

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860150

氏 名 阿部 陽平
(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： カリフォルニア大学サンディエゴ校 （国名： アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）
エビゲノム酵素に制御させた脂肪組織マクロファージの炎症性遺伝子ネットワーク解析
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
カリフォルニア大学サンディエゴ校 医学部
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

1. SETD5 ノックアウトマウスおよび NCoR1 ノックアウトマウスの表現型解析

知的障害や自閉症患者の多くに SET domain containing 5 (SETD5) の欠損や点変異が確認されているが (Kuechler et al., 2015)、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。その理由の一つに、全身性 SETD5 ノックアウトマウスは耐性致死になるため、マウスを用いた SETD5 の機能解析に困難があることが挙げられる。そのため、コンディショナル SETD5 ノックアウトマウスの樹立が急務である。

一方で SETD5 の機能を明らかにする上で、その結合タンパク質である転写コリプレッサー NCoR1 との相互作用が重要であると考えられている。これまで本研究室では、NCoR1 マクロファージ特異的ノックアウト (NCoR1 KO) マウスは、高脂肪食負荷で肥満を呈するが、インスリン抵抗性の増悪から免れることを報告している (Li et al., 2013)。そのメカニズムとして、NCoR1 によって抑制されていた liver X receptor (LXR) が、NCoR1 欠損によって活性化状態になり、LXR 標的遺伝子 (*Elovl5* や *Scd2* など) の転写が促進されるため、マクロファージ中の不飽和脂肪酸の産生が増加し、結果として抗炎症作用およびインスリン感受性亢進を誘導させるというものである。不飽和脂肪酸は、骨吸収を担うマクロファージである破骨細胞の活性化を抑制し、骨粗鬆症のリスクを低下させることも報告されており、脂質と骨免疫のクロストークの重要性が示唆される。

本研究でさらに NCoR1 KO マウスの形態を経時的に観察したところ、野生型 (WT) マウスと比較してわずかながらも体重、身長ともに小さいことが分かった。この表現型は、破骨細胞の活性が低下した大理石骨病患者でよく見られる。そこで、マ

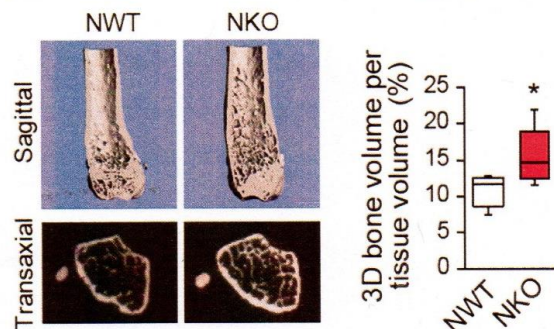


図 1. マクロファージ特異的 NCoR1 ノックアウトマウスは骨密度が高い

マイクロコンピュータ断層撮影によって骨の形態を評価したところ、NCoR1 KO マウスでは海綿骨の間隔が狭く、骨密度が高くなっていることが明らかになった (図 1)。一方で、マクロファージにおける SETD5 が、脂肪組織および骨機能に与える影響を評価するために、SETD5 コンディショナルノックアウトマウスの作製を試みた。SETD5 flox/flox マウスの作製が完了したため、LysM-Cre ドライバマウスと交配し、マクロファージ特異的ノックアウトマウスを得ている。現在、ノックアウトマウスの表現型を評価するために、個体数を集めている最中である。

1. 骨マクロファージにおける NCoR1-HDAC3 複合体の標的遺伝子の探索

破骨細胞において NCoR1 の標的遺伝子を同定すべく、NCoR1 クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) と RNA シーケンス (RNA-seq) を行った。これらの実験では、NCoR1 KO および WT マウスから単離された bone marrow cells に、RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) および M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) を 4 日間処置することで、破骨細胞に分化誘導させる *in vitro* の系を用いた。これまで使用されてきた市販ポリクローナル抗体での NCoR1 ChIP-seq ではノイズが高く、明確な NCoR1 のピークシグナルを見出すことは難しかった。そこで、本研究では浜窪隆雄教授 (現日本医大) らが作製した NCoR1 モノクローナル抗体を用いて ChIP-seq を行ったところ、バックグラウンドが軽減し特異的なピークシグナルが観察できた。さらに転写の活性化マークである H3K27 アセチル化 (H3K27ac) を伴う NCoR1 のピークと NCoR1 複合体タンパク質として知られている Histone deacetylase 3 (HDAC3) のピークは一部 RANKL 刺激依存的に共局在していた。これら NCoR1 および HDAC3 が共局在するピーク (2,757

個) は、RANKL によって誘導される遺伝子と一部オーバーラップしていた (図 2)。この 254 遺伝子について、

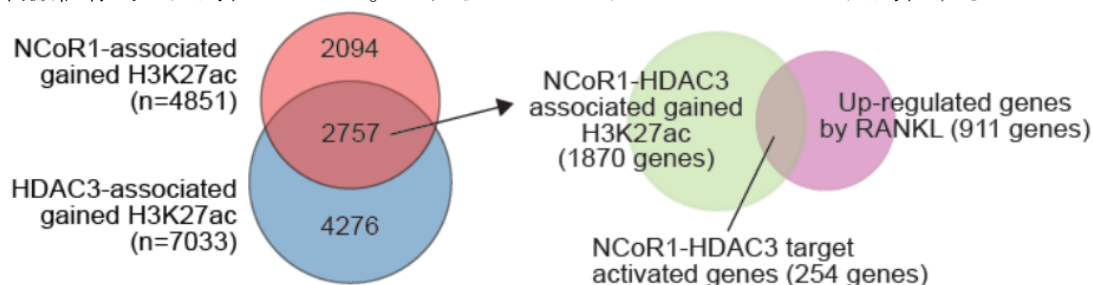


図 2. NCoR1-HDAC3 複合体が局在する 254 遺伝子は RANKL 刺激によって H3K27ac の増加を伴って転写が誘導される

Gene ontology enrichment 解析を行ったところ、予想通り多くの遺伝子が osteoclast differentiation に分類された。また、NCoR1 と HDAC3 が共局在する 2,757 個のピークについて、*de novo* motif 解析を行ったところ、AP-1、NF κ B-p65、PU.1 などの転写因子結合モチーフが上位に濃縮された。そこで、AP-1 ファミリー転写因子である Jdp2 および Fosl2、そして NF κ B-p65、PU.1 の ChIP-seq を行ったところ、確かに破骨細胞関連遺伝子 (*Acp5*、*Ocstamp*、*Gpr68*、

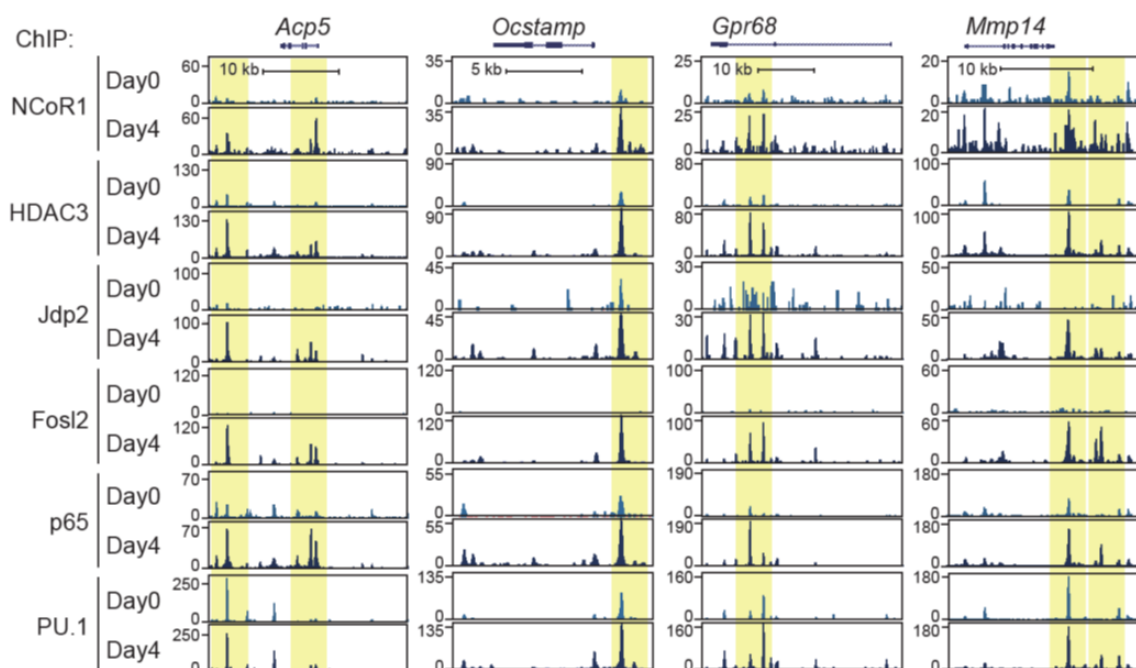


図 3. 破骨細胞関連遺伝子 (*Acp5*、*Ocstamp*、*Gpr68*、*Mmp14*) 上では NCoR1-HDAC3 複合体が転写因子 (Jdp2、Fosl2、p65、PU.1) と共局在する

Mmp14) 上でこれら転写因子が NCoR1-HDAC3 複合体と共局在していた (図 3)。

2. HDAC3 の酵素活性が遺伝子発現に与える影響

NCoR1 は転写コレプレッサーと定義付けられているが、それは NCoR1 がヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 とタンパク質複合体を形成し、その酵素活性によるヒストン脱アセチル化が転写活性の抑制をもたらすことに由来する。一方で、本研究では RANKL 刺激に依存して NCoR1-HDAC3 がリクルートされた破骨細胞関連遺伝子上ではむしろ H3K27ac マークが増加していた (図 2)。そこで、HDAC3 の酵素活性が破骨細胞関連遺伝子の発現誘導に必要などうか明らかにするために、HDAC3 特異的阻害剤 (RGFP966) を用いた各種実験を行った。まず始めに、遺伝子発現プロファイルを評価するために、RNA-seq を行ったところ、RANKL 刺激によって誘導される 523 遺伝子が、RGFP966 によって抑制された。この遺伝子群の中には *Acp5*、*Ocstamp*、*Gpr68*、*Mmp14* を含む多くの破骨細胞関連遺伝子が存在していた (図 4)。そこで、破骨細胞の生理的機能の評価するために、骨吸収

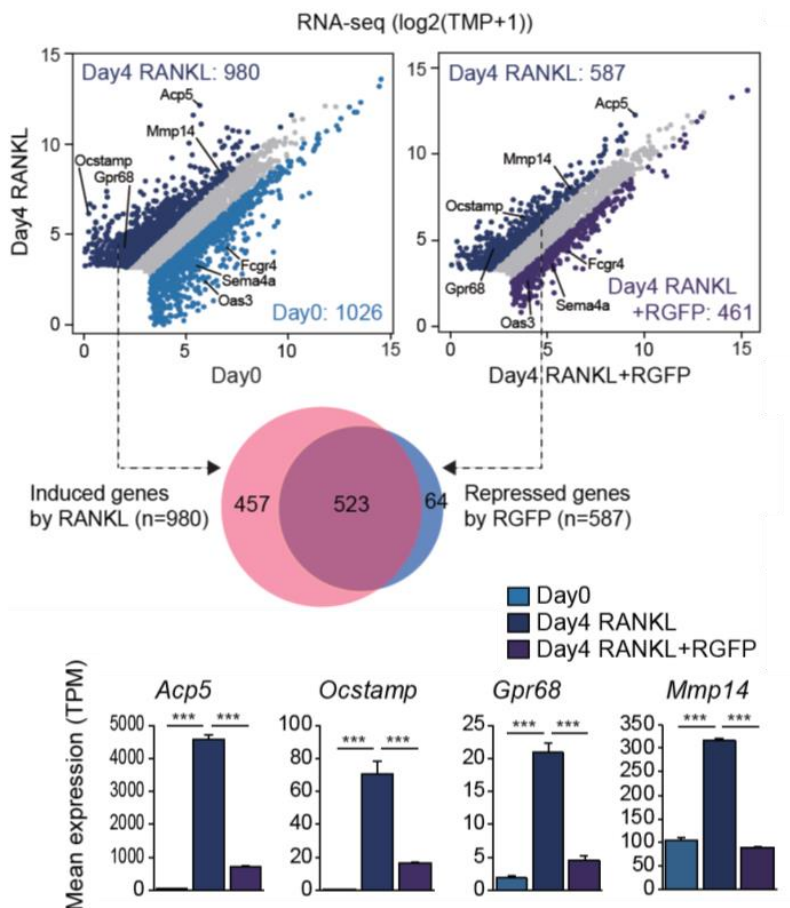


図 4. HDAC3 特異的阻害剤 (RGFP966) は RANKL 刺激によって誘導される遺伝子発現を抑制する

アッセイを行ったところ、予想通り RGFP966 は RANKL による骨吸収活性の上昇を抑制した。

3. HDAC3 の標的タンパク質 PGC1β の遺伝子局在

上述したように破骨細胞関連遺伝子上では HDAC3 による H3K27 の脱アセチル化が見られないため、HDAC3 はヒストン以外のタンパク質を脱アセチル化し、破骨細胞関連遺伝子の転写を活性化している可能性を考えた。褐色脂肪細胞において HDAC3 による Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1α) の脱アセチル化が、熱産生関連遺伝子の転写を促進させることが報告されている (Emmett et al., 2017)。RANKL 刺激で分化した破骨細胞では、PGC1α は発現していないが、PGC1β の発現が増加していた。そこで、破骨細胞では HDAC3 が PGC1β を脱アセチル化し、NCoR1-HDAC3-PGC1β 複合体が破骨細胞関連遺伝子の転写を促進させているものと仮説を立てた。そこで、破骨細胞分化前後で PGC1β を免疫沈降し、その後リジンアセチル化抗体でイムノブロットしたところ、破骨細胞分化前にアセチル化状態にあった PGC1β が、破骨細胞分化後には脱アセチル化されていた (図 5)。次に PGC1β の遺伝子上の局在を確認するために PGC1β ChIP-seq を行ったところ、RANKL 刺激依存的に遺伝子上に局在する PGC1β のピークが 17,239 個確認できた。これらの PGC1β のピークのうち約 20% は、H3K27ac 増加を伴う NCoR1 および HDAC3 のピークと共局在し、多くの破骨細胞関連遺伝子上に存在していた (図 6)。

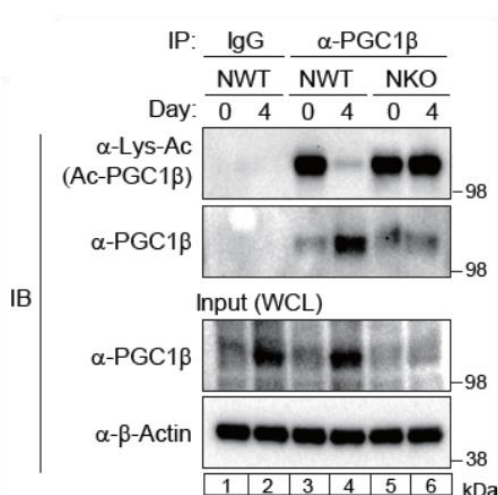


図 5. RANKL 刺激によって増加した PGC1β は脱アセチル化状態にある

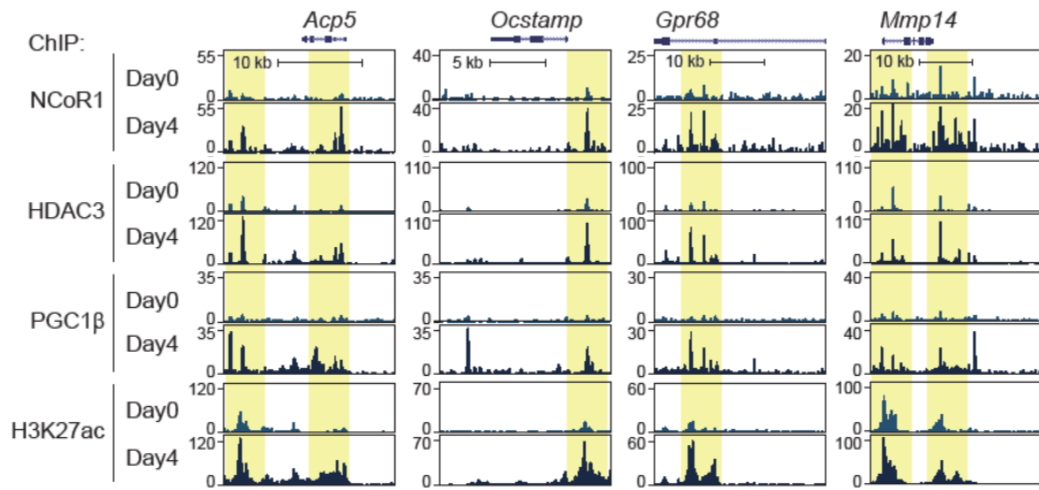


図 6. 破骨細胞関連遺伝子 (*Acp5*、*Ocstamp*、*Gpr68*、*Mmp14*) 上では NCoR1-HDAC3 複合体は RANKL 刺激依存的に PGC1 β と共局在する

4. HDAC3 によって脱アセチル化された PGC1 β の機能

これまでの報告で、脱アセチル化 PGC1 β が遺伝子の転写活性を促進することがプロモータールシフェラーゼアッセイによって証明されている (Kelly et al., 2009)。また、マクロファージ特異的 PGC1 β KO マウスは本研究での NCoR1 KO マウスと同様に大理石骨病の表現型をもつことが示されている (Zhang et al., 2018)。現在、PGC1 β CRISPR KO monocyte progenitor 細胞の樹立に成功し、今後はこの細胞を用いて、RNA-seq と H3K27ac ChIP-seq を行い、PGC1 β の局在によって NCoR1-HDAC3 複合体が転写のコアクチベータとし機能するという詳細なメカニズムの解明に焦点を当てて行きたい。

以上、本研究では、これまで転写のコリプレッサーとしてのみ機能すると考えられきた NCoR1-HDAC3 複合体が、PGC1 β との共局在およびその脱アセチル化によって転写を促進することを証明した。すなわち、NCoR1-HDAC3 複合体がコアクチベータとしても機能するという、これまでの概念を覆す新たな知見を提示した。