

論文の内容の要旨

論文題目 Epigenetic Regulation of PPAR γ and Adipocyte Function

PPAR γ のエピジェネティックな制御と脂肪細胞機能

氏名 藤木 克則

脂肪細胞の分化の過程は、その前駆細胞における脂肪細胞特異的な遺伝子の発現活性化の過程である。この過程において中心的な役割を果たすのが、配列依存的な転写因子として働く核内受容体ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ) である。PPAR γ は脂肪細胞分化の初期において数百に上る標的遺伝子の発現をリガンド依存的に誘導し、前駆脂肪細胞からの脂肪細胞分化を誘導する。これまでの研究において、PPAR γ をノックアウトしたマウスでは脂肪組織重量の減少がみられる、PPAR γ の強制発現が終末分化した細胞を脂肪細胞様に形質転換するとの報告があるなど、PPAR γ は脂肪細胞分化を誘導するのに必要かつ十分な唯一の『脂肪細胞分化のマスター制御因子』として位置づけられている。

個体を構成する様々な種類の細胞はすべて共通のゲノムを保有しており、それぞれの細胞が固有の形質・機能を継続的に発揮するためには、必要な遺伝子の発現の ON/OFF を細胞ごとに、また細胞世代を通じて調節・記憶しておく必要がある。エピジェネティクスと呼ばれる DNA メチル化やヒストン修飾を介したクロマチンの構造変化によって制御されるこの遺伝子発現調節機構は、個々の遺伝子発現から発生・分化をはじめとした様々な生命現象の基盤となっており、この調節機構の破綻は癌をはじめとする様々な疾患を引き起こすことが明らかにされている。

*

*

*

数々の先行研究により、脂肪細胞分化における PPAR γ 遺伝子の発現活性化機構について多くの知見が得られているが、エピジェネティックな発現制御機構、とりわけ DNA メチル化による発現制御については報告

が皆無であった。はじめに本研究では、この PPAR γ 遺伝子の発現がそのプロモーター領域の DNA メチル化によって制御を受けていることを初めて示した。

脂肪細胞分化のモデル細胞であるマウス 3T3-L1 細胞において分化の前後の PPAR γ プロモーターのメチル化状態を測定したところ、前駆脂肪細胞では PPAR γ プロモーターが高度にメチル化されており、脂肪細胞への分化を誘導するとプロモーターの脱メチル化が進行することが観察された。また、DNA メチル化の阻害剤処理によって PPAR γ プロモーターを脱メチル化したところ、PPAR γ の発現が濃度依存的に上昇する様子がみられた。さらに、PPAR γ プロモーターをもつレポーターコンストラクトを作製し、このプロモーターの活性をメチル化の有無で比較したところ、メチル化した PPAR γ プロモーターでは下流のレポーターの発現が抑制されていた。これらの結果から、脂肪細胞における PPAR γ の発現が DNA メチル化の制御を受けていることが示された。

* * *

脂肪組織は生体中においてエネルギーを脂質として貯蔵する組織であるとともに、アディポカインと総称される様々な生理活性物質を分泌し、全身の代謝を制御する内分泌組織としても働いている。そして、この脂肪組織の肥満はアディポカインの分泌の攪乱を引き起こし、これが糖尿病を始めとしたメタボリックシンドロームの病態形成の一因となっていることが指摘されている。PPAR γ は多くのアディポカインの発現を直接制御しており、したがって脂肪細胞内における PPAR γ の量と活性の変化は、アディポカインの分泌プロファイルに大きな影響を与えることが予想される。そこで本研究では次に、2種類の糖尿病モデルマウスの脂肪組織において PPAR γ の DNA メチル化状態に健常なマウスにはない何らかの変化が生じていないかを検証した。

+Lepr^{db}/+Lepr^{db} マウス(db/db マウス)および高脂肪食負荷糖尿病マウスという2種類の糖尿病マウスから、皮下脂肪組織・内臓脂肪組織(精巣上部部位)を摘出し PPAR γ プロモーターのメチル化状態を解析した。その結果、皮下脂肪組織では肥満による脂肪組織重量の増加、すなわち分化した脂肪細胞の増加に伴って PPAR γ の脱メチル化が進行していた。一方で、内臓脂肪においては、肥満により組織重量が増加しているにもかかわらず、糖尿病マウスで PPAR γ のメチル化が健常マウスよりも亢進しており、これを反映し PPAR γ 発現量が糖尿病マウスで減少している様子も観察された。

この糖尿病マウスの内臓脂肪においてメチル化が亢進しているという実験結果は、メタボリックシンドロームの病因となる脂肪組織のアディポカイン分泌プロファイルの攪乱が、内臓脂肪の PPAR γ プロモーターの DNA メチル化亢進による mRNA の発現低下によって引き起こされていることを示唆している。肥満した内臓脂肪においてメチル化の亢進が観察されたことは、メタボリックシンドロームの病態が内臓肥満のある症例でより顕著であることとも矛盾しない。これらの結果により、本研究は初めて2型糖尿病の病態形成の要因のひとつが脂肪細胞のエピジェネティックな遺伝子発現制御システムの変化であることを明らかにした。

* * *

さらに本研究では、PPAR γ それ自体がもつエピジェネティクス制御因子としての働きにも注目した。PPAR γ は核内において RXR という別の核内受容体とヘテロダイマーを形成して PPAR 応答配列 (PPRE) と呼ばれる特定の DNA 配列に結合し、PPRE 上に様々なコアクチベーターと複合体を形成することにより下流の脂肪細胞特異的遺伝子の転写を活性化する。このコアクチベーターには遺伝子のエピジェネティックな

制御にかかわる分子も含まれており、発現に際しクロマチンの様々な制御を行うことが知られているが、DNA のメチル化の制御についてはこれまでは報告がない。そこで本研究では、この PPAR γ 複合体による脂肪細胞特異的遺伝子の DNA の脱メチル化に注目して研究を行った。

脂肪細胞特異的な遺伝子をもつ PPRE 周辺の DNA メチル化状態を、3T3-L1 細胞の分化前後で比較したところ、分化前には高メチル化状態にあった PPRE 周辺の DNA が、分化後には脱メチル化している様子が観察された。この現象は、本研究でメチル化状態を調べたすべての遺伝子の PPRE で例外なく観察された。そこでさらに、PPAR γ の PPRE への直接の結合が脱メチル化領域を決定したことを示すため、野生型 PPRE および変異を加えた PPRE を持つ Perilipin1 プロモーターをレトロウイルスを用いて 3T3-L1 前駆脂肪細胞へ導入し、脂肪細胞分化のこの領域へのメチル化の影響を観察した。その結果、ウイルス導入 10 日後には野生型/変異型ともに約半数弱が細胞の防御機構によりメチル化によるサイレンシングを受けていたが、その後の分化誘導により、野生型 PPRE をもつプロモーターではメチル化の進行が有為に遅くなった。一方、変異により PPAR γ が結合できなくなったプロモーターではそのままサイレンシングが進む様子が観察された。これらの結果から、PPRE の脱メチル化は、PPAR γ の PPRE への結合が直接引き起こしていることが示された。

最近の研究により、DNA 脱メチル化には TET1 タンパク質による 5'メチルシトシン(5mC)の 5'ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)化とその後の塩基除去修復機構が作用していることが示唆されている。そこで、PPAR γ による DNA 脱メチル化におけるこれらのメカニズムの関与を検証した。その結果、3T3-L1 の脂肪細胞分化の 5~7 日目において一過性の 5hmC の増加が見られることがわかった。さらに、NIH/3T3 における PPAR γ の強制発現は細胞内の 5hmC の増加を引き起こすことがわかった。またこのとき、脱メチル化領域の周辺で 5hmC が特異的に増加している様子が、抗 5hmC 抗体を用いた DNA 免疫沈降により観察された。shRNA による TET1 のノックダウンは、この領域における 5hmC の生成には TET1 が関与していることを示した。

脂肪細胞分化の過程はポリ ADP リボース合成酵素 (PARP) の阻害剤によって抑制されることが知られている。ポリ ADP リボシル化 (PAR 化) は DNA の複製や損傷に反応して起きるタンパク質修飾であり、DNA 修復関連酵素などの損傷部位へのリクルートや周辺部位でのクロマチン構造の変化に関与しているとされている。また先行研究において、PARP が PPAR γ 複合体中に含まれ、その働きを調節していることも示されている。この PAR 化の PPAR γ による領域限定的な脱メチル化への影響を PARP 阻害剤を用いて検証したところ、阻害剤濃度依存的な脱メチル化の抑制が引き起こされる様子が観察された。さらに PARP の阻害は PPAR γ による PPRE 周辺の 5hmC の増加を妨げることも明らかとなった。すなわちこの結果は、PPAR γ 複合体中の PARP による PAR 化が、PPRE 周辺の TET1 による 5hmC 化に関与をしていることを示唆している。

DNA の脱メチル化を引き起こす刺激が加えられた際に、膨大な遺伝子の情報の中から標的となる遺伝子を選び出すという、エピジェネティックな変化の領域決定の過程がどのようになされるのかに関してはこれまでに報告がない。分化誘導に際して核内受容体 PPAR γ がその結合配列 PPRE に結合することにより、PAR 化を介した領域限定的な 5mC の 5hmC 化によって脱メチル化領域を決定しているという今回の報告は、DNA 脱メチル化の領域決定機構の解明の端緒となる重要な発見である。