

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011-2012  
 課題番号：23791021  
 研究課題名（和文）  
   エピジェネティクスによる脂肪細胞分化の制御機構の研究  
 研究課題名（英文）  
   Epigenetic regulation of adipocyte differentiation  
 研究代表者  
 羽田裕亮（HADA YUSUKE）  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号：20436463

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では脂肪細胞分化におけるヒストン修飾を中心としたエピジェネティックな転写制御の役割を検討した。各種細胞の脂肪細胞分化・他系統分化・分化刺激における PPAR $\gamma$  プロモーターにおける bivalent 修飾(H3K4me3+, K27me3+)の変化の ChIP(クロマチン免疫沈降法)による検討では、発生初期段階におけるマウス ES 細胞、胎児線維芽細胞の PPAR $\gamma$  のプロモーターに H3K4me3 陽性・H3K27me3 陽性の bivalent mark を認めた。胎児線維芽細胞の脂肪細胞分化に伴って転写促進型ヒストン修飾である H3K4me3 は変化しないのに対し、抑制型ヒストン修飾である H3K27me3 が減少した。マウスの白色脂肪組織では成熟した脂肪細胞には bivalent mark が認められないのに対し、間質に存在する前駆脂肪細胞において bivalent 修飾が認められ、*in vivo* における幹細胞状態において重要な役割を果たす可能性が示唆された。また bivalent 修飾に関わるヒストン修飾酵素のノックダウンにより脂肪細胞分化が抑制されることから、脂肪細胞の分化のポテンシャルの維持とその解除に PPAR $\gamma$  プロモーターのエピジェネティックな制御が重要であることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

In this study, we demonstrate that the PPAR $\gamma$  promoter is marked by both H3K4me3 and H3K27me3 modifications, i.e. the bivalent modification, in ES cells, murine embryonic fibroblasts (MEFs) and adipocyte progenitor cells in white adipose tissue whereas it is marked by only H3K4me3 in mature adipocytes and adipogenic cell lines including 3T3-L1. Upon differentiation, MEFs lose H3K27me3 at the PPAR $\gamma$  promoter and it resolves to H3K4me3 only. Knockdown of the enzymes that regulate the bivalent modification by siRNA blocks adipocyte differentiation. These findings imply that epigenetic regulation of PPAR $\gamma$  expression in *in vivo* adipocyte progenitor cells plays an important role in adipocyte differentiation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

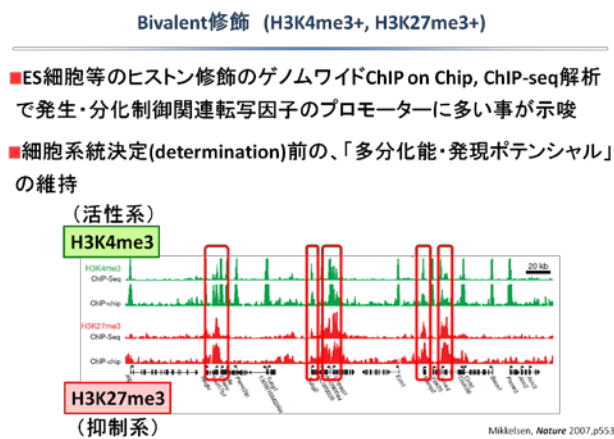
科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：発生・分化、遺伝子、ゲノム、糖尿病、脂肪細胞

## 1. 研究開始当初の背景

分化した細胞は一部を除いて共通の1次塩基配列のゲノムDNAを有するが、細胞が系統・組織特異的で多様性のある遺伝子発現パターンを維持する分子メカニズムとして、エピジェネティクスによるクロマチン構造・遺伝子発現の制御が注目されている。特にDNAのメチル化、ヒストンH3のリジンK4、K27のメチル化などのエピゲノム変化は細胞分裂時にも継承される(細胞記憶)。近年ES細胞などの幹細胞では、活性型のヒストンH3リジン4のトリメチル化(H3K4me3)と、抑制型のヒストンH3リジン27のトリメチル化(H3K27me3)が同時に起こる'bivalent'修飾が、特に発生分化に関わる転写因子のプロモーターに多く存在する事が明らかにされ、発現ポテンシャルを保持しながらも未分化の幹細胞では積極的に発現抑制される事が必要である発生分化に関わる転写因子の転写制御に重要な修飾である事が提唱されている。(図1)

図1



我々は、東京大学先端科学技術センターの油谷浩幸先生のチームとの共同研究により、次世代シーケンサーを用いたFAIRE-seq、ChIP-seqにより、ゲノム上のオープンクロマチン領域(転写制御領域)や転写因子の結合領域、およびヒストン修飾などのエピゲノム状態を解析する技術を確認してきた。白色脂肪細胞の分化系において、FAIRE-seq、ChIP-seqを施行することにより、分化を制御する遺伝子の近傍に存在するエンハンサーを正確に同定し、このような領域が遺伝子の転写開始点から遠位領域に多数存在すること、またクラスターを形成していること、さらに、FAIRE-seqが特定の因子に絞らない“unbiased”なエンハンサー同定方法であることを利用し、分化特異的なエンハンサーに含まれるDNA配列をバイオインフォマティクスによる「結合モチーフ解析」を施行することにより、既知の転写因子(PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , ZFP423)とともに、NFIファミリー

の転写因子を新しい脂肪細胞分化の制御因子として同定し報告している(Waki H et al., PLoS genetics 2011; 7:e1002311)。

こういった背景を利用して、今回脂肪細胞における閥内受容体型転写因子PPAR $\gamma$ の分化の詳細を検討した。

## 2. 研究の目的

核内受容体型転写因子PPAR $\gamma$ は、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、チアゾリジン誘導体の分子標的である。

PPAR $\gamma$ は高脂肪食下でのエネルギー貯蔵に作用し儉約遺伝子として働いており、飢餓状況においてエネルギーを適切に脂肪として貯蔵するのに有利に働く遺伝子である。

PPAR $\gamma$ を通じて脂肪細胞の分化が促進されると、インスリン抵抗性を惹起するようなサイトカイン(TNF $\alpha$ やIL-6、レジスチンなど)を多く分泌する大型脂肪細胞のアポトーシスが促進され、抗動脈硬化作用を示すアディポネクチンの分泌が多い小型脂肪細胞を増加させる。

これまでに動物実験においてPPAR $\gamma$ ヘテロ欠損マウスがインスリン抵抗性をきたしにくいことが知られており、PPAR $\gamma$ 活性の中等度の低下はインスリン感受性ホルモンの増加をもたらす、脂肪酸合成の抑制とエネルギー消費の亢進を介して白色脂肪組織・骨格筋・肝臓に賦する中性脂肪含量を低下させることを通じてインスリン抵抗性を改善する。これまでに3T3-L1細胞を用いた研究で多くの転写因子がPPAR $\gamma$ の上流として示されているが、これらの上流転写因子の発現は基本的にユビキタスであることから、どのような機構でPPAR $\gamma$ が「脂肪細胞に特異的に」誘導されるかは明らかでなかった。脂肪細胞分化におけるヒストン修飾を中心としたエピジェネティックな転写制御の役割を検討した。

## 3. 研究の方法

脂肪細胞を含む各種細胞におけるPPAR $\gamma$ プロモーターにおけるbivalent修飾(H3K4me3+, K27me3+)の変化のChIP(クロマチン免疫沈降法)による検討する。bivalent修飾に関わるヒストン修飾酵素のノックダウンにより脂肪細胞の分化において、PPAR $\gamma$ プロモーターにおいてbivalent修飾によるポテンシャルの維持とその解除にエピジェネティックな制御が重要であるかを検討するために、bivalent修飾を制御する酵素のノックダウンの影響を検討した。

## 4. 研究成果

マウス胎児繊維芽細胞(MEF)の脂肪細胞分化を制御する転写因子のプロモーターをクロマチン免疫沈降(ChIP)で検討したところ、PPAR $\gamma$ 1プロモーターにBivalent修飾

(H3K4me3(+), H3K27me3(+))を認めた。脂肪分化に伴い PPAR $\gamma$ 1 プロモーターのヒストン修飾が H3K4me3(+))のみに変化した。一方、ES 細胞、マウス白色脂肪組織由来の脂肪前駆細胞においても Bivalent 修飾を認めた。一方マウス白色脂肪組織成熟脂肪細胞や 3T3-L1、C3H10T1/2 細胞では既に活性型 H3K4me3(+))のみに変化していた。(図 2、3)

図 2

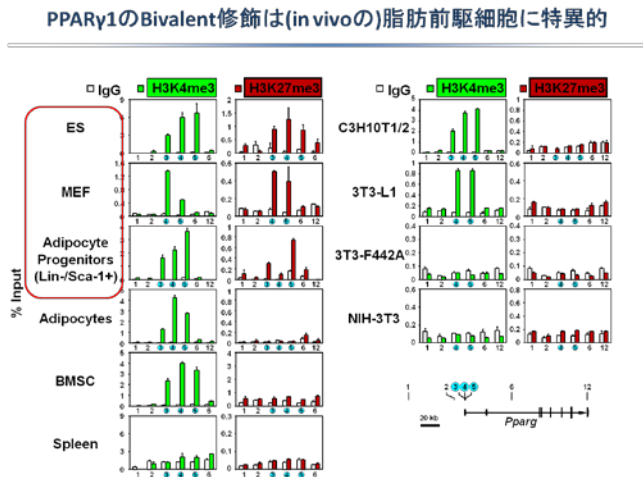
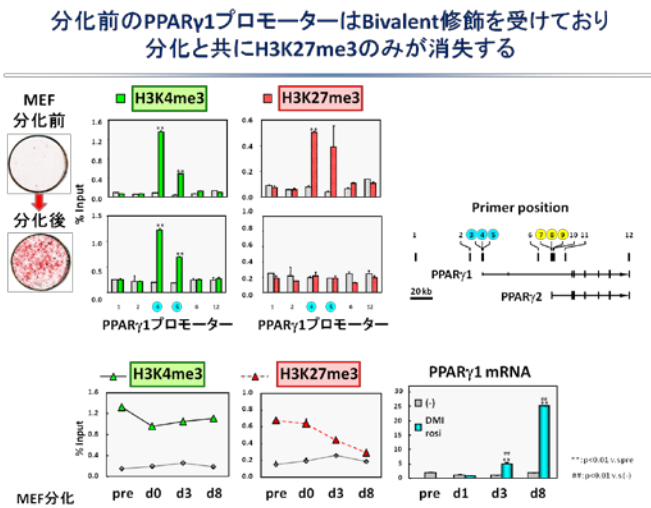


図 3



Bivalent 修飾の制御因子を検討するために、Bivalent 修飾を制御する Jmjd3 と Utx を MEF においてノックダウンしたところ、脂肪細胞分化における PPAR $\gamma$  とその標的遺伝子の発現誘導および、中性脂肪の蓄積が抑制された。ノックダウン細胞では、分化に伴う PPAR $\gamma$ 1 プロモーターの H3K27me3 の消失が减弱していた。(図 4、5)

図 4

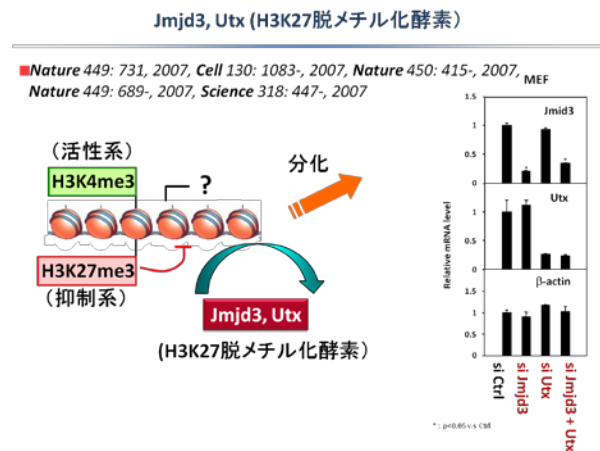


図 5

Jmjd3/Utxのノックダウンにより胎児線維芽細胞MEFの脂肪細胞分化が抑制される

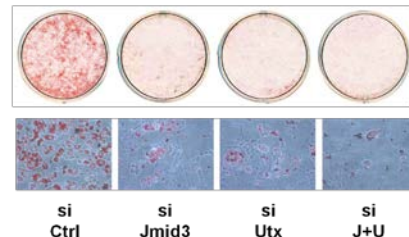
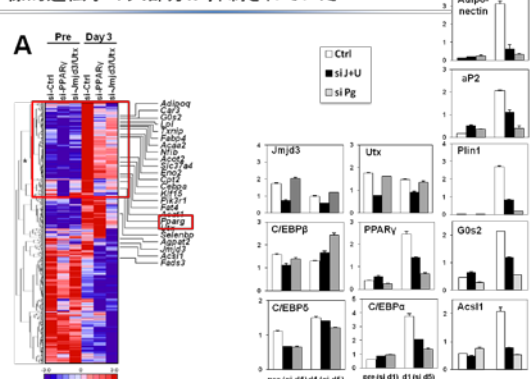


図 6

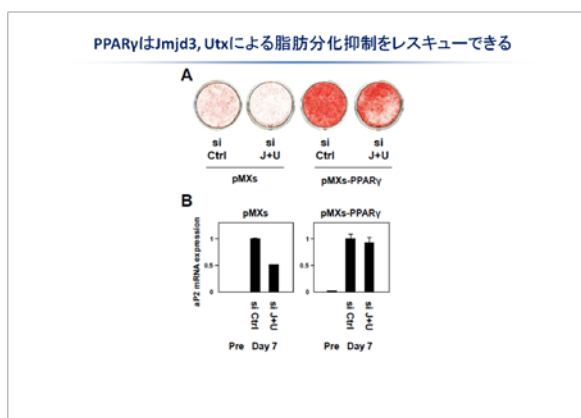
■ マイクロアレイ解析では、Jmjd3/UtxノックダウンによりPPAR $\gamma$ とその標的遺伝子の大部分が抑制されていた



マイクロアレイ解析では PPAR $\gamma$  とその標的遺伝子の発現が抑制され (図 6)、PPAR $\gamma$  強制発現によりレスキューされることから (図

7)、この脂肪細胞分化抑制効果は PPAR $\gamma$  遺伝子のヒストン修飾の変化を介している事が示唆された。

図 7



以上の成果から、PPAR $\gamma$ 1 プロモーターの bivalent 修飾は、前駆脂肪細胞/幹細胞の未分化状態における PPAR $\gamma$  の発現ポテンシャルを規定するヒストン修飾である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

羽田裕亮、山内敏正、門脇孝 「肥満と脂肪細胞の関係」 診断と治療(2012), vol 100, 1795-1802(招待)

[学会発表] (主要発表抜粋、計 5 件)

第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2012 年 5 月 18 日 横浜) 脱メチル化酵素 Jmjd3 と Utx による PPAR $\gamma$  プロモーター領域のヒストン H3 リジン 27 トリメチル化の消失は脂肪細胞分化に寄与する. 于静、脇 裕典、羽田裕亮 他

第 33 回日本肥満学会(2012 年 10 月 11 日 京都) 脂肪分化因子 PPAR $\gamma$  におけるヒストン脱メチル化酵素 Jmjd3 と Utx による H3K27me3 の消失の意義. 于静、脇 裕典、羽田裕亮 他

Keystone Symposia, Adipose Tissue Biology (J5) (2013.1.27-2.1, Keystone), Bivalent Histone Modification at the Promoter and Its Resolution Contribute to the Epigenetic Regulation of PPAR $\gamma$  Gene Expression and Adipocyte Differentiation. Jing Yu, Yusuke Hada, et al.

第 6 回システム疾患生命科学による先端医療技術開発シンポジウム (2012 年 2 月 8 日 東京) PPAR $\gamma$  プロモーター領域の Bivalent ヒストン修飾は脂肪細胞分化ポテンシャルを規定する. 于静、羽田裕亮、他

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2012 年 5 月 16-18 日 熊本) PPAR $\gamma$  プロモーター領域の Bivalent ヒストン修飾は脂肪細胞分化ポテンシャルを規定する. 于静、羽田裕亮、他

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

羽田裕亮 (HADA YUSUKE)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20436463

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し