

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350884

研究課題名(和文) FGF21遺伝子に注目した肝臓におけるエピジェネティックメモリーの解析

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic memory of FGF21 gene in the liver

研究代表者

袁 勳梅 (Yuan, Xunmei)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70392404

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)：周産期の母獣にPPAR α 人工リガンド(Wy)を投与し、産仔(Wy群)と対照群の肝臓におけるFGF21遺伝子発現、血中濃度およびFGF21遺伝子のDNAメチル化状態を解析した。Wy群では対照群と比較して乳仔期におけるFGF21遺伝子のDNA脱メチル化促進が認められ、この状態は成獣期まで維持された。さらに成獣期に高脂肪食を摂餌すると、Wy群では対照群と比較してFGF21遺伝子発現および血中濃度が有意に増加し、体重減少が認められた。乳仔期までに確立したFGF21遺伝子のDNAメチル化状態がエピゲノム記憶され、DNA脱メチル化促進により産生が亢進したFGF21が肥満改善に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nutritional experiences in early life may be stored onto the genome, thereby influencing the risk of obesity in later life. However, the detailed mechanism is poorly understood. In this study, we demonstrated that PPAR α -dependent DNA demethylation of the FGF21 gene occurs in the postnatal mouse liver. Moreover, DNA demethylation of FGF21 gene can be modulated and enhanced by pharmacologic activation of PPAR α , specifically during the suckling period. Of note, the DNA methylation status of FGF21 gene, once established in early life, is relatively stable and persists into adulthood, which can be referred to as epigenetic memory. When DNA demethylation has been markedly induced, hepatic induction of FGF21 expression is exaggerated upon PPAR α activation, which may account in part for the attenuation of diet-induced obesity in adulthood. Thus, we propose that FGF21 could be a key mediator involved in the developmental programming of obesity.

研究分野：応用健康科学

 キーワード：PPAR α FGF21 DOHaD エピジェネティックメモリー DNAメチル化 DNA脱メチル化 エピゲノム記憶
 エピゲノム制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活習慣病は、環境因子と遺伝素因の複雑な相互作用により発症する代表的な多因子疾患であり、発症機序の分子機構として DNA やヒストンの後天的な修飾による遺伝子発現制御 (エピゲノム制御) が注目されている。また多くの疫学調査や動物モデルを用いた研究により、胎生期の栄養環境を反映する出生時体重と成人期に発症する肥満などの生活習慣病の関連が指摘されている (Developmental Origins of Health and Disease; DOHaD 仮説)。

(2) 特に全身臓器の可塑性が高い胎生期および新生児期は、環境変化に応じて多様なエピゲノム変化がもたらされる可能性がある。研究代表者のグループは離乳後のマウス肝臓において、新規脂肪合成の律速酵素である glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1) の遺伝子発現の増加に伴ってプロモーター領域の DNA メチル化が著しく減少すること、この減少が新規 DNA メチル化酵素 DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b) の結合低下によることを証明した (Diabetes 61: 2442-2450, 2012)。しかしながら個別の臓器あるいは細胞におけるエピゲノム変化の全体像は明らかではなく、成人期に発症する生活習慣病における病態生理的意義は不明である。

(3) 研究代表者らは DNA メチル化の網羅的解析法である MIAMI 法 (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers) を用いた解析により、1) 出生直後から離乳前の新生児マウス肝臓では、プロモーター領域の DNA メチル化/脱メチル化の変化が著明であること、2) DNA メチル化と遺伝子発現が逆相関する遺伝子では、そのプロモーター領域に脂肪酸をリガンドとする核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) の結合配列が濃縮されていること、を見出した。

(4) 以上の知見より、胎生期から新生児期に大きく変化する栄養環境が、DNA 脱メチル化を主とするエピゲノム変化によって肝臓における遺伝子発現を調節しており、その DNA 脱メチル化は核内受容体である PPAR を介する可能性が示唆された。

(5) 今回妊娠期の母親の肥満や栄養過多の状態が、生後の子供の代謝機能に与える影響を解明するために、先行研究としてマウス母獣に妊娠前から授乳期まで高脂肪食を負荷した「母獣過栄養実験」を行った。離乳時 (生後 4 週齢) に、産仔の肝臓での遺伝子発現及び DNA メチル化を網羅的 (マイクロアレイ及び MIAMI 法) に解析した。その結果、通常食群に比して高脂肪食負荷群からの産仔にお

いて有意に DNA メチル化が低下し、かつ遺伝子発現が増加していた遺伝子の中に Fibroblast growth factor-21 (FGF21) 遺伝子を見いだした。FGF21 遺伝子は PPAR の標的遺伝子であることが知られている。

(6) FGF21 はグルコース代謝の制御に関与し、インスリン非依存性に脂肪細胞への血中グルコースの取り込みを促進する。また肝臓での脂肪酸酸化を促進し、過食による肥満を抑制する。さらに糖尿病モデルマウス (db/db マウス) や遺伝性肥満モデルマウス (ob/ob マウス) において FGF21 を投与すると、血中グルコースと中性脂肪の濃度が減少することが報告されており、FGF21 は肥満や糖尿病への臨床応用が模索されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、胎仔期～新生仔期のマウス肝臓において、活性化された核内受容体 PPAR が標的遺伝子の FGF21 遺伝子プロモーター領域の DNA 脱メチル化を誘導して転写を制御する可能性を検証する。

(2) さらにマウス肝臓においていったん確立された FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態が成獣期までエピゲノム記憶 (メタボリックメモリー) されるのか、またその場合、FGF21 遺伝子のエピゲノム記憶 (メタボリックメモリー) が成獣期における肥満などの生活習慣病の発症に関連するのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 妊娠・授乳期の母獣マウスに PPAR の人工リガンド Wy14643 (Wy) を投与し、生後 2 日 (D2)、16 日 (D16)、4 週 (4W)、14 週 (14W) 齢の産仔 (Wy 群および対照群) の肝臓における FGF21 遺伝子発現および血中濃度を評価し、さらに FGF21 遺伝子の DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンス法を用いて解析した。また PPAR ノックアウト (KO) マウスを用いて同様の解析を行った。

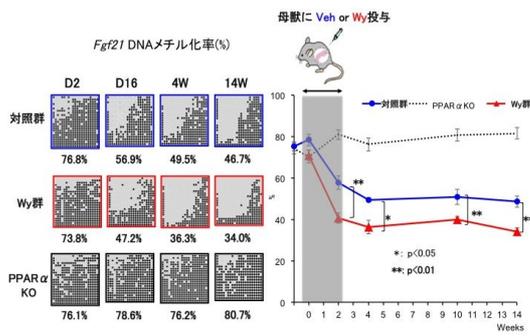
(2) 成獣期の両群において、Wy 単回投与や絶食により一過性に PPAR を活性化させ、DNA 脱メチル化の程度と FGF21 遺伝子および血清濃度の上昇が相関するかを検討した。

(3) FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化の肥満の病態に対する影響を明らかにするため、高脂肪食を両群に 4 週齢から 10 週間負荷し、その代謝表現型を解析した。

4. 研究成果

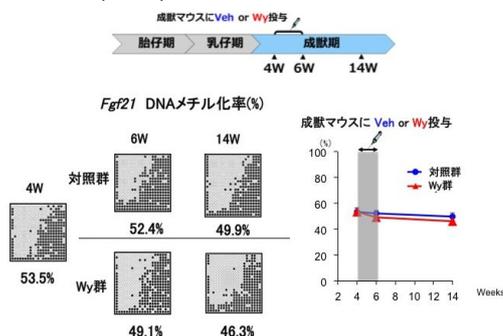
(1) 乳仔期において対照群においても FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が認められた。さらに Wy 群において対照群と比較して FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化が有意に亢進していた。また乳仔期までに形成された DNA メチル化状

態は、対照群および Wy 群において成獣期 (14W) まで維持されていた。一方、PPAR KO マウスでは FGF21 遺伝子の DNA 脱メチル化は乳仔期から成獣期を通して認められなかった (図 1)。



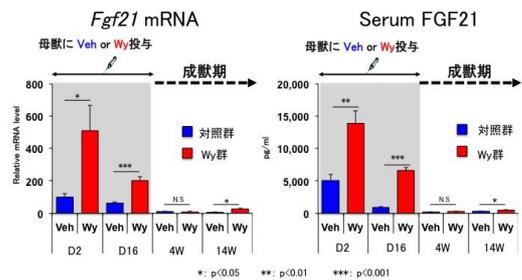
(図1) 乳仔期までに生じたFGF21遺伝子のDNA脱メチル化状態は成獣期まで維持される

(2) Wy (40 mg/kg 体重/day) を 4W から 6W の 2 週間、野生型マウスに投与したが、FGF21 遺伝子の DNA メチル化の変化を認めなかった (図 2)。



(図2) FGF21遺伝子のDNAメチル化状態は成獣期における介入では変化しない

(3) D2 と D16 では Wy 群において FGF21 遺伝子発現と血清 FGF21 濃度の増加が認められた。一方、DNA メチル化状態の差異は不変であるにもかかわらず、4W および 14W では対照群および Wy 群において FGF21 遺伝子発現と血清 FGF21 濃度に顕著な差は認めなかった (図 3)。

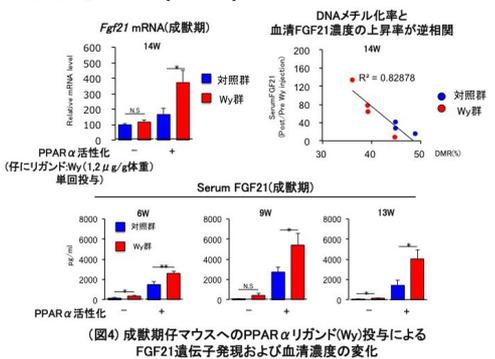


(図3) 成獣期仔マウスにおける血清FGF21濃度および遺伝子発現

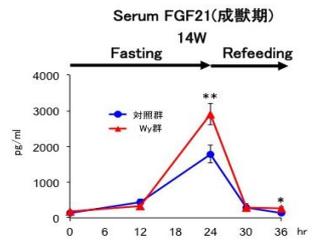
(4) そこで 14W において両群に低濃度の Wy (1,2 μg/g 体重) を腹腔内投与したところ、Wy 群において FGF21 遺伝子発現と血清 FGF21 濃度に対照群と比較して有意な上昇を認めた。これらの低濃度 Wy 投与による、Wy 群における FGF21 遺伝子発現と血清 FGF21 濃度の上昇は 6W、9W および 13W でも認められた (図 4)。

(5) さらに FGF21 発現が増加する絶食下にお

いて、Wy 群における血清 FGF21 濃度の有意な上昇を認めた (図 5)。

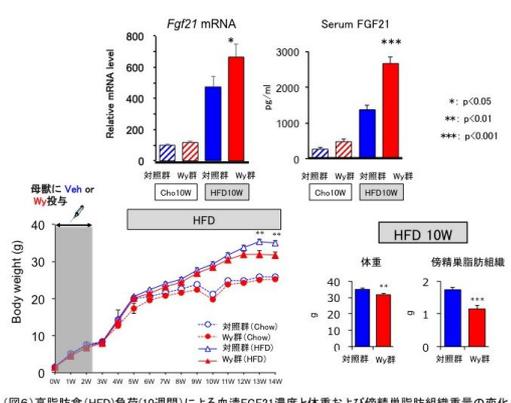


(図4) 成獣期仔マウスへのPPARαリガンド(Wy)投与による FGF21遺伝子発現および血清濃度の変化



(図5) 絶食負荷(Fasting)後の血清FGF21遺伝子濃度の変化

(6) また両群に 4W から 14W の 10 週間、高脂肪食 (HFD: 脂質 60%) を摂餌したところ、高脂肪食負荷 10 週 (14W) の時点での FGF21 遺伝子発現と血清 FGF21 濃度は Wy 群において、対照群と比較して有意に上昇していた。また高脂肪食摂餌 9 週目 (13W) より Wy 群において、対照群と比較して体重が有意に減少した。その体重減少は傍精巢脂肪組織の減少によるものと考えられた (図 6)。



(図6) 高脂肪食 (HFD) 負荷 (10 週間) による血清 FGF21 濃度と体重および傍精巢脂肪組織重量の変化

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 2 件)
 Ehara T, Kamei Y, Yuan X, Takahashi M, Kanai S, Tamura E, Tsujimoto K, Tamiya T, Nakagawa Y, Shimano H, Takai-Igarashi T, Hatada I, Suganami T, Hashimoto K, Ogawa Y. Ligand-activated PPAR -dependent DNA demethylation

regulates the fatty acid -oxidation genes in the postnatal liver. Diabetes. 査読有, 2015, Vol.64, pp775-784. doi: 10.2337/db14-0158.

辻本 和峰、橋本 貢士、袁 勳梅、川堀 健一、榛澤 望、小川 佳宏、エネルギー代謝と DNA メチル化制御、実験医学、査読無、2016、Vol.34、pp2493-2499

〔学会発表〕(計 12 件)

辻本 和峰、袁 勳梅、川堀 健一、橋本 貢士、小川 佳宏 胎生期から乳仔期における Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 遺伝子発現のエピゲノム制御、第 19 回アディポサイエンスシンポジウム、2014 年 8 月 23 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

辻本 和峰、橋本 貢士、川堀 健一、袁 勳梅、小川 佳宏 核内受容体 PPAR を介する Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 遺伝子発現の DNA メチル化制御、第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月 25 日、シーガイアコンベンションセンター(宮崎)

Xunmei Yuan, Yasutomi Kamei, Yoshihiro Ogawa, Epigenetic regulation of hepatic lipid metabolism through neonatal milk intake, 第 4 回食と生命のサイエンス・フォーラム、2014 年 11 月 15 日、東京大学伊藤謝恩ホール(東京)

辻本 和峰、橋本 貢士、川堀 健一、袁 勳梅、小川 佳宏 胎仔期から乳仔期における Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 遺伝子発現のエピゲノム制御機構、第 88 回日本内分泌学会学術総会、2015 年 4 月 23 日、ホテルニューオータニ東京(東京)

辻本 和峰、橋本 貢士、川堀 健一、袁 勳梅、小川 佳宏 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) を介する Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 遺伝子発現のエピゲノム制御、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月 21 日、グランプラス セント・ヴァレンタイン(下関)

橋本 貢士、袁 勳梅、辻本 和峰、川堀 健一、小川 佳宏 胎仔期から乳仔期における Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 遺伝子発現のエピゲノム制御 第 4 回日本 DOHaD 研究会学術集会、2015 年 8 月 1 日、昭和大学(東京)

辻本 和峰、橋本 貢士、袁 勳梅、川堀 健一、小川 佳宏 胎仔期から乳仔期における Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 遺伝子発現のエピゲノム制御、第 36 回日本肥満学会、2015 年 10 月 2 日、名古屋国際会議場(名古屋)

袁 勳梅、辻本 和峰、川堀 健一、橋本 貢士、小川 佳宏 マウス肝臓における FGF21 遺伝子発現のエピゲノム制御とその分子機構の解明 BMB2015、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12

月 1 日、神戸ポートアイランド(神戸) 袁 勳梅、橋本 貢士、辻本 和峰、川堀 健一、榛澤 望、中林 一彦、秦 健一郎、伊東 宏晃、小川 佳宏 胎仔期から乳仔期における母体栄養環境に応じた代謝関連遺伝子発現の DNA メチル化制御、第 37 回日本肥満学会、2016 年 10 月 8 日、東京ファッションタウンビル(東京)

辻本 和峰、橋本 貢士、袁 勳梅、川堀 健一、榛澤 望、小川 佳宏 Fibroblast growth factor 21 遺伝子発現のエピゲノム制御と機能的意義、第 37 回日本肥満学会、2016 年 10 月 7 日、東京ファッションタウンビル(東京)

橋本 貢士、袁 勳梅、辻本 和峰、川堀 健一、榛澤 望、小川 佳宏 Fibroblast growth factor 21 遺伝子の DNA メチル化制御機構とその機能的意義、第 34 回内分泌代謝サマーセミナー、2016 年 7 月 15 日、久山温泉 ホテル夢家(福岡)

高橋 真由美、袁 勳梅、橋本 貢士、小川 佳宏 母獣が摂取する飽和脂肪酸および n-3 系脂肪酸油脂が及ぼす仔の肝臓における遺伝子発現への影響、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 15 日、神戸ポートピアホテル(神戸)

〔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
<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/member/personal/en.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

袁 勳梅 (YUAN, Xunmei)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号：70392404

(2) 連携研究者

橋本 貢士 (HASHIMOTO, Koshi)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・寄附講座准教授
研究者番号：30396642

(3) 連携研究者

小川 佳宏 (OGAWA, Yoshihiro)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：70291424

(4) 研究協力者

辻本 和峰 (TSUJIMOTO, Kazutaka)

(5) 研究協力者

川堀 健一 (KAWAHORI, Kenichi)

(6) 研究協力者

榛澤 望 (HANZAWA, Nozomi)