

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 31 年度

受付番号 201960088

氏名 平山 実一郎

(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：ボストン（米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

白色脂肪組織の褐色化能に不均一性が存在するメカニズムの解明

3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 2 日～令和 3 年 4 月 1 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：グナファーバー癌研究所

部局名：腫瘍生物学分野

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。

Project 1

褐色脂肪細胞分化の転写制御・エピゲノム制御の網羅的解析

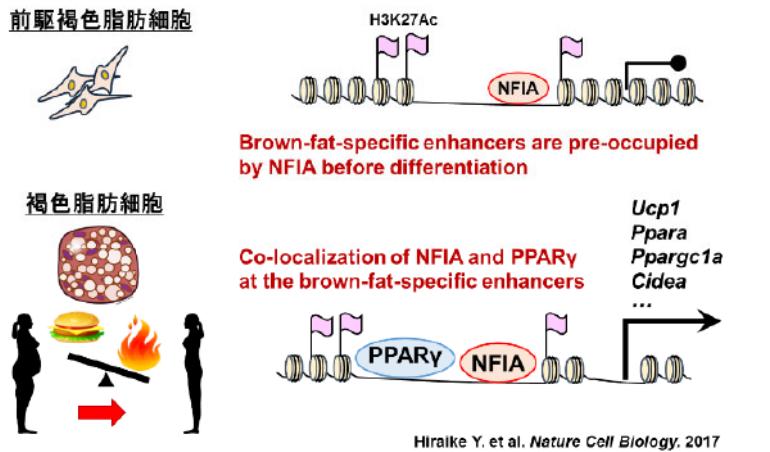
近年、エネルギーの貯蔵を担う白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) 以外に、ミトコンドリアにおける Ucp1 (uncoupling protein-1) の作用を介して熱を產生しエネルギーを消費する褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) がヒト成人にも存在することが分かつてきた。既に BMI と BAT の活性が負に相關すること、加齢に伴い BAT の活性が低下すること、また寒冷刺激や交感神経刺激によって BAT を活性化し全身のエネルギー消費量を増加させられることが報告されている。そのため BAT の数や働きを高めることが肥満症、メタボリックシンドローム、肥満 2 型糖尿病の新しい治療法につながり得るとして期待されている (図 1)。

我々は以前、マウス褐色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) と白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) に対する FAIRE-seq 解析と BAT 特異的オープンクロマチン領域のモチーフ解析から、BAT の分化を正に制御する因子として転写因子 NFIA (nuclear factor I-A) を同定した。NFIA は脂肪細胞分化のマスター転写因子 PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) と BAT 特異的遺伝子エンハンサーにおいて高頻度に共局在 (co-localize) していた。NFIA のエンハンサーへの結合は PPAR γ を含む主要転写因子群の結合に先行し、かつ NFIA の結合は PPAR γ の結合を促進した。また NFIA が結合した時点でその領域はオープンクロマチン構造やヒストン K27 のアセチル化といった活性型エンハンサーの特徴を呈していた。NFIA の導入により筋芽細胞や白色脂肪細胞は褐色脂肪細胞へ分化した。NFIA ノックアウトマウスの BAT では BAT 特異的な遺伝子プログラムの全体が障害されていた一方、骨格筋の遺伝子プログラムは逆に活性化された。またヒト BAT においても WAT と比較して NFIA は高発現しており、かつその発現は UCP1 を含む BAT 特異的な遺伝子群の発現と正に相關していた。以上から NFIA は BAT 特異的遺伝子エンハンサーを活性化し、PPAR γ のエンハンサーへの結合を促進することで BAT の遺伝子プログラムを正に制御すると考えられた (Hiraike Y. et al. *Nature Cell Biology* 2017)。

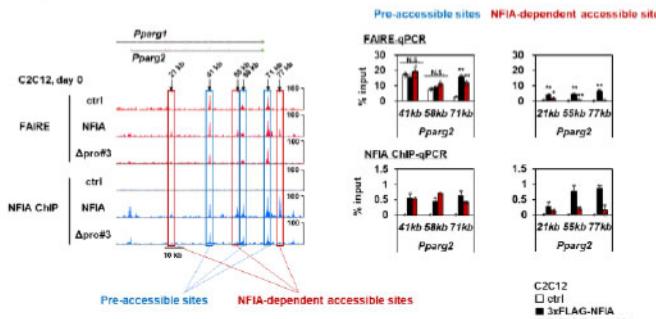
最近、我々は NFIA の最も C 末端側に位置する 17 アミノ酸残基がその転写活性に必須であることを見出した。NFIA の Luciferase reporter 解析から、proline rich domain の中でも最も C 末端側に位置する 17 アミノ酸残基 (pro #3 domain) が転写活性に必須であると考えられた。すなわち、full-length NFIA が保持していた転写活性化能は Δ pro#3 mutant においては完全に失われていた。NFIA flox マウスの白色脂肪組織から stromal vascular fraction (SVF) を採取し脂肪細胞分化を誘導する系において、Cre recombinase 発現 retroviral vector を用いて NFIA を knockout したところ、脂肪細胞分化は著しく障害された。更に、NFIA-KO 細胞に full-length NFIA ないし Δ pro#3 mutant の発現を retroviral vector で rescue したところ、full-length NFIA による rescue では脂肪細胞分化が回復した一方、 Δ pro#3 mutant による rescue では脂肪細胞分化は著しく障害されたままであった。

中胚葉系前駆細胞から褐色脂肪細胞への分化が起こる際には、脂肪細胞の遺伝子プログラムは活性化される一方、骨格筋細胞の遺伝子プログラムは抑制される必要がある。この観点から、筋芽細胞の cell line である C2C12 細胞に full-length NFIA ないし Δ pro#3 mutant を導入し骨格筋分化の抑制作用を評価したところ、 Δ pro#3 mutant は脂肪細胞分化作用を完全に失っている一方で、骨格筋分化のマスター転写因子を code する Myod1 遺伝子や Myog 遺伝子の発現抑制作用は full-length NFIA と同様に保持していた。Transactivation domain 全体を欠損させた deletion mutant (Δ TAD mutant) は脂肪細胞分化作用と骨格筋分化抑制作用の双方を完全に失っていたことも併せると、NFIA による脂肪細胞分化作用と骨格筋分化抑制作用は TAD 内の異なる domain によって担当されており、脂肪細胞分化作用については pro#3 domain が重要である一方、骨格筋分化抑制作用については pro#3 domain とは異なる domain が担っているものと考えられた。

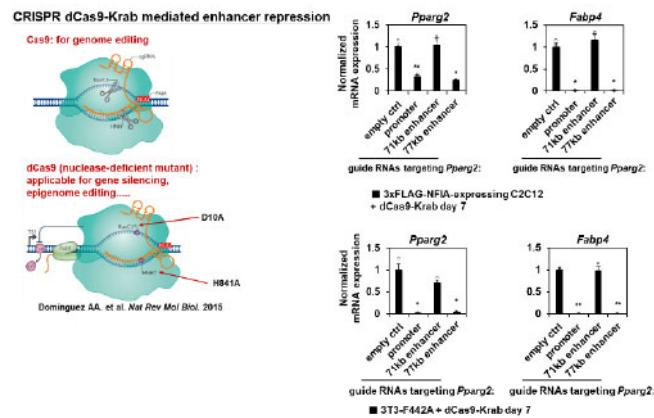
NFIA は PPAR γ と co-localize (共局在) し褐色脂肪特異的な遺伝子プログラムを活性化する新しい転写因子である



Pparg2 enhancerへのfull-length NFIAの結合は脂肪細胞分化に必須である



“NFIA-dependent accessible” Pparg2 enhancerへのfull-length NFIAの結合は脂肪細胞分化に必須である

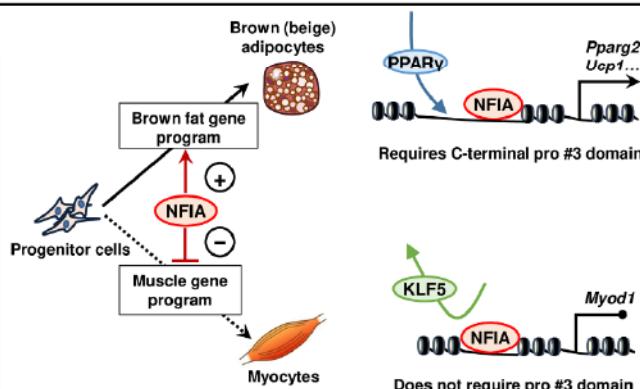


続いて我々は、C2C12 筋芽細胞に empty ctrl、full-length NFIA ないし Δpro#3 mutant のいずれかを導入した細胞で ChIP-seq および FAIRE-seq を実施し NFIA の genome への結合 pattern および chromatin accessibility の変化を genome-wide に解析した。full-length NFIA の結合によってはじめて open chromatin signal が認められ、また Δpro#3 mutant はその部位に十分に結合できず、そのため open chromatin signal も認められない“NFIA dependent-accessible region”に注目した。CRISPR-dCas9-Krab system を用いた検討から、NFIA dependent-accessible region である *Pparg2* 77kb enhancer は NFIA による脂肪細胞分化に必須であることが明らかとなった。

一方、骨格筋分化のマスター転写因子 MyoD を code する *Myod1* 遺伝子近傍にも full-length NFIA 及び Δ pro#3 mutant の結合部位を複数認め、これら部位は full-length と Δ pro#3 mutant いずれの場合においても、NFIA の結合によって open chromatin signal の減弱が観察された。更に publicly available な ChIP-seq dataset と比較したところ、当該の領域は C2C12 においては MyoD 自身や骨格筋分化を正に制御する転写因子 KLF5 の結合部位と重なり、活性型の Histone 修飾である H3K27Ac signal との重なりも認められた一方、3T3-L1 脂肪細胞においては抑制型の Histone 修飾である H3K27Me3 や H3K9Me3 と重なっており、これら NFIA の結合部位が骨格筋分化における機能的な enhancer であること、また脂肪細胞分化においては抑制されていることが示唆された。実際、C2C12 細胞に full length NFIA および Δ pro#3 mutant のいずれを導入した場合においても、NFIA の *Myod1*-26kb enhancer への結合によって KLF5 の同部位への結合 signal が減弱し、その際 H3K27Ac や chromatin accessibility の signal も減弱しており、NFIA と KLF5 が *Myod1* enhancer への結合に関して競合する可能性が考えられた。

従来、脂肪細胞と骨格筋細胞それぞれのマスター転写因子である PPAR γ と MyoD はお互いにその発現を抑制することで、運命決定の一意性を担保することが知られていたが、今回の結果により、NFIA が PPAR γ 依存的な経路と PPAR γ 非依存的な経路の双方を用いて骨格筋分化を抑制することによって、脂肪細胞分化を担保する機能を有していることが判明した (Hiraike Y. et al. PLoS Genetics 2020)。

NFIAは褐色脂肪遺伝子プログラムの促進と骨格筋遺伝子プログラムの阻害の双方を介して褐色脂肪細胞分化を制御する



Hiraike Y. et al. PLoS Genetics 2020 より引用改変

Project 2

体重変動に対する肥満感受性 SNP と定期的な運動習慣の間の gene-environment interaction

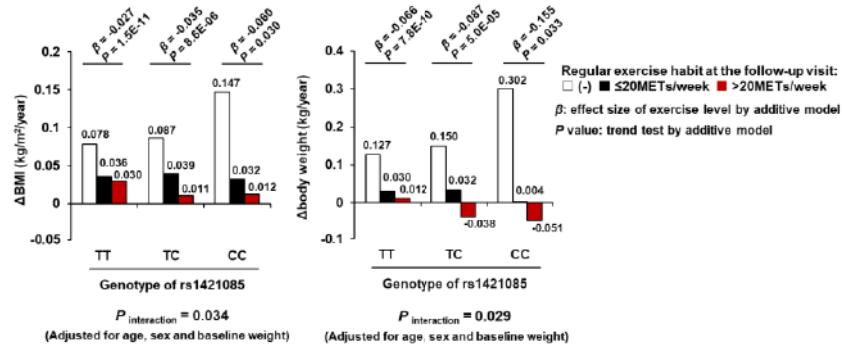
前述の通り、肥満症の克服は健康長寿を実現するうえで大きな課題である。肥満症を含む生活習慣病は、遺伝因子と環境因子およびこれらの相互作用によって発症すると考えられている。遺伝因子は BMI (body mass index) の約 40% 程度を説明すると考えられており、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study, GWAS)によって数百の肥満感受性 SNP (single nucleotide polymorphism, 一塩基多型)が明らかとなっている。中でも FTO 遺伝子の intron 1 と intron 2 の間に位置する SNPs は最大の effect size を有すると報告されており、FTO SNP の risk allele を 1 つ有することによって BMI は 0.25-0.41 kg/m² 上昇し、肥満の odds risk を 1.18-1.27 程度上昇させると報告されている。

遺伝因子と環境因子それぞれの研究に加えて、これら 2 つの相互作用(gene-environment interaction)を検討する研究が近年盛んに行われている。例えば運動習慣や食事摂取、喫煙習慣、アルコール摂取と疾患感受性 SNP の間の gene-environment interaction がよく検討されており、定期的な運動習慣が FTO SNP の BMI に対する効果を減弱させるという interaction が複数の文献で報告されている。しかしこれら文献は cross-sectional に評価された BMI に対する検討であり、臨床的により重要な「追跡期間中における BMI や体重の変動」に対する gene-environment interaction はこれまで十分に検討されていなかった。

我々は Taiwan Biobank の 30 歳から 70 歳までの約 2 万人 (N = 20,906) の被検者を平均 3.7 年間追跡したデータセットを用いて、代表的な FTO SNP である rs1421085 の genotype と定期的な運動習慣の有無 (なし、≤20 METs/週、>20 METs/週の 3 群) が追跡期間中の BMI および体重の変動に対して及ぼす gene-environment interaction について generalized linear model で検討した。rs1421085 はアジア人集団における GWAS においても肥満とゲノムワイド有意水準の相関を示すことが報告されており、また脂肪細胞における causal variant であると報告されている。

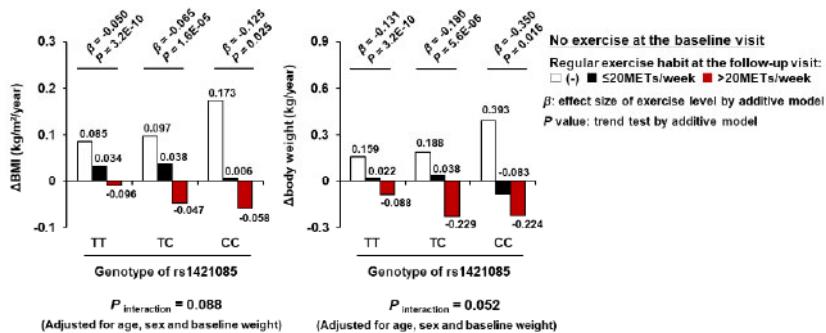
Taiwan Biobank 約 2 万人の cohort を年齢と性別を補正して解析したところ、rs1421085 は baseline の BMI と有意に相関しており ($P = 6.65 \cdot 10^{-11}$)、また運動習慣の有無も dose-responsive に BMI と有意に相関していた ($P = 2.29 \cdot 10^{-18}$)。これを確認したうえで、我々は rs1421085 と運動習慣が追跡期間中の体重および BMI に対して及ぼす gene-environment interaction につき検討した。運動習慣が無い場合、rs1421085 の risk allele holder は non-risk allele holder に比べて体重増加および BMI 上昇の程度が大きい。しかしながら、定期的な運動習慣を有する場合は risk allele holder の方がむしろ体重増加や BMI 上昇が抑制されるという有意な gene-environment interaction を認めた ($P = 0.034$ for Δ BMI and $P = 0.029$ for Δ body weight)。risk allele holder の方が non-risk allele holder に比較して定期的な運動習慣を有していた場合の体重増加抑制効果や BMI 上昇抑制効果が大きく、かつ運動強度に対して dose-responsive な挙動を示した。

体重増加やBMI上昇に対して、FTO遺伝子近傍の肥満感受性 SNPと運動習慣はgene-environment interactionを呈する



続いて我々は baseline で定期的な運動習慣を有していなかった被験者に注目した sub-group 解析を行ったところ、追跡期間中に運動習慣を獲得することで、元々定期的な運動習慣を有していた被験者と同様に体重増加や BMI 上昇が抑制される傾向を見出した ($P = 0.088$ for Δ body weight and $P = 0.052$ for Δ BMI)。

Baseline visitで運動習慣が無いrisk allele holderも、運動習慣を獲得することで体重増加やBMI上昇が抑制される



本研究は Taiwan Biobank のデータを用いて *FTO* 近傍の肥満感受性 SNP である rs1421085 と定期的な運動習慣の有無 (なし、≤20METs/週、>20METs/週の 3 群)の間の有意な gene-environment interaction を示したものであり、比較的均一なアジア人の大規模集団における解析であること、質問紙法による評価であり限界はあるものの運動強度について定量的な評価がされていることが特色である。Gene-environment interaction の存在のために運動による体重増加や BMI 上昇の抑制効果は rs1421085 の risk allele holder の方がむしろ大きいことが示され、将来的には遺伝リスクに応じて個別化された生活指導戦略の確立に資することが期待される(Hiraike Y. et al. **In revision**)。今後は genetic risk score を用いて特定の SNP のみならず各個人の遺伝リスク全体と生活習慣との間の gene-environment interaction を解析すること、Taiwan biobank に加えて UK biobank や Biobank Japan のデータを取得し人種特異的な gene-environment interaction の存在について検討すること等を計画している。