリア損傷、乳酸負荷等のストレスが遺伝子発現を長期的に変化させる仕組みを明らかにした。これらの成果は、環境ストレスが細胞レベルで記憶される仕組みの一端を明らかにするものであり、代謝疾患等様々な慢性疾患の病態解明に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会である日本において、継続的な加療を要する慢性代謝疾患の医療効率化は喫緊の課題である。生活環境ストレスの蓄積が慢性疾患の土台であるとする、ストレス記憶の遮断により持続的な医療効果が期待できる。このような発想は以前から存在するが、科学技術的な障壁により実現に至っていない。本研究の成果は、新たな医療技術の開発だけでなく、栄養素や機能性成分の適切な摂取による健康増進法の開発に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Environmental stress factors such as nutrition exert significant influences on our long-term health but the molecular mechanisms remain obscure. In this study, we examined the effects of metabolic stress such as malnutrition, mitochondria damage, and lactic acidosis on gene expression and epigenome formation. We gained insights into how these factors alter gene expression in the long term, and how they affect the cellular features such as growth, survival, and cell fate. Our findings would contribute to the development of health care strategies for the prevention of metabolic disorders and other stress-induced diseases.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：細胞記憶 エピゲノム 栄養環境

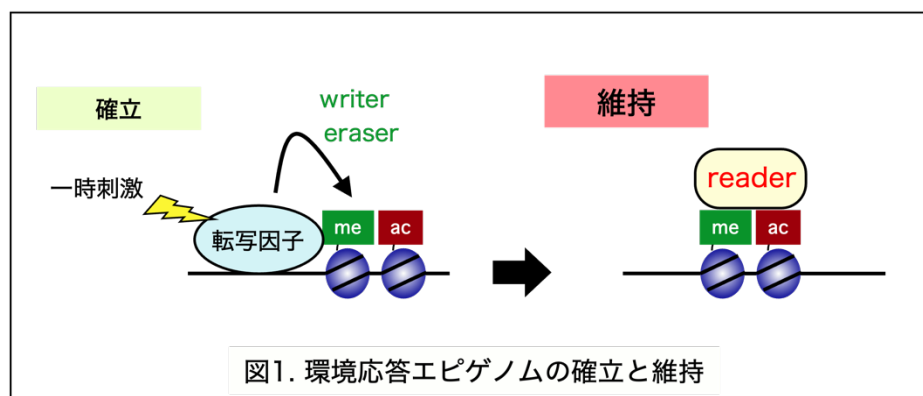
## 1. 研究開始当初の背景

環境摂動によって表現型が決定される現象は、自然界ではしばしば見られる。近年、同様の現象がヒトの体質形成や疾患発症にも関係すると考えられている。特に、胎生期や若齢期の栄養環境ストレスが加齢性代謝疾患リスクに影響を及ぼすとされ、developmental origin of health and diseases (DoHAD) 仮説として認知されているが、その実態はほとんどわかっていない。

ヒトを含む哺乳動物において、環境依存性表現型として認知されているものは少ない。その中で、脂質貯蔵に関わる表現型（肥満、やせ）と運動機能に関わる表現型（速筋優位-スプリンター型、遅筋優位-マラソンランナー型）は、2型糖尿病やサルコペニア等の慢性代謝疾患の予後に大きな影響を及ぼす。

環境因子による表現型決定において、DNA やヒストン修飾などのエピゲノムが細胞記憶として働く。しかし、エピゲノムは環境記憶の担い手であるが、それ自身が記憶の継続性を司っているわけではない。環境応答性エピゲノム変化の大多数はストレス除去後に元に戻る (Ostuni et al. Cell 2013)。エピゲノムは、修飾・脱修飾を担う‘writer’ と ‘eraser’ によって形作られ、修飾を特異的に認識する‘reader’タンパク質によって転写・クロマチン構造制御などの生物学的機能に紐付けされる。申請者はこれまでに、ヒストン H3K4 脱メチル化酵素が環境に応じたエネルギー代謝表現型に重要な役割を果たすことを明らかにした。しかし、writer/eraser の研究によりエピゲノムの動的制御の重要性は解明できたが、エピゲノムが環境記憶媒体として働く仕組みを掘り下げるためには、エピゲノムの選択的維持に特化して働く分子を見つけることが不可欠であると考えた。これまでに、申請者や他のグループにより reader タンパク質が環境応答性

エピゲノムや代謝表現型の形成に重要な役割を果たすことが示されていることから、環境ストレスと長期的な慢性疾患リスクを結びつけるキープレイヤーとしてこれらの分子に注目した (図 1)。



また、低栄養、運動、ミトコンドリア障害、低 pH など様々な代謝ストレスが細胞の長期的性質に強く影響を及ぼすことが知られているが、その分子機序は不明な点が多い。特に個々のストレス因子がどのように長期的な遺伝子発現やエピゲノム変化を生み出すかは不明な点が多い。これらの点は、代謝恒常性が時間をかけて破綻していく過程を理解する上で重要である。

## 2. 研究の目的

上記の状況から、環境応答性エピゲノムによる選択的細胞記憶の形成機序を明らかにし、その代謝表現型形成における役割を明らかにすることを目的として、研究を実施した。具体的には、トランスクリプトーム及びエピゲノム解析を中心とした多層オミクスを基盤として、脂肪及び筋組織、がん細胞の表現型可塑性に関わる分子機序の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

### 1) 一過性栄養ストレスによる長期的エピゲノム変化の分子機序

ストレス細胞記憶の分子機序に用いる評価系の構築を行った。培養筋芽細胞を用いて様々な環境ストレスを加えて遺伝子発現や表現型の長期変化をモニターできる系の樹立を試みた。さら

に、構築した *in vitro* 評価系が生体内を模倣しているかを確認した。この評価系を用いてトランスクリプトーム及びクロマチン構造解析を行い、表現型可塑性に関わる分子の同定を試みた。

#### 2) ミトコンドリア損傷によるエピゲノム制御の分子機序

ミトコンドリア損傷ストレスが核内のエピゲノムに伝達される仕組みを解明するための培養細胞モデルの構築を行った。ミトコンドリアゲノム転写因子 TFAM の機能阻害やエチジウムブロマイド処理によるミトコンドリアゲノム除去を行い、遺伝子発現やエピゲノムの網羅的解析を行った。さらに介在する分子を同定するために gain/loss-of-function 試験や共免疫沈降等の分子レベルの解析を行った。

#### 3) 乳酸アシドーシスによる細胞内代謝リプログラミングとその機序

乳酸アシドーシス環境の細胞への影響を調べるため、胆管がん由来細胞を用いて短期 (24h) 又は長期 (>2 週間) の高乳酸低 pH 培地での培養を行った。細胞内代謝変化やその分子機序を調べる目的で、細胞外フラックス解析、ミトコンドリア染色、RNA-seq 解析等を実施した。

#### 4) 骨格筋の環境可塑性を調節するエピジェネティクス機構

栄養や運動等のストレスに応じた骨格筋の質や量の可塑的变化に関わるエピジェネティクス機構を解明するため、骨格筋特異的にヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を欠損するマウス (LSD1-mKO) を作製した。LSD1-mKO マウスを用いて様々な環境ストレスを負荷した後、筋量、運動パフォーマンス、組織性状や遺伝子発現の解析を実施した。また、分子機序の詳細を明らかにするため、培養筋芽細胞を用いて共免疫沈降、免疫細胞染色、遺伝子発現解析等を実施した。

### 4. 研究成果

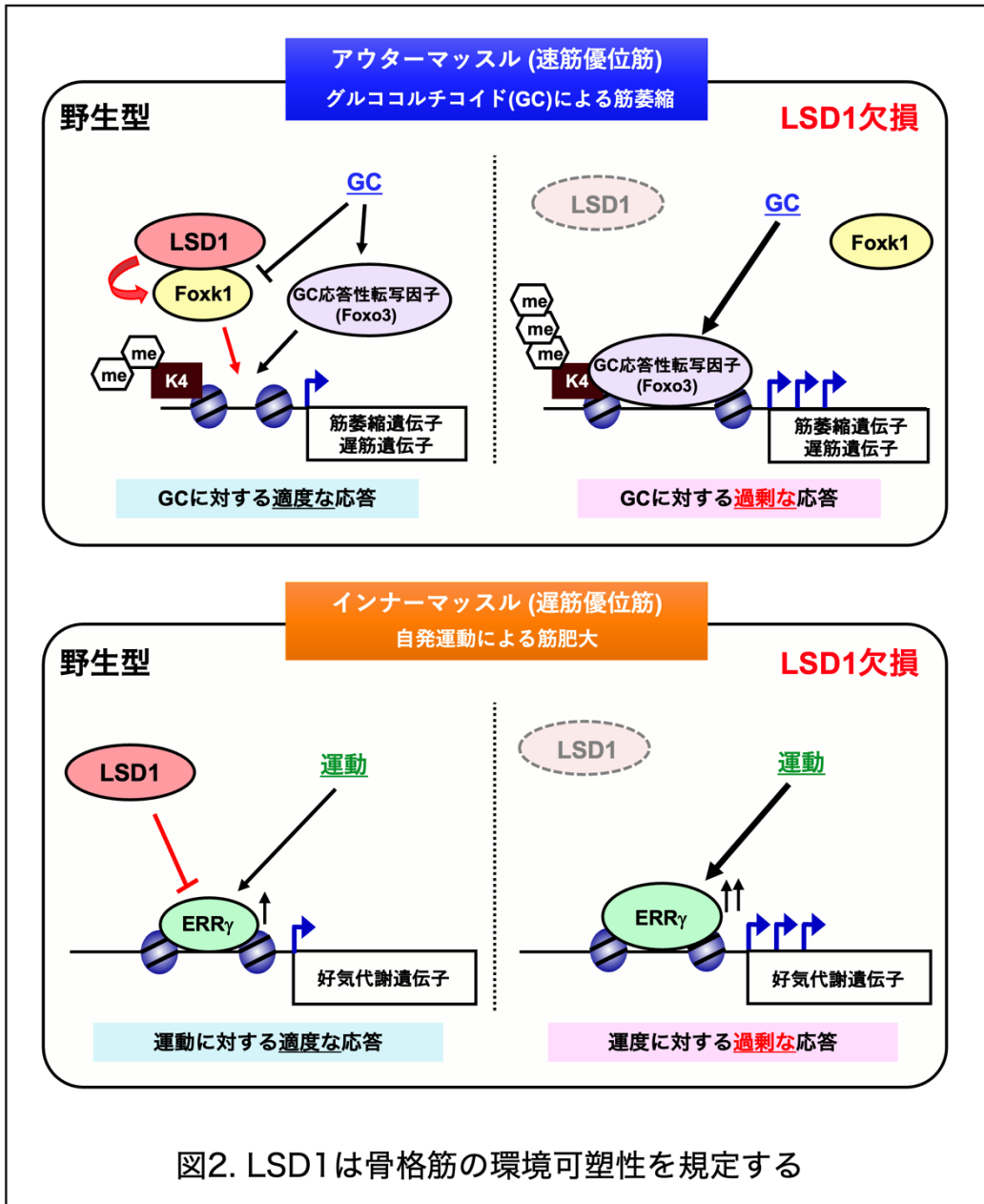
1) 一過性ストレスを負荷した筋芽細胞を用いて RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、継続的な発現変化を来す遺伝子群と元に戻る遺伝子群を同定・分類することが出来た。興味深いことに、それぞれの遺伝子群と連動して発現変化を生じる reader 遺伝子を同定することができ、コードされる reader の発現変化も確認できた。さらに ATAC-seq 法によりストレス誘導性クロマチン構造変化が長期維持されるゲノム領域を同定し、その制御に関わる転写因子等の核内因子の候補を同定した。いくつかの候補因子の機能解析を行った結果、実際にストレス応答性遺伝子制御に関わるものを見出した。また、これまで培養細胞を用いてストレス記憶モデルを構築してきたが、同様の現象がマウス個体でも観察できることが新たにわかった。これらの成果は、環境ストレスが長期的な体質形成に関わる可能性をエピジェネティクスの視点から明らかにしたものであり、糖尿病などの代謝疾患の他、サルコペニア等の加齢性疾患の病態解明に資するものである。

2) 核ゲノムの情報がミトコンドリアの形成や機能を制御する仕組みはよく知られているが、ミトコンドリア DNA が核機能に作用する仕組みはあまりわかっていない。本研究では、ミトコンドリア DNA の機能を調節する転写因子 TFAM が阻害されると、代謝ストレスと物理ストレスにそれぞれ応答する転写調節因子 c-JUN と YAP が協調的に核ゲノムの遺伝子エンハンサーを活性化し、組織修復に関わる分泌因子の発現を誘導することを明らかにした。これらの成果は、ミトコンドリアから核への逆行性シグナルの新機序を提示するものであり、ミトコンドリア機能障害を伴う慢性代謝疾患の理解に資するものである (Hino et al. *Nucleic Acids Res* 2022)。

3) 長期の乳酸アシドーシスにより、細胞遊走性と好気呼吸が活性化させると共に細胞内脂肪蓄積が亢進することがわかった。その分子機序に、液性因子 thrombospondin-1 (THBS1) の発現上昇と分泌が必須の役割を持つことがわかった。本研究により、乳酸アシドーシスのような過酷な環境に胆管がん細胞が適応する仕組みの一端が明らかになった (Thamrongwarangoon et al. *Cancer Sci* 2023)。

4) 速筋・遅筋線維は、異なる環境応答性を示すことが知られている。本研究では、骨格筋特異的に LSD1 を欠損する (LSD1 mKO) マウスを樹立し、環境刺激に対する応答性を検討した。GC 投与による速筋重量及び筋力低下等の筋萎縮症状は、LSD1 mKO により増悪した。また、自発運動

トレーニングによる遅筋重量増加や持久力向上効果は、LSD1 mKO により促進された。これらの二つの現象には、LSD1 による二つの転写因子 (Foxk1 と ERR $\gamma$ ) の制御が介在することがわかった。以上の結果より、LSD1 は環境ストレスを緩衝することで、骨格筋の環境適応の限界を規定していることが示唆された (図2) (Araki et al. eLife 2023)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamazaki Masaya, Hino Shinjiro, Usuki Shingo, Miyazaki Yoshihiro, Oda Tatsuya, Nakao Mitsuyoshi, Ito Takaaki, Yamagata Kazuya	4. 巻 42
2. 論文標題 YAP/BRD4 controlled ROR1 promotes tumor initiating cells and hyperproliferation in pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e112614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022112614	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 日野裕子、日野信次朗、中尾光善	4. 巻 286
2. 論文標題 ミトコンドリアから細胞核への逆行性シグナルによるエンハンサーリモデリング	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 171-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Araki Hiroataka, Hino Shinjiro, Anan Kotaro, Kuribayashi Kanji, Etoh Kan, Seko Daiki, Takase Ryuta, Kohroggi Kensaku, Hino Yuko, Ono Yusuke, Araki Eiichi, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 LSD1 defines the fiber type-selective responsiveness to environmental stress in skeletal muscle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e84618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.84618	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 Thamrongwarangoon Ubonrat, Kuribayashi Kanji, Araki Hiroataka, Hino Yuko, Koga Tomoaki, Seubwai Wunchana, Wongkham Sopit, Nakao Mitsuyoshi, Hino Shinjiro	4. 巻 114
2. 論文標題 Lactic acidosis induces metabolic and phenotypic reprogramming in cholangiocarcinoma cells via the upregulation of thrombospondin 1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1541 ~ 1555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15699	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 該当する

1. 著者名 Hino Shinjiro, Sato Tetsuya, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 2577
2. 論文標題 Chromatin Immunoprecipitation Sequencing (ChIP-seq) for Detecting Histone Modifications and Modifiers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 55 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2724-2_4	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 Hino Yuko, Nagaoka Katsuya, Oki Shinya, Etoh Kan, Hino Shinjiro, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Mitochondrial stress induces AREG expression and epigenomic remodeling through c-JUN and YAP-mediated enhancer activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 9765 ~ 9779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac735	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 Thamrongwarangoon Ubonrat, Detarya Marutpong, Seubwai Wunchana, Saengboonmee Charupong, Hino Shinjiro, Koga Tomoaki, Nakao Mitsuyoshi, Wongkham Sopit	4. 巻 302
2. 論文標題 Lactic acidosis promotes aggressive features of cholangiocarcinoma cells via upregulating ALDH1A3 expression through EGFR axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120648 ~ 120648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2022.120648	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 該当する

1. 著者名 Hayashi Yoshiki, Kashio Soshiro, Murotomi Kazutoshi, Hino Shinjiro, Kang Woojin, Miyado Kenji, Nakao Mitsuyoshi, Miura Masayuki, Kobayashi Satoru, Namihira Masakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Biosynthesis of S-adenosyl-methionine enhances aging-related defects in Drosophila oogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-09424-1	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 日野信次朗	4. 巻 40
2. 論文標題 リボフラビンとフラボタンパク質による細胞制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学増刊 (栄養・代謝物シグナルと食品機能)	6. 最初と最後の頁 1161-1167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Kato Hiromasa, Watanabe Hiroshi, Imafuku Tadashi, Arimura Nanaka, Fujita Issei, Noguchi Isamu, Tanaka Shoma, Nakano Takehiro, Tokumaru Kai, Enoki Yuki, Maeda Hitoshi, Hino Shinjiro, Tanaka Motoko, Matsushita Kazutaka, Fukagawa Masafumi, Maruyama Toru	4. 巻 12
2. 論文標題 Advanced oxidation protein products contribute to chronic kidney disease induced muscle atrophy by inducing oxidative stress via CD36/NADPH oxidase pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 1832 ~ 1847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.12786	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 Kajioka Daiki, Suzuki Kentaro, Matsushita Shoko, Hino Shinjiro, Sato Tetsuya, Takada Shuji, Isono Kyoichi, Takeo Toru, Kajimoto Mizuki, Nakagata Naomi, Nakao Mitsuyoshi, Suyama Mikita, DeFalco Tony, Miyagawa Shinichi, Yamada Gen	4. 巻 118
2. 論文標題 Sexual fate of murine external genitalia development: Conserved transcriptional competency for male-biased genes in both sexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2024067118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2024067118	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 Ohguchi H., (12 authors), Hino S., (16 authors)	4. 巻 2
2. 論文標題 Lysine Demethylase 5A Is Required for MYC-Driven Transcription in Multiple Myeloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 370 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.BCD-20-0108	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 Kohrogi Kensaku, Hino Shinjiro, Sakamoto Akihisa, Anan Kotaro, Takase Ryuta, Araki Hirotaka, Hino Yuko, Araki Kazutaka, Sato Tetsuya, Nakamura Kimitoshi, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 LSD1 defines erythroleukemia metabolism by controlling the lineage-specific transcription factors GATA1 and C/EBP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2305 ~ 2318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020003521	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 日野信次朗	4. 巻 45
2. 論文標題 栄養環境適応におけるエピジェネティクス制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 日野信次朗, 荒木裕貴, 中尾光善	4. 巻 39
2. 論文標題 環境応答性エピゲノム形成と肥満の個人差	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学増刊 (個人差の理解へ向かう肥満症研究)	6. 最初と最後の頁 761-766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 日野信次朗
2. 発表標題 フラビン依存性エピゲノム形成因子による細胞制御
3. 学会等名 北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー (招待講演)
4. 発表年 2024年



1. 発表者名 日野信次朗
2. 発表標題 フラビン依存性ヒストン脱メチル化酵素による環境適応の制御
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（シンポジウム：細胞内ケミカルネットワークの解明と創出）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日野信次朗
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素LSD1による骨格筋環境応答の調節
3. 学会等名 日本体力医学会特別大会（シンポジウム：運動応答臓器におけるエピジェネティクス制御の最前線）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日野信次朗
2. 発表標題 環境因子とエピジェネティクス因子の相互作用による骨格筋の「質」と「量」の調節
3. 学会等名 日本基礎老化学会第43回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinjiro Hino
2. 発表標題 Epigenetic regulation of energy metabolism in health and diseases
3. 学会等名 Center of Translational Medicine Seminar, Khon Kaen University（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日野信次朗
2. 発表標題 栄養シグナルによる代謝型可塑性の制御
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会関東支部 第108回シンポジウム（栄養シグナルによる生体の代謝制御）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日野信次朗、荒木裕貴、栗林寛至、中尾光善
2. 発表標題 栄養シグナルとエピゲノムの連携による代謝表現型の形成
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（シンポジウム：栄養素代謝による細胞制御とその破綻）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日野信次朗
2. 発表標題 白血病細胞の代謝個性を生み出すエピジェネティクス機構 -多層オミクス解析の基礎と応用-
3. 学会等名 WAKO Web受託セミナー -NGSの基礎から最新トピックスまで-（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熊本大学発生医学研究所HP  <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp</a>            プレスリリース「筋肉の過剰な環境適応を抑える仕組みを解明」  <a href="https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20230209">https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20230209</a>            プレスリリース「ミトコンドリアから細胞核への逆行性シグナリングと標的遺伝子の解明」  <a href="https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20220913">https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20220913</a>            熊本大学発生医学研究所HP  <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp</a>            プレスリリース「白血病の代謝の個性を生み出す仕組みを解明」  <a href="https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20210507">https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei-sentankenkyu/20210507</a></p>
---

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			
タイ	コーンケン大学			
ドイツ	ケルン大学			