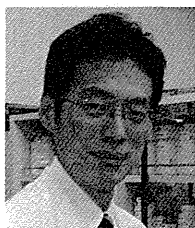


脂肪細胞と転写因子ネットワーク研究：最近の展開

—次世代シーケンサーが切り開くエピゲノム・転写因子研究

Recent advances in research on transcription factor network in adipocytes

—Application of next generation sequencing on epigenome and transcription factor research



脇 裕典(写真) 門脇 孝

Hironori Waki and Takashi Kadowaki

東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科

◎脂肪細胞における転写因子研究は、分化のマスターレギュレーターである peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) がインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体の標的蛋白であることが見出されて以来、生活習慣病発症および治療の重要な鍵を握る領域として注目されてきた。本稿ではここ数年の研究の流れのなかでホットな話題について、①脂肪細胞と転写調節の最近の話題、②次世代シーケンサーによる転写因子ネットワークのゲノムワイド解析、をまとめ、最後に著者らの取組みとして、③脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域解析 (FAIRE-seq) とモチーフ解析による新しい分化調節転写因子の同定について紹介する。



脂肪細胞, PPAR γ , C/EBP, 次世代シーケンサー, エピゲノム, オープンクロマチン, FAIRE

脂肪細胞と転写調節の最近の話題

最近注目されるトピックのひとつは、Spiegelman らのグループから報告された脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ のセリン 273 のリン酸化が、PPAR γ リガンドのインスリン抵抗性改善作用に果たす役割である¹⁾。彼らは、肥満において Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) が活性化されることにより PPAR γ のセリン 273 がリン酸化されること、この部位のセリンのリン酸化は PPAR γ の脂肪細胞分化に対する作用は変えないものの、PPAR γ の標的遺伝子のなかでもアディポネクチンなどのインスリン感受性亢進にかかわる特定のサブセットの標的遺伝子の転写制御に重要であること、さらにインスリン抵抗性改善作用を示す PPAR γ リガンドはセリン 273 を脱リン酸化することを見出した。インスリン抵抗性改善作用のある PPAR γ リガンドをスクリーニングする際に、従来のように PPAR γ 転写活性を上げるアゴニストではなく、セリン 273 の脱リン酸化作用を指標にすべきとする提言を行っており、今後の

進展が注目される。その他 PPAR γ については、時計遺伝子である PER2 が PPAR γ を介して脂質代謝を制御するとの報告²⁾、加齢やチアゾリジン投与では骨形成から脂肪形成へのスイッチが起こるが、basic leucine zipper 型転写因子である Maf による骨形成のマスターレギュレーター Runx2 と PPAR γ とのバランスの制御が重要であるとの報

サイド
メモ

次世代シーケンサー

過去 10 年間のゲノムサイエンスの分野において象徴的な技術革新の一つ。とくに 2005~2007 年に開発され、実用化されたロッシュ・ダイアグノスティクス の 454, Illumina 社の Genome Analyzer, ABI 社の SOLiD などの次世代シーケンサーはその中核である。シーケンシングのコストは 1999 年と 2009 年の間におよそ 14,000 分の 1 に減少したとされる。ChIP, FAIRE, ゲノム DNA, エクソーム, mRNA, small RNA のシーケンスなど幅広いアプリケーションが可能である。

告³⁾, また phospholipase D2 (PLD2) による代謝産物である cyclic phosphatidic acid (1-acyl-2,3-cyclic-glycerophosphate : CPA) が PPAR γ の内因性のアンタゴニストとして存在するとする報告がなされた⁴⁾. miR-130 による PPAR γ の発現抑制と脂肪細胞分化の制御効果も興味深い⁵⁾.

脂肪細胞の機能を制御する新たな転写因子・コファクターとしては, コファクター CRTC3 による β アドレナリン受容体活性化による脂肪分解の制御⁶⁾, 転写因子 IRF4 の摂食再摂食時の脂肪細胞での脂肪分解における役割⁷⁾, 皮下脂肪に高発現する転写因子 Tbx15 の脂肪細胞分化, 中性脂肪蓄積, ミトコンドリア機能における役割⁸⁾ などが報告された. その他の因子としては, オートファジーの脂肪細胞分化における役割^{9,10)}, マクロファージから分泌される AIM の脂肪酸合成の抑制作用¹¹⁾, 脂肪細胞から分泌される抗炎症性アディポカイン Sfrp5¹²⁾, 肥満の糖尿病発症における脂肪細胞の機械的伸展による Rho キナーゼの役割¹³⁾ などが重要である.

褐色脂肪組織は齧歯類やヒト新生児で発達しており, 熱産生やエネルギー消費が活発であるが, 成人では消失すると以前は考えられていた. 2009年に成人でも機能的な褐色脂肪組織が鎖骨下や傍脊椎領域に存在するとの報告が複数の研究室から相次ぎ, 注目された¹⁴⁻¹⁶⁾. 遺伝子工学的手法により, これまでの通説と異なり褐色脂肪細胞が白色脂肪細胞とは系統が異なり, 骨格筋分化のレギュレーターである Myf5 を発現する前駆幹細胞から分化することが明らかにされた¹⁷⁾. また, 褐色脂肪組織への分化のレギュレーターとして PRDM16 が見出された. 筋細胞に PRDM16 を過剰発現すると褐色脂肪細胞様の表現型に, 褐色脂肪細胞で PRDM16 をノックダウンすると筋細胞様の表現型になる. Tseng らは骨格筋や白色脂肪組織内に, BMP7 によって褐色脂肪細胞に分化されうる前駆細胞 (Sca-1⁺/CD45⁻/Mac1⁻) が存在することを報告しており¹⁸⁾, 今後, 褐色脂肪細胞が治療的な側面からも注目されると考えられる.

次世代シーケンサーによる 転写因子ネットワークのゲノムワイド解析

近年のゲノムサイエンス分野におけるもっとも大きなブレイクスルーは, 次世代シーケンサーの実用化である. とくにエピゲノム・転写因子研究においては, クロマチン免疫沈降 (ChIP) と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq により, ヒストン修飾や転写因子結合領域のゲノムワイド解析が可能となり, 既存の研究手法とはまったく異なる新しい視点から, 転写因子やエピジェネティクスによる遺伝子の転写調節機構が明らかにされつつある. 多くの転写因子が近位プロモーター領域のみならず, 遠位や 3' 側下流, イントロンなど予想以上に幅広い領域に結合していることが明らかにされた¹⁹⁾. また, ゲノム上の転写因子結合領域の DNA 配列をモチーフ解析することにより, 異なる転写因子どうしが同じ領域に共存 (co-localize) して協調しながら作用することが明らかにされた. とくに細胞間で同じ転写因子が異なる作用を示すメカニズムとして, 細胞間で異なる co-localize する転写因子が存在することが提唱されている¹⁹⁾. さらに, エストロゲンに刺激されたエストロゲン受容体 (ER) がゲノム上にリクルートされる際には, 別の転写因子 FOXA1 がゲノム上に先に結合してクロマチン構造を開いておくことが必要であることが明らかにされ, ER にとっての FOXA1 のように, “パイオニア因子 (pioneer factor)” とよばれる転写因子の概念が提唱されている²⁰⁾.

一方, ヒストン修飾においても ChIP-seq によりゲノムワイドに高解像度なヒストン地図がつけられ, プロモーター領域ではヒストン 3 リジン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) やアセチル化が生じること, エンハンサー領域では H3K4 のモノメチル化 (H3K4me1) 陽性かつ H3K4me3 陰性というパターンを示すことや²¹⁾, とくに発生分化に重要な役割を果たす転写因子のプロモーター領域に転写促進型の H3K4me3 と転写抑制型の H3K27me3 が同時に起こる bivalent 修飾とよばれる特徴的なヒストン修飾が認められることなど, ヒストン修飾のゲノムワイド解析であらたに明らかにされている²²⁾.

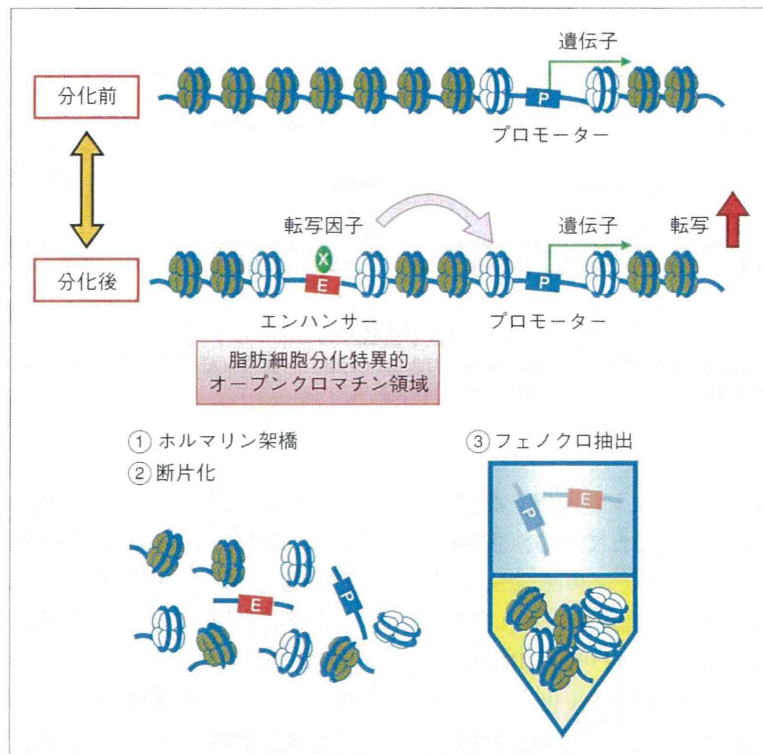


図 1 FAIREによるオープンクロマチン領域の検出

上：エンハンサーやプロモーターなどの制御領域はオープンクロマチン構造をとる。分化前後で変化するオープンクロマチン領域には、分化を制御するエンハンサー領域が含まれる。
下：FAIRE の原理。

脂肪細胞の研究分野においても複数の研究グループから PPAR γ , RXR, C/EBP α , C/EBP β , glucocorticoid receptor (GR), β -catenin や種々のヒストン修飾のゲノムワイド解析が報告されている²³⁻²⁹。Lefterova と Nielsen らは、脂肪細胞分化のキーレギュレーターである PPAR γ /RXR ヘテロダイマーと C/EBP が脂肪細胞において co-localize し、協調的に作用することを示した^{27,28}。Lefterova らは、PPAR γ がマクロファージにおいては脂肪細胞と異なり転写因子 PU.1 と co-localize することにより、マクロファージ特異的な PPAR γ の作用を発揮することを示した²⁴。Mikkelsen らは、ヒト脂肪細胞とマウス脂肪細胞における網羅的なヒストン修飾と PPAR γ の結合領域を同定、ヒトとマウスの比較解析を行い、遺伝子の発現パターンは非常によく保存されているが、PPAR γ の結合領域は予想以上に保存されていないことを示した²³。Wakabayashi らは、PPAR γ がヒ

ストン修飾酵素 PR-Set7/Setd8 とフィードフォワードループを形成し、脂肪細胞分化に役割を果たすことを示した²⁵。Okamura らは脂肪細胞の分化抑制因子である Wnt 経路の β カテニンが、転写因子 COUP-TF II の発現を誘導し、PPAR γ 遺伝子のイントロンに結合し脱アセチル化を介して PPAR γ の転写を抑制する機序を明らかにした (Wakabayashi, Okamura の実験については本特集の酒井の項を参照のこと)²⁶。Wang らは、ヒストン H3K27me3 欠損が Wnt 経路を介して脂肪細胞分化を抑制することを報告している³⁰。

脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域解析 (FAIRE-seq) とモチーフ解析による新しい分化調節転写因子の同定

ヒトゲノム計画によってゲノム上の DNA 配列が決定され、2 万~2 万 5 千の遺伝子が存在することが明らかにされた³¹。ポストゲノム時代の

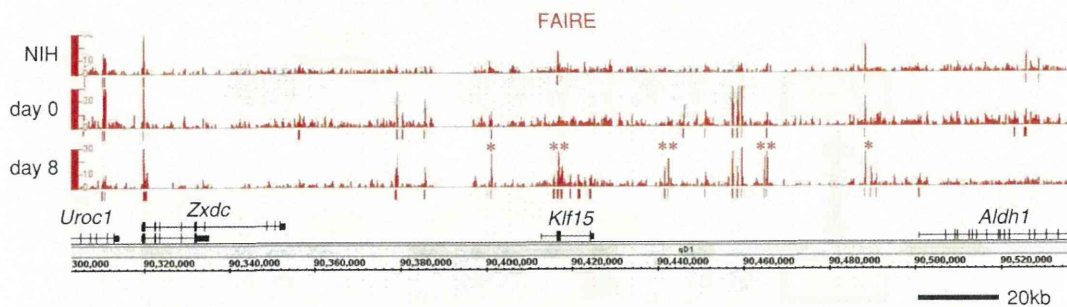


図 2 *Klf15* 遺伝子領域の FAIRE シグナル

上段から NIH-3T3, 3T3-L1 day 0, 3T3-L1 day 8. 下線は有意なピーク ($FDR < 10^{-4}$).

*: 脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域.

きな課題のひとつは、ゲノム上の遺伝子を制御する“制御領域”を同定することである。古典的には DNase I に対するクロマチンの感受性を用いた DNase I hypersensitivity 法が用いられるが、これとシーケンサーを組み合わせた DNase-seq や³²⁾、H3K4 のメチル化、アセチル化、p300 の結合などを指標とした ChIP-seq を用いた組織特異的なエンハンサー領域の同定が報告されている^{21,33)}。Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) は Lieb らにより開発された方法で、DNase I hypersensitivity 法と同様に、ヒストン(ヌクレオソーム)フリーのゲノム領域 (=オープンクロマチン領域)を検出する³⁴⁾。原理は、ゲノムのホルマリン固定、断片化に続いてフェノールクロロホルム抽出を行うことによってオープンクロマチン領域にある蛋白(ヒストン)に架橋されなかったゲノム DNA 断片が濃縮される(図 1)。ひとつの有用なアプリケーションとして、FAIRE-seq により同定された臍島特異的オープンクロマチン領域をガイドとして、全ゲノム相関解析 (GWAS) で認められた疾患感受性領域のなかの causal SNP が同定された成功例があげられる³⁵⁾。

著者らは FAIRE-seq を用いて、脂肪細胞 3T3-L1 のゲノム上のオープンクロマチン領域を解析した(図 2)。37,781 カ所のオープンクロマチン領域のうち 28% はプロモーター領域、残りは非プロモーター領域に存在した。プロモーター領域の FAIRE は H3K4me3 や H3K27ac (アセチル化) のプロモーター型ヒストン修飾で、非プロモーター領域の FAIRE は H3K4me1⁺, H3K27ac⁺, H3K4me3⁻

のエンハンサー型ヒストン修飾を示した。興味深いことに脂肪細胞分化前後でプロモーター FAIRE は変化しないのに対し、非プロモーター FAIRE はダイナミックに変化していた。脂肪細胞分化に伴ってオープンクロマチンを呈する領域は脂肪細胞分化で制御される遺伝子、また脂肪分化や糖脂質代謝にかかわる遺伝子の近傍に濃縮しており、その数が多ければ多いほど遺伝子の転写が制御される傾向にあった。これらのことは、脂肪細胞特異的な非プロモーター FAIRE 領域は機能的なエンハンサーを含んでいることを示す。それらの 45.3%、11.7% は ChIP-seq で同定された PPAR γ および C/EBP α 結合領域とオーバーラップしており、これらが主要な脂肪細胞分化制御因子であることに合致した。

FAIRE は特定の転写因子に対する ChIP と異なり、制御因子をバイアスなしに検出する。オープンクロマチン領域の FAIRE-seq による検出とバイオインフォマティクスによるモチーフ解析を組み合わせることは、あらたな制御因子の同定に有用であると考えられる。3T3-L1 の分化の前後で変化する、分化特異的なオープンクロマチン領域に濃縮されるモチーフ解析を施行したところ、既知のマスターレギュレーターである PPAR γ と C/EBP の結合モチーフに加えて、脂肪細胞での機能が知られていない転写因子の結合モチーフが含まれていた(図 3)。これらのモチーフのひとつに結合する NFI 転写因子について、その機能を検討した。NFI は NFIA, NFIB, NFIC, NFIX の 4 種類の遺伝子からなるファミリーであるが、なかでも

Motif	Name	Corrected <i>p</i> -value	Enrichment Ratio (Ad/pAd)	Logo
M00193	NF-1	7.9E-27	1.60	
M01196	CTF1	5.1E-22	1.55	
M01100	LRF	2.6E-20	1.65	
M00528	PPAR	2.7E-12	2.14	
M01728	EAR2	1.2E-09	1.47	
M01031	HNF4 (PPAR)	3.8E-08	2.06	
M01772	C/EBP	1.7E-07	2.69	
M00109	C/EBP β	3.1E-07	1.51	

図 3 脂肪細胞特異的オープンクロマチン領域に濃縮される転写因子の結合モチーフ解析
PPAR や C/EBP のほかに NF1(CTF1)のモチーフが濃縮している。
(Transfac データベース Release 2010.4 による)

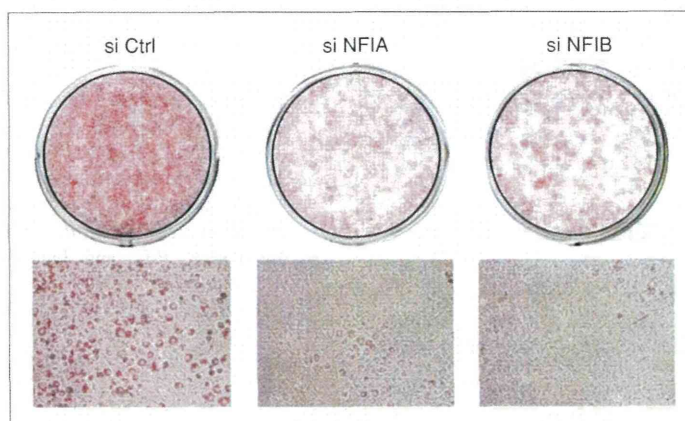


図 4 3T3-L1脂肪細胞分化におけるNFIA, NFIBのノックダウンの効果

NFIA, NFIB は分化でその発現が上昇し、組織パネルにおいても脂肪組織に発現が多くみられた。3T3-L1 細胞で NFIA と NFIB に対する siRNA によるノックダウンを行うと、PPAR γ , C/EBP α , その下流の aP2 などの遺伝子の分化依存な誘導が抑制され、Oil red O 染色で中性脂肪蓄積の抑制がみられ、NFIA, NFIB が脂肪細胞分化に生理的な役割を果たしていることが示唆されたことから (図 4), FAIRE-seq によるバイアスのない脂肪細胞特異的オープンクロマチン領域の検出と、バイオインフォマティクスによるモチーフ解析の組み合わせが、新しい脂肪細胞分化の制御因子の同定に有用であると考えられた。

おわりに

脂肪細胞における転写因子の研究の流れについて、最近の話題を概説した。とくに次世代シーケンサーによる転写因子ネットワークのゲノムワイド解析からは、従来の手法では明らかにされない転写因子ネットワークのメカニズムが見出されつつある。著者らが施行した脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域解析 (FAIRE-seq) とモチーフ解析の組合せで、新しい分化調節転写因子 NFIA, NFIB が同定された。この FAIRE-seq とモチーフ解析の組合せはあらゆる生命現象に应用可能であり、さまざまな分野における今後の研究を進展させる方法として期待される。

■謝辞：本研究は、モチーフ解析・実験において中村正裕先生、藤田隆教先生、堤修一先生、若林賢一先生、于静先生、御指導いただいた油谷浩幸先生、山内敏正先生、酒井寿郎先生、児玉龍彦先生ほか多数の先生方の協力で実現しました。この場をかりて感謝申し上げます。

文献

- Choi, J. H. et al. : *Nature*, **466** : 451-456, 2010.
- Grimaldi, B. et al. : *Cell Metab.*, **12** : 509-520, 2010.
- Nishikawa, K. et al. : *J. Clin. Invest.*, **120** : 3455-3465, 2010.
- Tsukahara, T. et al. : *Mol. Cell*, **39** : 421-432, 2010.
- Lee, E. K. et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **31** : 626-638, 2010.
- Song, Y. et al. : *Nature*, **468** : 933-939, 2010.
- Eguchi, J. et al. : *Cell Metab.*, **13** : 249-259, 2011.
- Gesta, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** : 2771-2776, 2011.
- Bengoechea-Alonso, M. T. and Ericsson, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** : 11817-11822, 2010.
- Singh, R. et al. : *J. Clin. Invest.*, **119** : 3329-3339, 2009.
- Kurokawa, J. et al. : *Cell Metab.*, **11** : 479-492, 2010.
- Ouchi, N. et al. : *Science*, **329** : 454-457, 2010.
- Hara, Y. et al. : *Sci. Signal.*, **4** : ra3, 2011.
- van Marken Lichtenbelt, W. D. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **360** : 1500-1508, 2009.
- Cypess, A. M. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **360** : 1509-1517, 2009.
- Virtanen, K. A. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **360** : 1518-1525, 2009.
- Seale, P. et al. : *Nature*, **454** : 961-967, 2008.
- Schulz, T. J. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108** : 143-148, 2011.
- Biddie, S. C. et al. : *Trends Endocrinol. Metab.*, **21** : 3-9, 2010.
- Lupien, M. and Brown, M. : *Endocr. Relat. Cancer*, **16** : 381-389, 2009.
- Heintzman, N. D. et al. : *Nat. Genet.*, **39** : 311-318, 2007.
- Mendenhall, E. M. and Bernstein, B. E. : *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **18** : 109-115, 2008.
- Mikkelsen, T. S. et al. : *Cell*, **143** : 156-169, 2010.
- Lefterova, M. I. et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **30** : 2078-2089, 2010.
- Wakabayashi, K. et al. : *Mol. Cell. Biol.*, **29** : 3544-3555, 2009.
- Okamura, M. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** : 5819-5824, 2009.
- Nielsen, R. et al. : *Genes Dev.*, **22** : 2953-2967, 2008.
- Lefterova, M. I. et al. : *Genes Dev.*, **22** : 2941-2952, 2008.
- Nishino, N. et al. : *J. Clin. Invest.*, **118** : 2808-2821, 2008.
- Wang, L. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** : 7317-7322, 2010.
- Lander, E. S. et al. : *Nature*, **409** : 860-921, 2001.
- Song, L. and Crawford, G. E. : *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2010** : pdb prot5384, 2010.
- Wang, Z. et al. : *Nat. Genet.*, **40** : 897-903, 2008.
- Giresi, P. G. and Lieb, J. D. : *Methods*, **48** : 233-239, 2009.
- Gaulton, K. J. et al. : *Nat. Genet.*, **42** : 255-259, 2010.

* * *

脂肪細胞と骨代謝

脇 裕典*¹⁾ 山内 敏正*²⁾ 門脇 孝*³⁾

脂肪細胞と骨代謝に重要な役割を果たす骨芽細胞と軟骨細胞は同じ間葉系に属し、幹細胞を共有していると考えられる。脂肪細胞と骨代謝の関連について脂肪細胞と骨代謝を共通に調節する転写因子や細胞形態調節などの多くの因子が見出されている。肥満糖尿病の治療薬であるチアゾリジン誘導体は中年以降の女性で骨折のリスクを増加させることも知られてきた。脂肪細胞と骨代謝の相互関連についての最近の研究の進展を概説する。

Lifestyle-related diseases and bone metabolism.

Adipocytes and bone metabolism.

Department of Diabetes and Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo.

Hironori Waki, Toshimasa Yamauchi, Takashi Kadowaki

Adipocytes, osteoblasts and chondrocytes derive from common mesenchymal stem cells. A number of factors were reported to regulate differentiation of multiple cell types among adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. Thiazolidinediones are prescribed to treat diabetes in obese subjects, but recent clinical data suggested that it increases a risk of bone fracture especially in postmenopausal women. Here, we will review recent advances in the researches of mutual connection between adipocytes and bone metabolism.

はじめに

肥満と骨粗鬆症は増加の一途をたどり、社会的な問題となっている代表的な病態である。近年、脂肪細胞と骨代謝との密接な関係は、分子生物学的レベルあるいは臨床レベルで明らかにされつつある。肥満の代表的な動物モデルである *ob/ob* マ

ウスの解析により同定された脂肪細胞由来のレプチンは、脳の視床下部を介して強ちに食欲を抑制し、全身のエネルギー代謝を亢進させることにより、脂肪細胞の肥大化を抑制するネガティブフィードバックを形成するが、骨代謝においては中枢神経を介して抑制的に作用することが示され

*東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科 ¹⁾ 特任助教 (わき・ひろのり) ²⁾ 講師 (やまうち・としまさ)
³⁾ 教授 (かどわき・たかし)

ている（本号「中枢神経と骨代謝」の項を参照）。一方、骨粗鬆症においては、加齢や性ホルモン作用の低下に伴って骨密度が低下し、骨髄中の脂肪細胞が増加する。

核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は、脂肪細胞の分化のマスターレギュレーターであるとともに、臨床上において肥満を伴う糖尿病患者のインスリン抵抗性を改善するチアゾリジン誘導体など、薬剤の標的として重要な位置を占めるが、近年の臨床試験の結果から特に中年以降の女性において骨折のリスクを増加させることが明らかになり、PPAR γ の骨代謝に与える作用メカニズムの解明とそれによる副作用の回避が今後の重要な課題となっている。

脂肪細胞は骨代謝に重要な役割を果たす骨芽細胞、軟骨細胞と同じ間葉系に属しており、間葉系幹細胞に由来すると考えられている。生体内あるいは発生過程における脂肪細胞の前駆細胞や幹細胞に特異的な細胞マーカーはまだ同定されておらず、骨髄中を含むさまざまな部位の脂肪細胞が全て、骨芽細胞、軟骨細胞と幹細胞を共有しているかは明らかではないが、少なくとも胎児線維芽細胞やそれに由来する細胞株（例：C3H10T1/2細胞）、骨髄間質細胞やそれ由来の細胞株（例：ST2細胞）、脂肪組織由来の間葉系幹細胞など、多くの幹細胞が特異的な刺激により脂肪細胞と骨芽細胞、軟骨細胞に分化しうることから、同系統の細胞種としてお互いに密接に関連している。

レプチンを中心とした脂肪細胞からの分泌因子による骨代謝の調節については「中枢神経と骨代謝」の項に譲り、本稿では、脂肪細胞と骨代謝の関連について脂肪細胞と骨代謝を共通に調節するメカニズムを軸にして最近の研究の進展を概説する。

PPAR γ と骨代謝

1. PPAR γ アゴニストによる骨折のリスク

核内受容体である PPAR γ は、脂肪細胞分化の

マスターレギュレーターであり、脂肪細胞分化に必須である¹⁾⁻³⁾。肥満マウスモデルの糖尿病を改善する薬剤としてスクリーニングされたチアゾリジン誘導体が⁴⁾、PPAR γ の強力なアゴニストであることが発見されて以来、全身の糖・脂質代謝における脂肪細胞の役割が注目されるようになった⁴⁾。PPAR γ アゴニストは、肥満糖尿病のインスリン抵抗性改善薬として第一選択薬の一つであり、臨床上も広く処方されている。近年の臨床試験の成績から、PPAR γ アゴニストによる肥満糖尿病の治療において、特に中年以降の女性に骨折のリスクが増加することが報告されている。10のランダム化比較試験のメタアナリシスにおいて、PPAR γ アゴニストは、オッズ比 1.45 (95% 信頼区間 (CI) : 1.18-1.70 ; $p < 0.001$) で、骨折のリスクを増加させるとされる⁵⁾。PPAR γ と骨代謝の関係においていくつかの分子メカニズムが明らかにされている。

(1) PPAR γ 欠損マウスによる知見

Akune らは、PPAR γ 欠損の骨代謝における役割を検討している⁶⁾。PPAR γ ホモ欠損 ES 細胞は脂肪細胞への分化に障害があるが⁶⁾、骨芽細胞への分化が促進しており、一方、PPAR γ ヘテロ欠損マウスでは骨形成の促進に伴い骨量が増加していることが示された。Rzonca らは、マウスにおいて PPAR γ アゴニスト rosiglitazone 投与により、骨形成や骨量が増加することを示した⁷⁾。ヒト女性における検討でも、rosiglitazone 投与が骨形成障害を介した骨量の減少をおこすことが報告されている⁸⁾。マウスにおいては、骨量の減少とともに骨髄中の脂肪細胞の増加がみられ、老化とともにみられる骨量減少と脂肪髄の増加と類似しているが、ヒトにおいて骨髄中の脂肪が実際に増加しているかどうかは、今のところ明らかではない。

(2) 破骨細胞における PPAR γ の作用

一方、Wan らは Tie2-Cre を用いて破骨細胞において PPAR γ を欠損させた⁹⁾。破骨細胞は単球

一マクロファージ系に属する血球系統の細胞であるが、PPAR γ は脂肪細胞以外にマクロファージにも多く発現し、その生理作用に重要な役割を果たすことが以前から示されている。これらのマウスは骨髓腔の減少と脾臓における髄外造血をみとめた。破骨細胞においてrosiglitazoneは、PPAR γ 依存的に骨芽細胞の分化を抑制するだけでなく、破骨細胞の分化を促進した。PPAR γ 欠損による骨量の増加は、PPAR γ 欠損における破骨細胞の分化の障害によって起こっておくると考えられた。同グループは更に、そのメカニズムとしてPPAR γ が他の核内受容体ファミリーのERR α の発現と、コアクチベーターPGC1 β の発現を誘導することにより、ミトコンドリアを増加させ、破骨細胞の機能を増強することを示した¹⁰⁾。

(3) PPAR γ アゴニストによる骨折と骨粗鬆症の違い

前項の欠損マウスの結果から、PPAR γ アゴニストが骨芽細胞分化による骨形成の抑制を、また破骨細胞分化の促進により骨吸収の増加を起こし、結果として臨床的に認められる骨折の増加を来している可能性が示唆される。興味深いことに、PPAR γ アゴニストにより増加する骨折は、上肢では上腕骨や手、下肢では足に多いとされ、加齢に伴う骨粗鬆症では大腿骨頭や脊椎が多いことと対照的であり、同じ骨量減少でもPPAR γ アゴニストと骨粗鬆症では発症機序が異なると考えられる。

今後、PPAR γ アゴニストのインスリン抵抗性改善作用や抗炎症作用など好ましい薬理作用を残しながら骨代謝には影響を与えないような細胞、標的的特異的なPPAR γ モジュレーターなどの開発が期待される。

2. Wnt経路とPPAR γ

脂肪細胞は骨代謝に重要な役割を果たす骨芽細胞、軟骨細胞と同じ間葉系に属しており、間葉系

幹細胞に由来すると考えられている。同じ幹細胞からさまざまな種類の細胞に分化する際には基本的に相互排他的なメカニズムが作用する例が多い。上記のPPAR γ の他にもWnt経路は、骨形成に重要な役割を果たすと同時に、脂肪細胞分化を強力に抑制することが知られている。Takadaらは、Wnt5aが β カテニン非依存的(non-canonical)経路を介して骨芽細胞分化を促進するとともにPPAR γ の転写制御抑制を介して脂肪細胞分化を抑制することを示した¹¹⁾。Wnt-5a^{+/+}マウスにおいて骨量の減少とともに骨髓中の脂肪細胞が増加すること、また分子メカニズムとしてWnt5aがCaMKII-TAK1/TAB経路を介してNLKによるSETDB1のリン酸化によるSETDB1-NLK-CHD7がPPAR γ とコンプレックスを形成することにより標的遺伝子が抑制されることを解明した。

脂肪細胞分化と骨芽細胞・軟骨細胞分化の共通制御因子

ここでは間葉系幹細胞の脂肪細胞、骨芽細胞や軟骨細胞への分化を協調する新しい因子についての知見をまとめる。

<Maf>

Nishikawaらは、加齢に伴う骨粗鬆症の原因を検討するために、マウス骨芽細胞の分化に伴い上昇し、骨髓間質細胞において加齢に伴い減少する転写因子をスクリーニングし、そのなかで転写因子Mafの機能解析を行った。Maf欠損マウスは出生後死亡するが、著明な骨形成の低下がみられた。骨髓腔内のPPAR γ の発現が有意に亢進していた¹²⁾。MafはRunx2に結合したうえで活性化し、また培養系においても新生児頭蓋冠由来の骨芽細胞分化は減弱していた。一方MafはC/EBP δ とCBPの相互作用を抑制することで、脂肪細胞分化を抑制した。老化が骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する機構の破綻においてMafの減少が重要な役割を果たすことが示された。

〈CB1〉

Idrisらはカンナビノイド受容体CB1の欠損マウスが、若齢では骨吸収の減少から最大骨量の増加を示すが、老齢になると骨形成の減少と脂肪細胞の蓄積により骨粗鬆症を呈し、加齢の時期により異なる表現型を示すことを報告した¹⁵⁾。CB1欠損骨髄間質細胞では骨芽細胞分化は抑制されているのに対し、リン酸化CREBとPPAR γ の発現上昇がみられた。

〈Rb〉

CaloらはPrx1-Creを用いて間葉系細胞に特異的にRBあるいはp53を欠損させ、間葉系の腫瘍の発生を検討した¹⁴⁾。p53のみの欠損では発生する腫瘍の92%が骨肉腫であるのに対し、p53に加えてRBを欠損させた時には大部分(91%)が褐色脂肪腫(hibernoma)であった。またOsx-Creにより骨系統の幹細胞のみで同様の実験を行っても、p53のみの欠損では100%骨肉腫であったのに対して、RBの欠損が加わると46%が褐色脂肪腫であった。p53を欠損した細胞におけるRBのノックダウンの実験において分化刺激因子の添加前からPPAR γ など脂肪細胞のマーカーは著明に増加、Coll1aやAlpなど骨分化のマーカーは減少していた。次にMeox2-Creを用いてe6.5からRBを単独で欠損させe15.5, e18.5で検討すると、RB欠損マウスでは当該骨と長管骨、頭蓋骨とも石灰化骨の減少を認めるのに対して、褐色脂肪組織の増大を認めた。RBは、元々脂肪細胞においては褐色脂肪細胞と白色脂肪細胞の分化スイッチを規定する因子として知られていたが、Caloの報告により骨芽細胞分化と脂肪細胞分化のスイッチとしても作用していることが示された。

〈Pref-1〉

Pref-1は、前駆脂肪細胞に高発現し、脂肪細胞分化に伴い減少する脂肪細胞分化抑制因子として知られているが、WangらはPref-1の脂肪細胞分

化抑制作用のメカニズムとして、Pref-1が軟骨細胞分化の重要な制御因子Sox9を標的とすること、Sox9発現の抑制が脂肪細胞分化に重要であることを示した¹⁵⁾。Sox9は脂肪細胞の分化初期に重要な転写因子C/EBP β とC/EBP δ のプロモーター領域に直接結合し、その機能を抑制することを示した。更に、Pref-1が間葉系細胞の軟骨細胞への誘導を促進するが、軟骨細胞の成熟と骨芽細胞の分化は抑制することを示した。

〈TAZ〉

Hongらは、14-3-3結合蛋白であるTAXがRunx2依存性の転写制御をco-activate、一方、PPAR γ 依存性の転写制御をco-repressすることで、間葉系幹細胞の骨分化と脂肪細胞分化の振り分けを行っていることを示した¹⁶⁾。

〈Bone morphologic protein (BNP)〉

脂肪細胞分化における骨形成タンパク質の役割として、TangらはBNP-4が多能性幹細胞の細胞株C3H10T1/2細胞において非常に強い脂肪細胞分化誘導効果があることを報告していた¹⁷⁾。TsengらはBMP2,4,6,7が前駆褐色脂肪細胞において強い脂肪蓄積作用を示すが、中でもBMP7は熱産生に重要な役割を果たすuncoupling protein 1(UCP1)の発現や、ミトコンドリアの発生に関わる遺伝子の発現を上昇させるなど、褐色脂肪細胞へと分化させることを示した¹⁸⁾。

細胞の形態、微小環境による間葉系幹細胞分化の制御

骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞や骨髄線維芽細胞は、骨髄間葉系幹細胞から発生すると考えられるが、系網細胞(CAR細胞)などと共に血球系細胞の幹細胞である造血幹細胞の骨髄ニッチを形成している。脂肪細胞分化、骨芽細胞分化について、細胞の形態そのものが間葉系幹細胞の分化の制御スイッチになっているとする報告がある。

1. 細胞の形態と骨芽細胞分化・脂肪細胞分化

McBeath らは、培養皿のドット上の表面処理により一つ細胞が接着しうる面積をコントロールしてヒト間葉系幹細胞を培養すると、狭い接着面で細胞を球形の状態に培養する場合にはより脂肪細胞に、広い接着面で細胞を平板上の状態で培養する場合にはより骨芽細胞へと分化することから細胞の形態が分化のスイッチになっていることを報告した¹⁹⁾。その分子メカニズムとして細胞の形態が RhoA/ROCK 経路と細胞骨格の張力を介して分化方向を決定づけていることを、細胞骨格を変化させる薬剤、ROCK の阻害剤、RhoA の変異体を用いて示した。Kilian らの検討でも、同じ面積であっても細長い四角や星型などでは、アクトミオシンの収縮性を増大し骨分化が起こり易く、逆にでは脂肪細胞分化が起こり易いことを示した²⁰⁾。

Noguchi らは、ROCK-II 欠損マウス胎児線維芽細胞の脂肪細胞分化が増強していること、Akt のリン酸化の増強がそのメカニズムの一つであることを示した²¹⁾。Hara らは、脂肪細胞においてドミナントネガティブ型の RhoA を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいては、脂肪細胞における Rho kinase の活性低下、高脂肪食下における脂肪細胞肥大化の抑制、体重増加の抑制、マクロファージ蓄積の抑制をすることから、脂肪細胞における脂肪の蓄積が、機械的な進展刺激を介して Rho kinase 経路の活性化を起すことで脂肪細胞における炎症経路の活性化を引き起こしていることを示した。これらのモデルでの骨代謝の変化も興味深い²²⁾。

2. 骨髄中の脂肪細胞の造血と骨代謝における役割

Naveiras らは、骨髄中に脂肪細胞が存在する尾骨の骨髄では、存在しない胸骨骨髄と比較して、造血幹細胞と前駆細胞の数が減少していること、また、脂肪細胞が殆ど存在しない萎縮性糖尿

病のモデルマウスである A-ZIP/F1 'fatless' マウスにおいて、放射線照射後の野生マウスからの骨髄移植後の生着と血球の回復が加速しており、生着した骨髄の二次移植による競合アッセイでも野生型マウスの骨に生着した骨髄より早期に生着することを示した²³⁾。更に野生型と異なり、A-ZIP/F1 マウスでは放射線照射後に顕著な骨梁の形成が起こっていることを micro-computerized tomography (mCT) で、また ¹⁸F の取り込みを micro-positron emission tomography (mPET) で確認した。

これらのことから、骨髄において造血系、骨分化、脂肪細胞分化がお互いに作用し密接に関連していることが示唆される。実際の骨髄中で分泌因子や接着因子、形態の制御、微小環境の形成など、どのようなシグナルがこれらの作用を介在するか、今後の研究が期待される。

おわりに

脂肪細胞と骨代謝の関連について脂肪細胞と骨代謝を共通に調節するメカニズムの最近の研究を軸に概説した。今後この分野の研究が更に進展し、臨床にも応用されることが期待される。

文 献

- 1) Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al: PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4 (4): 611-617, 1999.
- 2) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al: PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 4 (4): 597-609, 1999.
- 3) Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al: PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4 (4): 585-595, 1999.
- 4) Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, et al: An antidiabetic thiazolidinedione is a high

- affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* **270** (22) : 12953-12956,1995.
- 5) Loke YK, Singh S, Furberg CD : Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. *CMAJ* **180** (1) : 32-39, 2009.
 - 6) Akune T, Ohba S, Kamekura S, et al : PPAR-gamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* **113** (6) : 846-855,2004.
 - 7) Rzonca SO, Suva LJ, Gaddy D, et al : Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. *Endocrinology* **145** (1) : 401-406, 2004.
 - 8) Grey A, Bolland M, Gamble G, et al: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone decreases bone formation and bone mineral density in healthy postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* **92** (4) : 1305-1310,2007.
 - 9) Wan Y, Chong LW, Evans RM : PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med* **13** (12) : 1496-1503,2007.
 - 10) Wei W, Wang X, Yang M, et al : PGC1beta mediates PPARgamma activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss. *Cell Metab* **11** (6) : 503-516,2010.
 - 11) Takada I, Mihara M, Suzawa M, et al : A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* **9** (11) : 1273-1285,2007.
 - 12) Nishikawa K, Nakashima T, Takeda S, et al : Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *J Clin Invest* **120** (10) : 3455-3465,2010.
 - 13) Idris AI, Sophocleous A, Landao-Bassonga E, et al : Cannabinoid receptor type 1 protects against age-related osteoporosis by regulating osteoblast and adipocyte differentiation in marrow stromal cells. *Cell Metab* **10** (2) : 139-147,2009.
 - 14) Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, et al : Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature* **466** (7310) : 1110-1114, 2010.
 - 15) Wang YH, Sul S: Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab* **9** (3) : 287-302, 2009.
 - 16) Hong JH, Hwang ES, McManus MT, et al : TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **309** (5737) : 1074-1078,2005.
 - 17) Tang QQ, Otto TC, Lane MD : Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (26) : 9607-9611, 2004.
 - 18) Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, et al : New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454** (7207) : 1000-1004, 2008.
 - 19) McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al : Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* **6** (4) : 483-495, 2004.
 - 20) Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT, et al: Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107** (11) : 4872-4877, 2010.
 - 21) Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, et al : Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. *J Biol Chem* **282** (40) : 29574-29583, 2007.
 - 22) Hara Y, Wakino S, Tanabe Y, et al : Rho and Rho-kinase activity in adipocytes contributes to a vicious cycle in obesity that may involve mechanical stretch. *Sci Signal* **4** (157) : ra3, 2011.
 - 23) Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, et al : Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* **460** (7252) : 259-263, 2009.

● 成因と病態：遺伝子・病態・標的分子の面から

脂肪細胞分化のエピゲノム制御

*1 東京大学大学院医学系研究科 脂肪細胞機能制御学 特任准教授

*2 同 糖尿病・代謝内科 **2 同 講師 ***2 同 教授

脇 裕 典*1*2 中 村 正 裕*2 山 内 敏 正**2
 門 脇 孝***2

要 旨

脂肪細胞分化はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ) や CCAAT/エンハンサー結合タンパク (C/EBP) など転写因子のカスケードによる制御を受けるが、近年開発された次世代シーケンサーを用いたヒストン修飾や転写因子結合領域のゲノムワイド解析により、既存の研究手法とは異なる新しい視点から、脂肪細胞の転写因子やエピゲノムによる転写調節機構が明らかにされつつある。脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域解析 (FAIRE-seq) と、モチーフ解析による新規分化調節転写因子の同定についても紹介する。

はじめに

近年のゲノムサイエンス分野における最も大きなブレイクスルーは、次世代シーケンサーの実用化である。特に、エピゲノム・転写因子研究においては、クロマチン免疫沈降 (ChIP) と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq により、ヒストン修飾や転写因子結合領域のゲノムワイド解析が可能となり、既存の研究手法とは全く異なる新しい視点から、転写因子やエピゲノムによる遺伝子の転写

キーワード：脂肪細胞分化, エピゲノム, オープンクロマチン, PPAR γ , 次世代シーケンサー

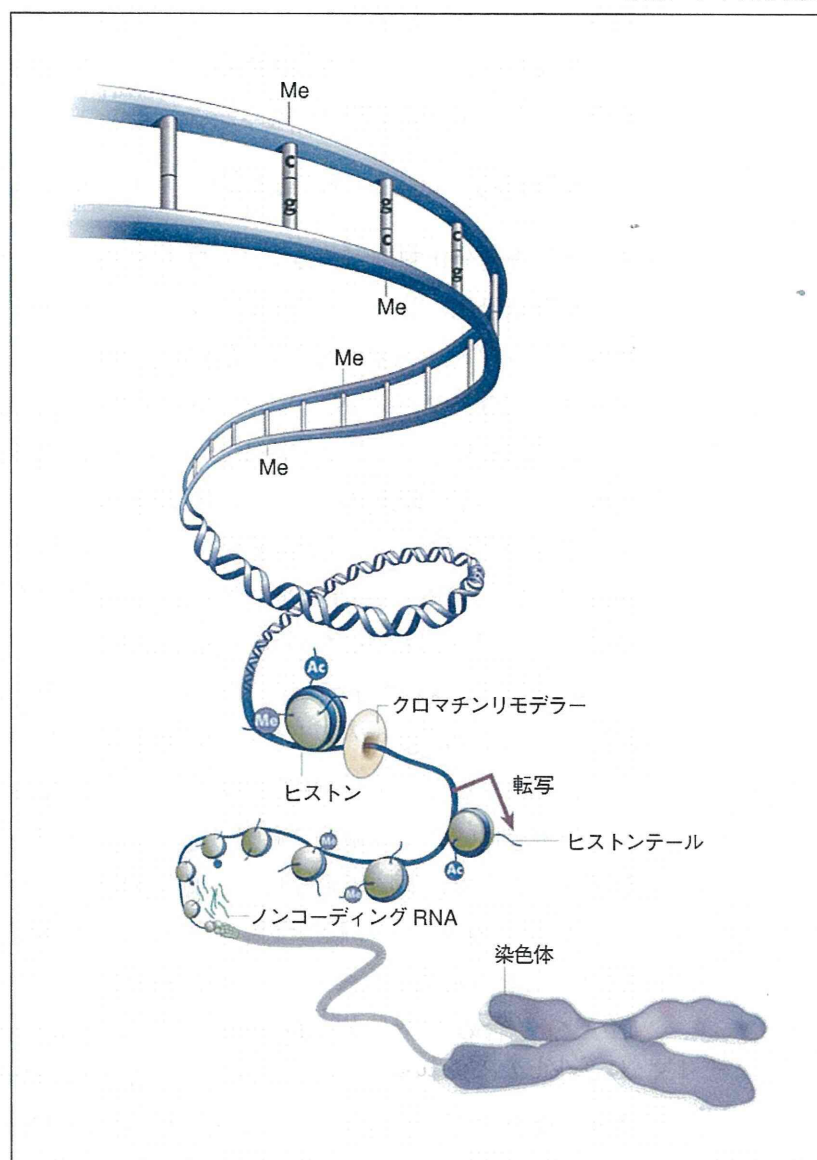
調節機構が明らかにされつつある。本稿では、脂肪細胞分化における転写因子やエピゲノム制御における、次世代シーケンサーを用いた新たな研究の流れについて概説する。

転写因子・エピゲノム研究への次世代シーケンサーの応用

ゲノム DNA はむき出しの状態では存在する単純な ATCG の塩基配列ではなく、ヒストン 8 量体に巻きついたヌクレオソームと呼ぶ構造を基本単位として、それらが複雑に折りたたまれ染色体を形成する(クロマチン構造, 図 1)。遺伝子の転写制御においては、クロマチン構造の制御が重要である。ヒトは約 200 種類の細胞から成る多細胞生物であるが、それぞれの細胞は基本的には同じセットの遺伝子をゲノム上に持つ。エピゲノムとは、DNA の配列変化を伴わずに細胞分裂でも複製されていく表現型であり、幹細胞からそれぞれの細胞の系統へ分化していく際に重要なメカニズムであると考えられる。現在では、エピゲノムとはクロマチン構造を規定する DNA の修飾(メチル化)、ヒストンの修飾(メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化など)を中心とした、ゲノムの後天的修飾により担われていると考えられている。エピゲノムは分化のみならず、がん、老化、受精、人工多能性幹(iPS)細胞化、記憶などあらゆる生命現象に根幹的な働きをしていると考えられる。

この 10 年間のゲノムサイエンスの分野における象徴的な技術革新は、DNA シーケンシング技術の目を見張る進歩である。シーケンシングのコストは、1999 年と 2009 年の間におよそ 14,000 分の 1 に減少したとされる¹⁾。2005 年から 2007 年に開発され、実用化されたロッシュ・ダイアグノスティクスの 454、Illumina 社の Genome Analyzer、ABI 社の SOLiD などの次世代シーケンサーはその中核である。1990 年に開始されたヒトゲノム計画では、1 人のゲノム配列を決定するのに 10 年以上を費やしたのに対し²⁾、次世代シーケンサーを用いて、DNA 2 重らせんの発見者である James Watson 個人のゲノム配列(パーソナルゲノム)が短期間に決定され報告された³⁾。今後コストダウンにより、\$1,000 で個人の全ゲノム配列が読める時代が到来すると予測されている⁴⁾。次世代シーケンサーには、

図1 エピゲノムとは？(クロマチン構造と DNA・ヒストン修飾)

(文献³²⁾より引用改変)

さまざまなアプリケーションがある。ゲノム上の一塩基多型 (SNP) やコピー数多型 (CNV) の解析, 転写開始点の特定や分布の解析, ヒストンや DNA の修飾の解析, DNA-転写因子相互作用の解析, さまざまな働きを持つ RNA の解析, ゲノム DNA の空間的な高次構造の解析などが挙げられる。転写研究における最近の進歩から,

DNA の修飾, ヒルトンの修飾, 転写因子の結合, コファクターやヒストンリモデラーのリクルート, クロマチン高次構造の変化まで, さまざまなレベルで転写の制御機構が存在し, 既存の研究手法では分からなかったさまざまな現象が明らかにされつつある。

脂肪細胞分化における転写因子・エピゲノム解析の進歩

1. 脂肪細胞分化制御因子のゲノムワイド解析とエピゲノム制御

脂肪細胞分化において, マスターレギュレーターである核内受容体ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ), CCAAT/エンハンサー結合タンパク (C/EBP) や, さまざまな転写因子がカスケードを構成して分化を制御することがこれまでの研究で明らかにされてきた⁵⁻⁹⁾。脂肪細胞において, ChIP-chip や ChIP-seq を用いたゲノムワイド解析として, これまでに PPAR γ , レチノイド X 受容体 (RXR), C/EBP α , C/EBP β , グルココルチコイド受容体 (GR), β カテニンなどに対するものが報告されている¹⁰⁻¹⁸⁾。Lefterova と Nielsen らは, 脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ の結合領域のゲノムワイド解析を行った。PPAR γ /RXR ヘテロダイマーと C/EBP が別々の場所に存在しているわけではなく, ゲノム上で同じゲノム領域に共存 (co-localize) し, 互いに協調的に作用することで, 脂肪細胞分化に必要な転写制御を行っていることを示した¹⁰⁾¹¹⁾。従来の転写制御機構の解析においては, 転写開始点から数 kb 上流の近位プロモーター領域が解析されていたが, 実際には PPAR γ を含めた多くの転写因子は, ゲノム上において, イントロンや遠位部位など幅広く分布している。脂肪細胞において, アディポネクチン受容体である AdipoR2 は PPAR γ や PPAR α に正に制御されているが, 近位プロモーター領域の解析では, PPAR の応答領域は同定されていなかった。我々の PPAR γ の ChIP-seq のデータでは, 転写開始点下流の第 1 イントロンに 4 つの PPAR γ の結合領域が存在した (+20, +17, +8, +6 kb, data not shown)。それぞれの領域には, PPAR γ /RXR のヘテロダイマーに結合する結合モチーフ direct repeat-1 (DR-1) 配列 (AGGTCA-n-AGGTCA) が存在し, 実際に転写活性化を有しており, ゲノムワイド解析の有用性が示唆さ

れた (data not shown).

脂肪細胞分化において, Wnt シグナルは PPAR γ と脂肪細胞分化を強力に抑制するが, Okamura らは, Wnt シグナルの β カテニンのゲノムワイド解析から, Wnt シグナルが, 核内受容体 COUP-TFII の近位プロモーター上に存在する β カテニンの結合領域を介して COUP-TFII を誘導すること, また COUP-TFII が PPAR γ 1, 2 プロモーターに結合し, コリプレッサー SMRT をリクルートすることにより, ヒストンアセチル化の抑制などエピジェネティックな変化を介して, PPAR γ の転写を抑制することを示した¹⁸⁾.

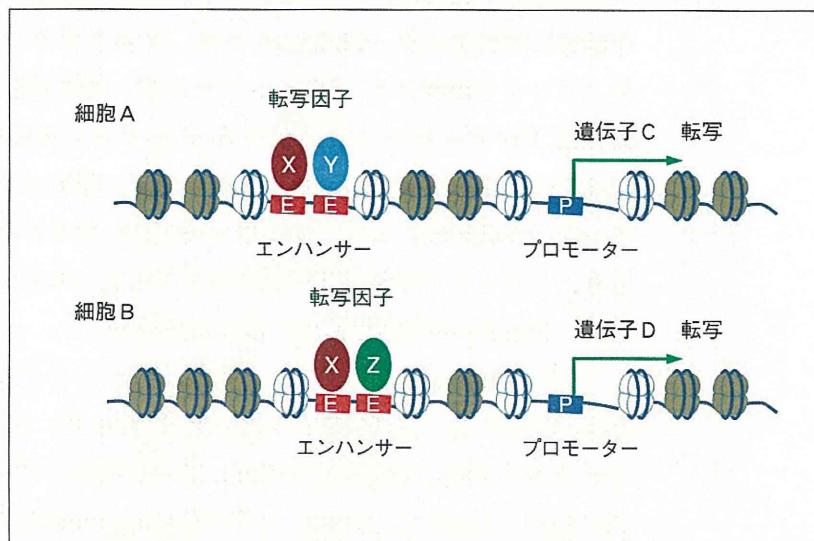
一方 Wakabayashi らは, H4K20 モノメチル化酵素 PR-Set7/Setd8 と, H3K9 メチル化酵素 Setdb1 が, PPAR γ によりそれぞれ正および負に制御されており, 分化を制御していること, さらに PR-Set7/Setd8 は PPAR γ とその標的遺伝子の発現を正に制御することで, ポジティブフィードバックループを形成することを示した¹⁹⁾.

そのほかのヒストン修飾酵素による脂肪細胞における働きについても報告がある. Cho らは, H3K4 メチル化酵素 MLL とアソシエートするタンパク PTIP が, マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) において PPAR γ や C/EBP α の発現を正に制御していることを, PTIP 欠損細胞を用いた実験により示した¹⁹⁾. Wang らは, H3K27 メチル化酵素である Ezh2 が, Wnt 遺伝子を抑制することで, 脂肪細胞分化を正に制御することを示している²⁰⁾. 一方, Lee らは H3K4 メチル化酵素 MLL3 を含むコンプレックス ASCOM (ASC-2 complex) が PPAR γ と直接インタラクトし, PPAR γ の転写活性と脂肪細胞分化に重要であることを示した²¹⁾.

H3K9 の脱メチル化酵素 Jhd2a について, Inagaki らと Tateishi らの独立したグループから欠損マウスの報告があり, これらの欠損マウスが肥満・インスリン抵抗性を呈することが示された²²⁾²³⁾. このことから, 生活習慣病のような病態においても, ヒストン修飾酵素によるエピゲノム修飾が大きな役割を果たすことが示された.

Takada らは, Wnt シグナルは骨髄間葉系前駆細胞において, Runx2 の発現を増加させて骨芽細胞の分化を促進するとともに, Wnt 非カノニカル経路 CaMKII-TAK1-TAB2-NLK を介して,

図2 同じ転写因子が細胞特異的な共存転写因子により異なる結合領域や役割を生じるメカニズム



PPAR γ と H3K9 メチル化酵素である Setdb1 を含むコンプレックスを形成し、脂肪細胞分化関連の標的遺伝子の転写を抑制することで、骨芽細胞分化と脂肪細胞分化の系統のスイッチとなっていることを報告した²⁴⁾。

2. 細胞特異的な共存転写因子

転写因子のゲノムワイド解析が可能になって以来、PPAR γ や C/EBP のように異なる転写因子どうしが、ゲノム上の同じ部位に共存して協調的に作用することが知られるようになったが、興味深いことに、同じ転写因子でも細胞特異的な結合領域や役割が生じるメカニズムの1つとして、同じ転写因子が細胞特異的に異なる転写因子と共存する機構が存在することが報告されている (図2)。PPAR γ は脂肪細胞以外では、マクロファージに高発現しており、脂肪細胞における作用とは異なる作用を持つことが知られているが、Lefterova らはマクロファージにおける PPAR γ のゲノム上の結合領域のバイオインフォルマティクスによるモチーフ解析により、PPAR γ の結合領域に Ets 転写因子の結合モチーフが濃縮していることを見いだした。この領域には血球系の分化に重要な Ets 転写因子 PU.1 が結合しており、PPAR γ と共存することにより、マクロファージ特異的な PPAR γ の

作用を発揮することを提唱した¹⁵⁾。

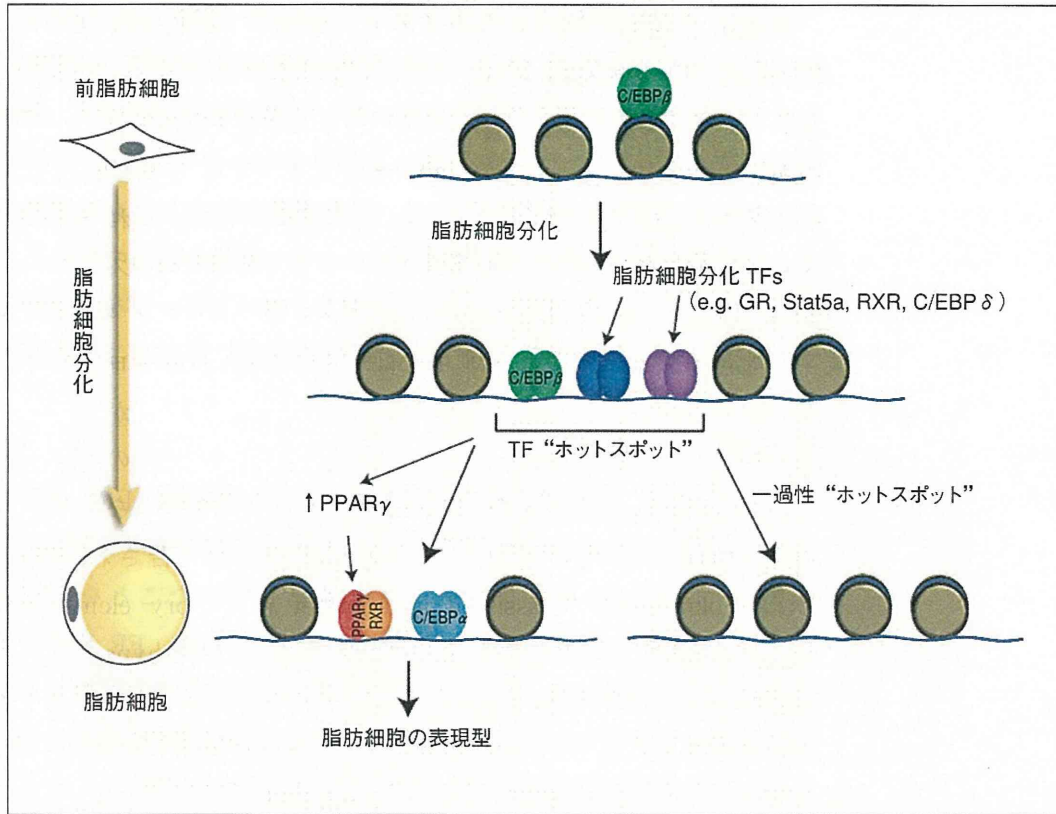
Steger らは脂肪細胞分化のヒストン修飾の ChIP-seq を行い、PPAR γ 2 の転写開始点 10 kb 上流に脂肪細胞分化刺激後、一過性にヒストンがアセチル化する領域を見いだして詳細な解析を行い、分化刺激で誘導される C/EBP β , GR, コアクチベーター p300, メディエーター Med1 が一過性に結合し、分化刺激の除去とともに解離することを示した。これらの領域はエンハンサー活性を持っていることから、PPAR γ と C/EBP α のフィードフォワードループを誘導するエピジェネティックな引き金(分化刺激の記憶)となることを示した¹⁵⁾。

3. パイオニア因子

Carroll らは、核内受容体であるエストロゲン受容体(ER)のゲノム上の結合領域のモチーフ解析により、ERの結合モチーフと共に転写因子 Forkhead の結合モチーフが濃集していたことを契機に FoxA1 が ER と共存することを同定したが、さらに、ER がゲノム上に結合するためには、FoxA1 が先にゲノム上に結合してヒストン修飾を介してクロマチン構造を開いていることが必須であることを見だし、“パイオニア因子”という概念を提唱している²⁵⁾。

脂肪細胞分化においては最近、Siersbæk らが C/EBP β が“パイオニア因子”にあたることを提唱している²⁶⁾。彼らは、脂肪細胞におけるオープンクロマチン領域の変化を、DNaseI-seq により解析した。脂肪細胞分化の分化誘導後の早期にクロマチン構造が変化する領域に、C/EBP β , C/EBP δ , GR, Stat5a, RXR の分化初期のレギュレーターが共存しており、一部領域ではこれらすべての転写因子が共存する“転写ホットスポット”が938ヵ所存在することを示した。また、レンチウイルスを用いたノックダウン実験により、それらの転写因子の中でも特に C/EBP β をノックダウンすると、同部位のほかの転写因子の結合が減少すること、またこれらのホットスポットの一部は分化の後期に PPAR γ や C/EBP α が結合することから、C/EBP β が最初にゲノム上に結合しクロマチン構造を開く“パイオニア因子”として働き、ほかの早期転写因子のゲノム上への一過性の結合を促進し“ホットスポット”を形成し、さらに一部は分化後期にかけ

図3 脂肪細胞分化における転写因子 (TF) のエピジェネティックなヒエラルキー (文献²⁶⁾より引用改変)



C/EBPβ が最初にゲノム上に結合しクロマチン構造を開く“パイオニア因子”として働き、ほかの早期転写因子のゲノム上への一過性の結合を促進し“ホットスポット”を形成し、さらに一部は分化後期にかけても開いたクロマチン領域を維持し、PPARγとC/EBPαが結合し、脂肪細胞の表現型に寄与する。
 略語：巻末の「今号の略語」参照

でも開いたクロマチン領域を維持し、PPARγとC/EBPαが結合し脂肪細胞の表現型に寄与するとする、エピジェネティックなヒエラルキーを持つモデルを提唱している (図3)²⁶⁾。

Mikkelsenらは、ヒト脂肪細胞とマウス脂肪細胞における網羅的なヒストン修飾とPPARγの結合領域を同定、ヒトとマウスの比較解析を行い、遺伝子の発現パターンは非常によく保存されているにもかかわらず、非プロモーター領域に広く分布するPPARγの結合領域は、予想以上に保存されていないことを示した¹⁷⁾。個々の領域の詳細な解析では、種による違いの原因として、トランスポゾン挿入などによる結合モチーフの変化などがみられた。また彼らは、ヒストンのアセ