

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：72609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860227

研究課題名(和文) ヒストンH4メチル化修飾を介したエピジェネティックな脂肪蓄積制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of adipocyte accumulation mechanism through histone H4 methylation

研究代表者

藤井 智明 (Fujii, Tomoaki)

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・部長(移行)

研究者番号：10511420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒストンH4リシン残基をメチル化修飾するSmyd2とSmyd3の脂肪蓄積における役割を明らかにすることを目的としている。野生型およびSmyd2遺伝子欠損マウスの間葉系幹細胞と脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化能を比較したところ、有意な差は見られなかった。また、Smyd2とSmyd3の二重遺伝子欠損マウスは通常食と高脂肪食の両方の採食で、体重増加の傾向を示した。さらに、Smyd2とSmyd3遺伝子の二重欠損マウスの総コレステロールや遊離脂肪酸が野生型マウスと比較して、高値を示していた。今後、他の遺伝子型のマウスについても検討を行う。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to unclear the function of Smyd2 and Smyd3, both of which methylate the histone H4, in adipocyte accumulation. To compare the differentiation into adipocyte in mesenchymal stem cell and preadipocytes of Smyd2^{-/-} and wild type mice, the expression of their adipogenic marker genes was examined. There were no significant differences in their expression between Smyd2^{-/-} and wild type mice. The body weight of Smyd2^{-/-};Smyd3^{-/-} mice elevated compared with wild type with a high-fat diet or normal chow. Smyd2^{-/-};Smyd3^{-/-} mice also had higher plasma total cholesterol and free fatty acids levels than wild type mice. In further study, we will perform these experiments with other genotype mice.

研究分野：遺伝学

キーワード：メチルトランスフェラーゼ エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

Smyd ファミリーは SET ドメインを持ち、ヒストンリシンメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子群である。本遺伝子群は生物種間でよく保存されており、ヒトでは *SMYD1* から *SMYD5* の 5 つの遺伝子から構成される。Smyd ファミリーは腫瘍形成や形態形成など様々な生命現象に関与していることが明らかにされてきている。我々が注目している Smyd3 は大腸癌、肝臓癌、乳癌で発現が亢進しており、そしてその発現が癌細胞の生存や増殖に重要であることが報告されている (Hamamoto et al, *Nat Cell Biol*, 2004)。これまでに申請者らは、ゼブラフィッシュにおいて、*Smyd3* が骨格筋および心臓形成に関与していることを明らかにしてきた (Fujii T et al, *PLoS ONE*, 2011)。

近年、Smyd ファミリーのヒストン修飾パターンが明らかにされつつある。Smyd2 は、ヒストン H3 の 36 番目のリシンをメチル化修飾することが報告されたが再現性がなく、別の部位を修飾するとの報告もあり、議論の余地が残っていた (Brown MA et al, *Mol Cancer*, 2006; Greer EL et al, *Nat Rev Genet*, 2012)。しかし最近、Smyd2 がヒストン H4 を強くメチル化修飾することが報告され (Wu J et al, *Biochemistry*, 2011)、また、Smyd3 がこれまで修飾部位として知られていなかったヒストン H4 の 5 番目のリシン残基をメチル化修飾する新規因子であることが明らかとなった (Van Aller et al, *Epigenetics*, 2012)。

我々は、Smyd3 の機能解析をヒトに変異表現型に近いマウスを用いて機能解析を行ったが、*Smyd3*^{-/-} マウスおよび *Smyd2*^{-/-} マウスは、いずれも顕著な表現型を示さなかった。一方、Smyd ファミリーの中でも Smyd2 は、Smyd3 とその構造と生化学的特徴およびゼブラフィッシュにおける機能が似ているため、ヒトやマウスなどの高等動物において、互いに機能的重複の可能性が指摘されている (Xu S et al, *J*

Mol Cell Biol, 2011; Donlin LT et al, *Genes Dev*, 2012)。

そこで、我々は、*Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-} マウスを作製し、その表現型解析に取り組んできた。

2. 研究の目的

これまでに、Smyd ファミリーはすべて、心臓や筋肉などの中胚葉由来の組織で重要な機能を果たしていることが報告されていることから、我々は、同じ中胚葉由来である血液や脂肪組織に着目して、*Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-} マウスの表現型解析を行い、現在までに、体重が有意に増加した。異常な白色脂肪蓄積 (白色脂肪重量の増加) と白色脂肪細胞の肥大がみられた。異常な褐色脂肪蓄積 (褐色脂肪重量の増加) と褐色脂肪細胞の肥大がみられた。肝臓に著明な脂肪蓄積が見られた。などの結果を得ている。

これらの結果は、ヒストン H4 リシン残基のメチル化修飾が脂肪蓄積制御や血液細胞分化制御に重要な役割を果たしていることを示している。そこで、本研究では、脂肪蓄積に着目し、ヒストン H4 リシン残基のメチル化修飾と脂肪蓄積制御機構の関係を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

肥満に関わる形質を中心とした表現型解析

Smyd2^{-/-}; *Smyd3*^{-/-} マウスの肥満のメカニズムを解明するために、肥満に関わる形質を調べた。

1) 体重測定

野生型マウスと比べて、体重差が生じる時期を明らかにするために、各遺伝子型の 3 週齢の雄のマウスの体重を一週間ごとに測定した。

2) 血液生化学検査

Smyd2^{-/-}; *Smyd3*^{-/-} マウスの肥満の原因に関連すると考えられる項目について血液生化学検査を行った。

脂肪前駆細胞の樹立および脂肪分化能の

比較

1) 脂肪前駆細胞の樹立

*Smyd2^{-/-}; Smyd3^{-/-}*マウスの異常な脂肪蓄積は間葉系幹細胞または脂肪前駆細胞の脂肪細胞への分化異常によるものかを明らかにするために、まず、脂肪前駆細胞に着目し、脂肪前駆細胞の初代培養を試みた。培養はRimらの方法(Rim JS, et al, *FASEB J*.2005)にしたがって行った。

脂肪前駆細胞の樹立の成否は、脂肪細胞への分化誘導を行い、Oil red O染色およびPPERとaP2の脂肪分化マーカーの発現を調べることによって確かめた。

2) 脂肪分化能の比較

脂肪前駆細胞の樹立後、脂肪細胞への分化誘導を行い、各遺伝子型間で、脂肪細胞分化能に違いがあるかどうかを調べた。

間葉系幹細胞の樹立および脂肪細胞分化能の比較

1) 間葉系幹細胞の樹立

次に間葉系幹細胞に着目し、野生型マウスの耳および骨髄から間葉系幹細胞の初代培養を耳および骨髄細胞を用いて試みた。培養方法はRimらの方法(Rim JS et al, *FASEB J*.2005)にしたがって行った。

間葉系幹細胞の樹立の成否は、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化誘導を行い、脂肪においては脂肪染色および分化マーカーの発現、軟骨細胞および骨細胞においては分化マーカーの発現を調べることによって確かめた。骨細胞の分化マーカーは、osteocalcin、脂肪細胞のマーカーは、LPL、aP2、軟骨細胞マーカーは、procollagen IIを用いた。

2) 脂肪分化能の比較

間葉系幹細胞の樹立後は、脂肪前駆細胞の樹立後と同様に脂肪細胞への分化誘導を行い、各遺伝子型のマウスの脂肪前駆細胞との間で、脂肪細胞分化能に違いがあるかどうかを調べた。

4. 研究成果

肥満に関わる形質を中心とした表現型解析

1) 体重測定

通常食では、測定開始後5週目あたりから、高脂肪食では、測定開始後、3週目あたりから、*Smyd2^{-/-}; Smyd3^{-/-}*マウスの体重が野生型のマウスと比べて増加している傾向がみられた。

2) 血液生化学検査

*Smyd2^{-/-}; Smyd3^{-/-}*マウスの肥満の原因に関連すると考えられる項目について血液生化学検査を行った。総コレステロールや遊離脂肪酸は *Smyd2^{-/-}; Smyd3^{-/-}*マウスで高い傾向が見られた。

脂肪前駆細胞の樹立および脂肪分化能の比較

1) 脂肪前駆細胞の樹立

野生型のマウスの脂肪組織から、脂肪前駆細胞を分離し、脂肪細胞へ誘導した。誘導した細胞が脂肪細胞の分化マーカー遺伝子の発現上昇およびOil red O染色により、分離された細胞が脂肪前駆細胞であることが確認できた。

2) 脂肪分化能の比較

野生型および *Smyd2^{-/-}*マウスの脂肪から脂肪前駆細胞を分離し、脂肪細胞に分化したところ、脂肪分化マーカーの発現に差異は見られなかった。この結果は、*Smyd2*が脂肪細胞分化に関わっていないことを示唆する。今後、他の遺伝子型のマウスを用いて、同様の実験を行う予定である。

間葉系幹細胞の樹立および脂肪細胞分化能の比較

1) 間葉系幹細胞の樹立

野生型のマウスの耳および骨髄から間葉系幹細胞を分離し、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化誘導を行った。誘導した細胞が骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞の分化マーカー遺伝子の発現上昇により、分離された細胞が間葉系幹細胞であることが確認できた。

2) 脂肪分化能の比較

野生型および *Smyd2*^{-/-}マウスの耳および骨髄から間葉系幹細胞を分離し、脂肪細胞に分化誘導したところ、脂肪分化マーカーの発現に差異は見られなかった。この結果は、*Smyd2* は、脂肪細胞分化に関わっていないことを示唆する。今後、他の遺伝子型のマウスを用いて、同様の実験を行う予定である。

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7件)

Ikenoue T, Terakado Y, Zhu C, Liu X, Ohsugi T, Matsubara D, Fujii T, Kakuta S, Kubo S, Shibata T, Yamaguchi K, Iwakura Y, Furukawa Y. Establishment and analysis of a novel mouse line carrying a conditional knockin allele of a cancer-specific FBXW7 mutation. *Sci Rep*. 2018 Jan 31;8(1):2021. doi:10.1038/s41598-018-19769-1.

Yamaguchi S, Fujii T, Izumi Y, Fukumura Y, Han M, Yamaguchi H, Akita T, Yamashita C, Kato S, Sekiya T. Identification and characterization of a novel adenomatous polyposis coli mutation in adult pancreatoblastoma. *Oncotarget*. 2018 Jan 6;9(12):10818-10827. doi:10.18632/oncotarget.24017.

Kawai M, Komiyama H, Hosoya M, Okubo H, Fujii T, Yokoyama N, Sato C, Ueyama T, Okuzawa A, Goto M, Kojima Y, Takahashi M, Sugimoto K, Ishiyama S, Munakata S, Ogura D, Niwa SI, Tomiki Y, Ochiai T, Sakamoto K. Impact of chromosome 17q deletion in the primary lesion of colorectal cancer on liver metastasis. *Oncol Lett*. 2016 Dec;12(6):4773-4778. doi:10.3892/ol.2016.5271.

Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. Corrigendum: A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific *Kras* activation and *Pten* deletion. *Sci Rep*. 2017 Jan 3;7:39567. doi:10.1038/srep39567.

Fujii T, Tsunesumi S, Sagara H, Munakata

M, Hisaki Y, Sekiya T, Furukawa Y, Sakamoto K, Watanabe S. *Smyd5* plays pivotal roles in both primitive and definitive hematopoiesis during zebrafish embryogenesis. *Sci Rep*. 2016 Jul 5;6:29157. doi:10.1038/srep29157.

Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific *Kras* activation and *Pten* deletion. *Sci Rep*. 2016 Apr 1;6:23899. doi:10.1038/srep23899.

Iida A, Tabata Y, Baba Y, Fujii T, Watanabe S. Critical roles of DNase113l in lens nuclear degeneration in zebrafish. *Biochimie*. 2014 Nov;106:68-74. doi:10.1016/j.biochi.

[学会発表](計9件)

成人膵芽腫に見られた新規 Adenoma polyposis coli (APC) 遺伝子変異の機能解析
泉 祐毅 山口 茂夫 藤井 智明 韓 敏野崎 由美 山下 親正 加藤 俊介 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2017 年 7 月 27 日

Expression and functional analysis of *Smyd5* in zebrafish Tomoaki Fujii, Shin-ichiro Tsunesumi, Hiroshi Sagara, Miyo Munakata, Yoshihiro Hisaki, Takao Sekiya, Yoichi Furukawa, Kazuhiro Sakamoto, and Sumiko Watanabe
American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016 2016 年 12 月 5 日

癌で高頻度に見られる FBXW7 変異の条件的ノックインマウスの樹立 池上 恒雄, 寺門 侑美, 藤井 智明, 松原 大祐, 山口 貴世志, 古川 洋一 第 75 回日本癌学会学術集会 2016 年 10 月 7 日

Expression and functional analysis of *Smyd5* in zebrafish Tomoaki Fujii, Shin-ichiro Tsunesumi, Shingo Ito, Yoichi Furukawa, Kazuhiro Sakamoto, Sumiko Watanabe 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 26 日

The subsequent epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition model barely depicts colon cancer metastasis
Yu Okazawa, Kosuke Mizukoshi, Hiromitsu Komiyama, Tomoaki Fujii, Mitotoshi Goto, Sonoko Habu, Kazuhiro Sakamoto, Akira

Orimo 第 73 回日本癌学会学術集会 2014 年
9 月 26 日

Expression and functional analysis of
Smyd5 in zebrafish Tomoaki Fujii,
Shin-ichiro Tsunesumi, Shingo Ito, Yoichi
Furukawa, Kazuhiro Sakamoto, Sumiko
Watanabe. 第 20 回小型魚類研究会 2014 年
9 月 20 日

ヒストン H4K5 をメチル化修飾するメチルト
ランスフェラーゼの機能解明 藤井智明
2014 新学術領域「細胞運命」領域班会議
2014 年 9 月 3 日

ヒストン H4K5 メチル化修飾についての機能
解析 藤井智明, 西田知恵美, Heissig Beate,
古川洋一, 坂本一博, 服部浩一 第 28 回モロ
シヌス研究会 2014 年 6 月 27 日

新規ヒストン修飾であるヒストン H4K5 メチ
ル化の造血分化制御における機能解明 藤井
智明, 西田知恵美, Heissig Beate, 古川
洋一, 坂本一博, 服部浩一 新学術領域「細胞
運命」若手の会 2014 年 4 月 19 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

藤井 智明 (FUJII TOMOAKI)
公益財団法人佐々木研究所附属佐々木研究
所・腫瘍ゲノム研究部・部長
研究者番号：10511420

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()