

謝辞：本研究は，門脇研究室と東京大学先端科学技術研究センターの油谷浩幸先生，酒井寿郎先生，児玉龍彦先生の研究室との共同研究により得られた成果であり，先生方をはじめとして各研究室のメンバーにこの場を借りて深謝申し上げます。

文献

- 1) Holliday, R.: *Epigenetics*, **1** : 76-80, 2006.
- 2) Waki, H. and Tontonoz, P.: *Ann. Rev. Pathol.*, **2** : 31-56, 2007.
- 3) Lefterova, M. I. et al.: *Genes Dev.*, **22** : 2941-2952, 2008.
- 4) Nielsen, R. et al.: *Genes Dev.*, **22** : 2953-2967, 2008.
- 5) Steger, D. J. et al.: *Genes Dev.*, **24** : 1035-1044, 2010.
- 6) Siersbæk, R. et al.: *EMBO J.*, **30** : 1459-1472, 2011.
- 7) Lefterova, M. I. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **30** : 2078-2089, 2010.
- 8) Eguchi, J. et al.: *Cell Metab.*, **7** : 86-94, 2008.
- 9) Mikkelsen, T. S. et al.: *Cell*, **143** : 156-169, 2010.
- 10) Waki, H. et al.: *PLoS Genet.*, **7** : e1002311, 2011.
- 11) Simon, J. M. et al.: *Nat. Protoc.*, **7** : 256-267, 2012.
- 12) Okamura, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** : 5819-5824, 2009.
- 13) Wakabayashi, K. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **29** : 3544-3555, 2009.
- 14) Yamauchi, T. et al.: *Nat. Genet.*, **30** : 221-226, 2002.
- 15) Inagaki, T. et al.: *Genes Cells*, **14** : 991-1001, 2009.
- 16) Tateishi, K. et al.: *Nature*, **458** : 757-761, 2009.
- 17) Hino, S. et al.: *Nat. Commun.*, **3** : 758, 2012.
- 18) Wang, L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107** : 7317-7322, 2010.
- 19) Cho, Y. et al.: *Cell Metab.*, **10** : 27-39, 2009.
- 20) American Association for Cancer Research Human Epigenome Task Force : Moving AHEAD with an international human epigenome project. *Nature*, **454** : 711-715, 2008.

* * *

脂肪細胞分化特異的エンハンサーの ゲノムワイド解析と分化における NFI の役割

脇 裕典

東京大学大学院医学系研究科 脂肪細胞機能制御学 糖尿病・代謝内科

はじめに

DNA シークエンシング技術の爆発的な進歩に伴いゲノム科学の進展が著しい。高速シークエンサーによるゲノムワイド解析手法により、エンハンサーや転写因子の理解においてこれまでとは異なる新しい切り口が生まれている。本稿では、ゲノムワイド解析によって明らかにされてきたエンハンサー・転写因子における新しい知見について概説し、われわれが FAIRE-seq 法を用いて行った脂肪細胞分化におけるエンハンサーの網羅的な解析と、それを応用した新しい制御因子の同定について紹介する。

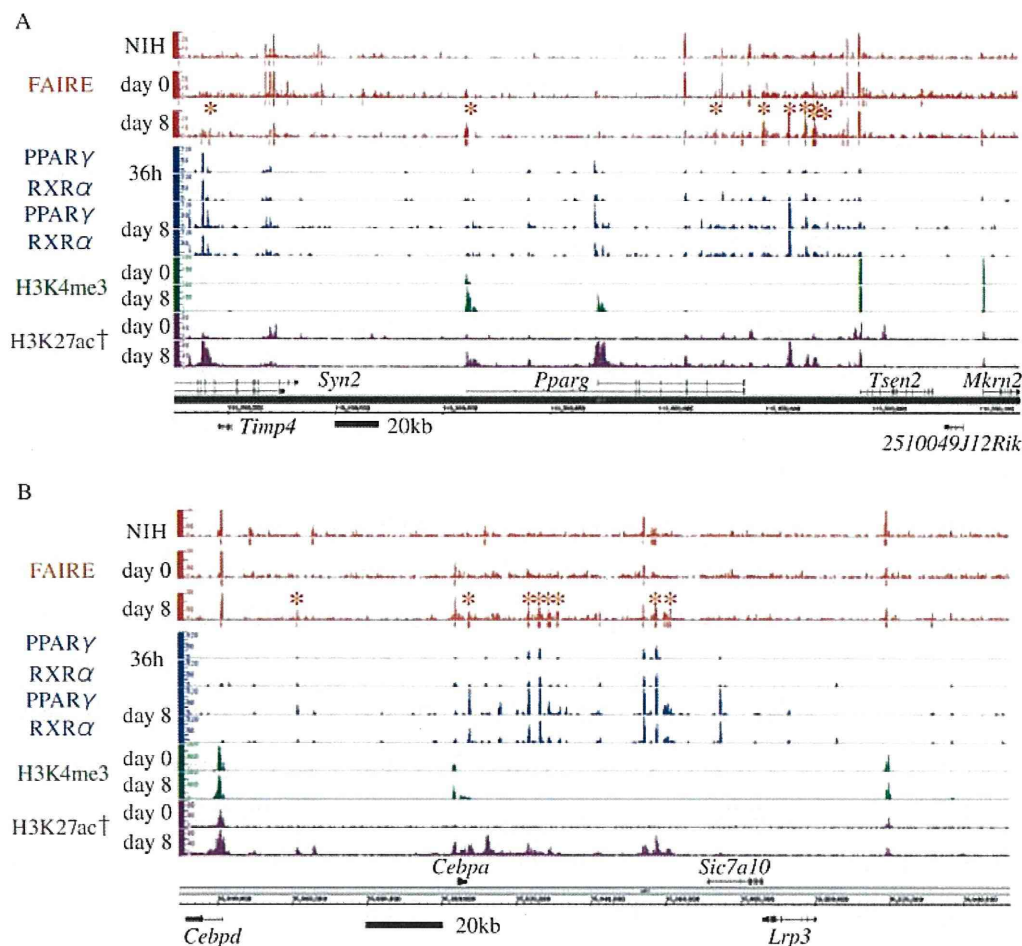
高速シークエンサーによるゲノムワイド解析とエンハンサーの新しい考え方

ゲノム上の遺伝子の転写は、遺伝子をコードする領域外 (non-coding sequences) にあるプロモーター、エンハンサー、サプレッサー、インスレーターなど様々な転写制御領域 (cis regulatory elements) によって制御されている。なかでもエンハンサーは、標的遺伝子の転写を遠位から方向非依存的に組織特異的に制御する機構として重要な役割を担っていると考えられてきた。これまで特定の遺伝子のエンハンサーの同定には、レポーター遺伝子を用いた遺伝子の近位プロモーター領域の機能解析が大きな役割を

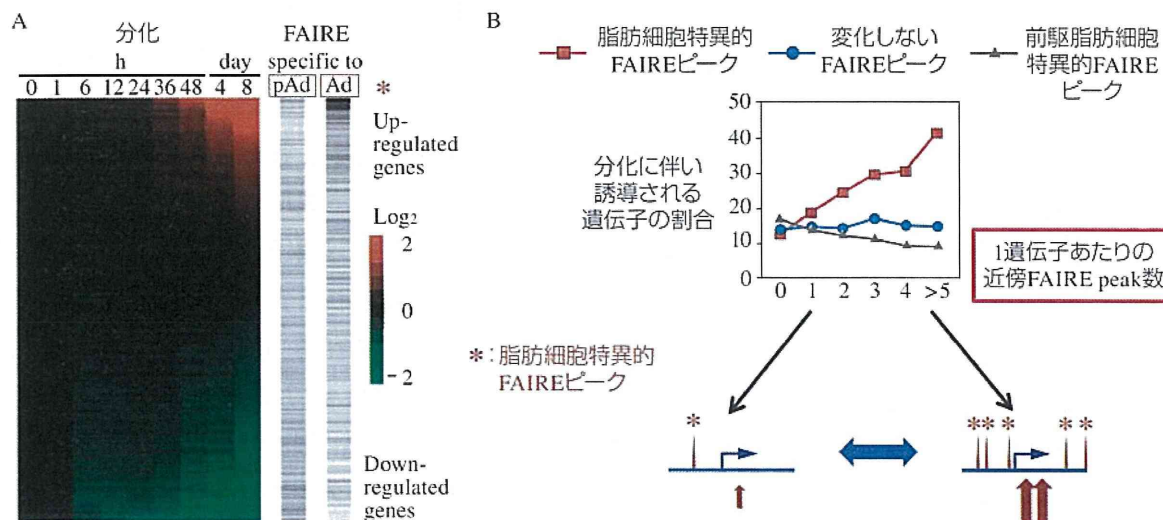
果たしてきた。

一つの成功例として、脂肪細胞における分化特異的な転写制御領域の同定があげられる。Spiegelman らは 3T3-F442A 脂肪細胞分化において強く誘導される蛋白として同定した aP2 (adipose P2)¹⁾ をコードする遺伝子 (*Fabp4*) において、その近位プロモーター領域を細胞系やトランスジェニックマウスを用いたレポーター遺伝子によってプロモーターの -5.4 kb 上流に絞り込み²⁾、その領域に結合する転写因子として核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ を同定した³⁾。インスリン抵抗性改善薬であるアクトス[®]などのチアゾリジン誘導体は PPAR γ の強力なアゴニストであり、*in vitro* では脂肪細胞を分化させ、*in vivo* ではアディポネクチンなどのおもに糖脂質関連の標的遺伝子の転写を制御することにより抗糖尿病作用を発揮する⁴⁾。

近年開発された高速シークエンシング技術は、ゲノム科学における様々な分野に応用されているが、この技術を用いてゲノム上のエンハンサーを網羅的に同定することが可能になってきている。ゲノム DNA は、ヒストン 8 量体を 1.65 回転したヌクレオソームを基本単位に高次構造をとっている。エンハンサーにおいて、DNA に結合する転写因子と、転写因子とコンプレックスを形成するコアクチベーター、コリプ



口絵 No. 7 PPAR γ 遺伝子領域 (A) と C/EBP α 遺伝子領域 (B) における, 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化前 (day 0) と後 (day 8) における FAIRE-seq (上段赤色), PPAR γ , RXR α に対する ChIP-seq (中段青色), H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3, 緑) とヒストン H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac, 紫, GSE20752 より取得) (p.38 参照)



口絵 No. 8 脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域 (図 3 の*) が近傍に存在する遺伝子 (パネル A, Ad のカラムの黒線) は, 脂肪細胞分化に伴って脂肪細胞分化で転写が制御される (パネル A, カラーパネル, 最も上部が分化に伴って強く誘導される遺伝子) (p.39 参照)

レッサー, ヒストン修飾酵素, クロマチンリモデラー, メディエーターがその領域のクロマチン構造を変化させることにより転写を調節している。エンハンサーを同定するためにはいくつかの方法が用いられる。個々の転写因子のクロマチン免疫沈降 (ChIP-seq) では, その結合領域をゲノムワイドに同定できる。また古くからエンハンサーに共通して認められる特徴として知られるヒストン(ヌクレオソーム)・フリーのオープンクロマチン構造⁵⁾をゲノムワイドに同定する方法として, DNase I への感受性が高いことを利用した DNase-seq⁶⁾や, 最近開発されたフェノールクロロホルム抽出を用いた Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE)-seq⁷⁾が用いられる。ほかにもヒストンのアセチル化やコアクチベーター CBP/p300 の結合⁸⁾, および特徴的なヒストンメチル化 (ヒストン H3 リジン 4 モノメチル化<K4me1>陽性かつトリメチル化<K4me3>陰性)⁹⁾を指標として, それぞれの特異抗体を用いた ChIP-seq により, ゲノム上のエンハンサーを網羅的に同定できる¹⁰⁾。

これらのゲノムワイドなヒストン修飾やコアクチベーターなどを用いたエンハンサーの解析から明らかにされてきた重要な知見として, プロモーターやインスレーターなど他のゲノム上の制御領域と比較して, エンハンサー領域は特に細胞特異的に存在しており⁹⁾, これらの領域の系統的な“エンハンサー活性”の解析の結果からも⁸⁾, エンハンサーが細胞特異的な転写制御に重要な役割を果たすことが示唆されている。また多くのエンハンサーは近位プロモーターではなくイントロンや遺伝子の下流を含めた幅広い領域に分布していることもゲノムワイド解析から初めて明らかにされた重要な知見である⁹⁾。

一方, 様々な転写因子の ChIP-seq の解析か

ら見出された新しい概念の一つとして, 異なる転写因子が同じ領域に共存 (co-localize) し, 共存する転写因子同士がヒエラルキーをもってお互いに協調・相互作用しながら標的遺伝子の転写を調節することがあげられる¹¹⁾。同じ転写因子が異なる細胞では異なる結合領域や作用をもつ理由の一つに共存する転写因子の違いがメカニズムの一つとして有力である (図 1)¹²⁾。たとえば PPAR γ は脂肪細胞とマクロファージにおいて異なるゲノム領域に結合し, 異なる作用を持つが, 脂肪細胞のゲノム上では PPAR γ は C/EBP と共存するのに対し, マクロファージにおいては血球系の転写因子である PU. 1 と共存している¹²⁾。ヒエラルキーをもって協調的に作用するメカニズムとして例にあげられるのはパイオニア因子 (pioneer factor) と呼ばれる因子で, 一つ目の転写因子 (パイオニア因子) が先にゲノムに結合しクロマチン構造を変化させることにより, 二つ目の転写因子のゲノムへの結合能 (accessibility) が制御される¹³⁾。代表的なプロトタイプとして核内受容体エストロゲン受容体 (ER) がゲノムに結合し作用するために必要な共存転写因子 Foxa1 があげられる¹⁴⁾。

転写因子はこれまでゲノムに結合しヒストン修飾酵素やクロマチンリモデラーをリクルートすることによりエンハンサーのエピゲノム状態を変化させると考えられてきた。これとは逆に, エンハンサー領域のクロマチン構造・エピゲノム状態が転写因子のゲノムへの結合を規定することも知られるようになってきた。グルココルチコイド受容体 (GR) がゲノム上に結合する領域の 95%はすでにオープンクロマチン構造を呈しており, 細胞特異的な GR 結合領域は, 細胞特異的にグルココルチコイドホルモンによる刺激が起こる以前から存在する“pre-program”されたクロマチンのアクセシビリティのパターンにより規定されることが示唆された¹⁵⁾。

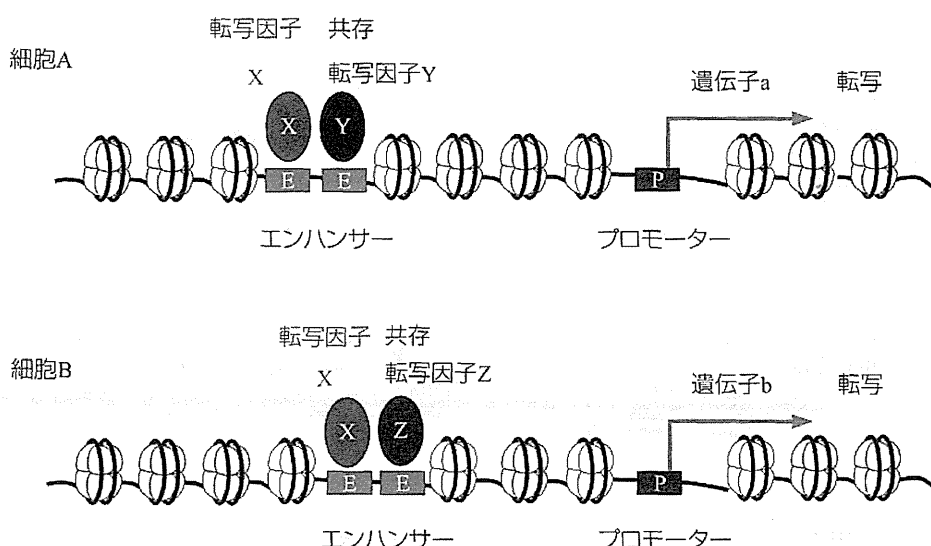


図1 同じ転写因子 X が細胞種によって異なるパートナーとなる転写因子と「共存」することにより、特異的な結合領域や標的遺伝子を生じる

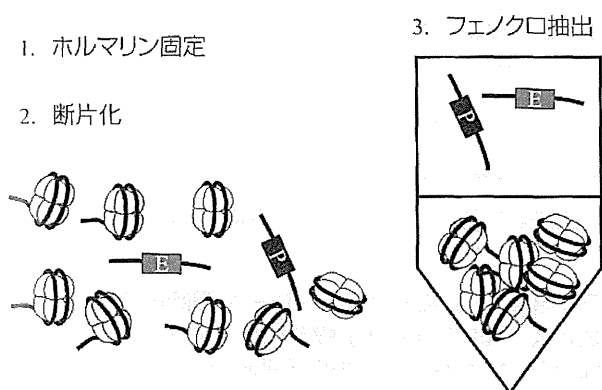


図2 FAIRE によるオープンクロマチン領域の検出 (口絵 No. 6 参照)

(Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, et al. : Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc* 2012 ; 7 : 256-267. を参照)

以上のように、高速シーケンサーがエンハンサーの研究に導入されたことにより、既存の手法では得ることのできなかった新しい概念が生まれつつある。

オープンクロマチン解析 (FAIRE-seq) による脂肪細胞分化に伴う転写制御領域の同定

われわれはエンハンサーをゲノムワイドに同定する方法として、Jason Lieb らが開発した

FAIRE-seq を使い、脂肪細胞分化におけるオープンクロマチン領域の同定を試みた^{7,16)}(図 2)¹⁶⁾。またマスターレギュレーター PPAR γ とヘテロダイマーパートナーである RXR α 、ヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3) などに対する特異抗体を用いた ChIP-seq も施行した。図 3 はこれらのゲノムワイドデータの PPAR γ 遺伝子 (A) と C/EBP α 遺伝子の領域 (B) の結果である。プロモーター領域のヒストン修飾やオープンクロマチンと比較して、非プロモーター領域にも多くのオープンクロマチン領域が存在することがわかる。特に脂肪細胞分化で特異的にオープンクロマチンに変化する領域 (図 3 中の (*)) がこれらの遺伝子の 3' 側の下流に多数かたまって存在している¹⁶⁾。

3T3-L1 細胞 (day 0) のゲノム全体では 37,781 か所のオープンクロマチン領域が検出され、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 はヒストン H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3) やヒストン H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac) のプロモーター型ヒストン修飾を示し、非プロモーター領域の FAIRE

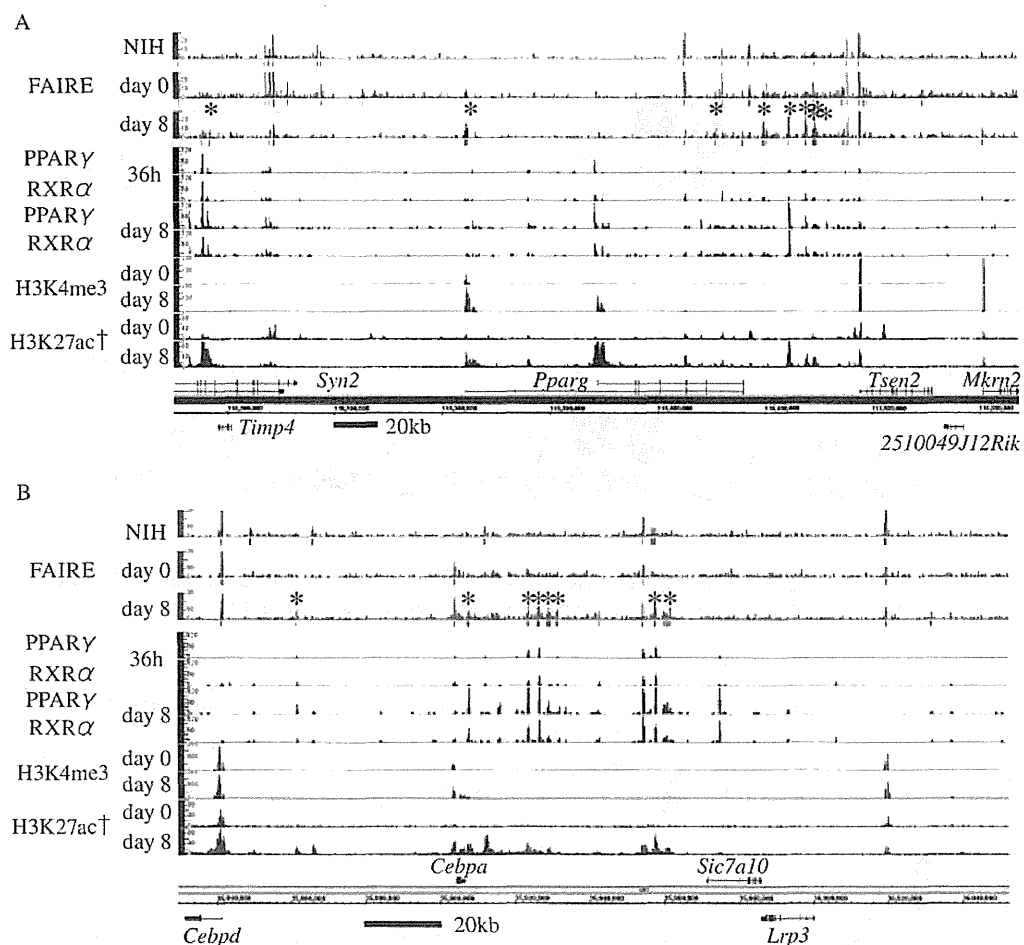


図3 PPAR γ 遺伝子領域 (A) と C/EBP α 遺伝子領域 (B) における, 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化前 (day 0) と後 (day 8) における FAIRE-seq (上段赤色), PPAR γ , RXR α に対する ChIP-seq (中段青色), H3 リジン 4 トリメチル化 (H3K4me3, 緑) とヒストン H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac, 紫, GSE20752 より取得) (口絵 No. 7 参照)

脂肪細胞分化に特異的なオープンクロマチン領域 (*) が複数, 遺伝子の 3'側の下流の遠位領域に多数存在している. その一部分は PPAR γ /RXR α 結合領域 (青) と重なる. これまでのレポーター遺伝子による解析が行われていた“近位プロモーター領域”の外にこれらの制御領域が存在する. 黒線は 20 kb の長さを示す.

(Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, *et al.*: Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002311. より引用)

は H3K4me1+, H3K27ac+, H3K4me3- のエンハンサー型ヒストン修飾を示した¹⁶⁾ (data not shown). これらの FAIRE ピークを, プロモーター FAIRE ピーク (図 4 左) と非プロモーター FAIRE ピーク (図 4 右) に分けて, 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化前 (day 0) と後 (day 8), および脂肪細胞に分化しない NIH-3T3 細胞にお

ける重なりを比較すると, プロモーター FAIRE ピークは一定しているのに対して, 非プロモーター FAIRE ピークは細胞種や分化によってダイナミックに変化していることがわかる¹⁶⁾. 機能的にも, 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転写が制御される遺伝子 (図 5A), また脂肪分化や糖脂

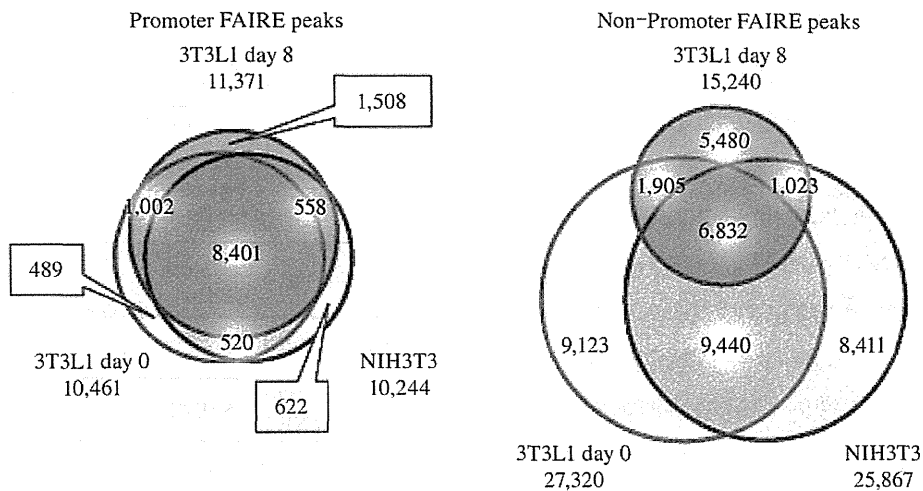


図4 プロモーター FAIRE ピーク (左) と非プロモーター FAIRE ピーク (右) の、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化前 (day 0) と後 (day 8), および脂肪細胞に分化しない NIH-3T3 細胞における重なり

非プロモーター FAIRE ピークは細胞種や分化によってダイナミックに変化している。

(Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, et al. : Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011 ; 7 : e1002311. より引用)

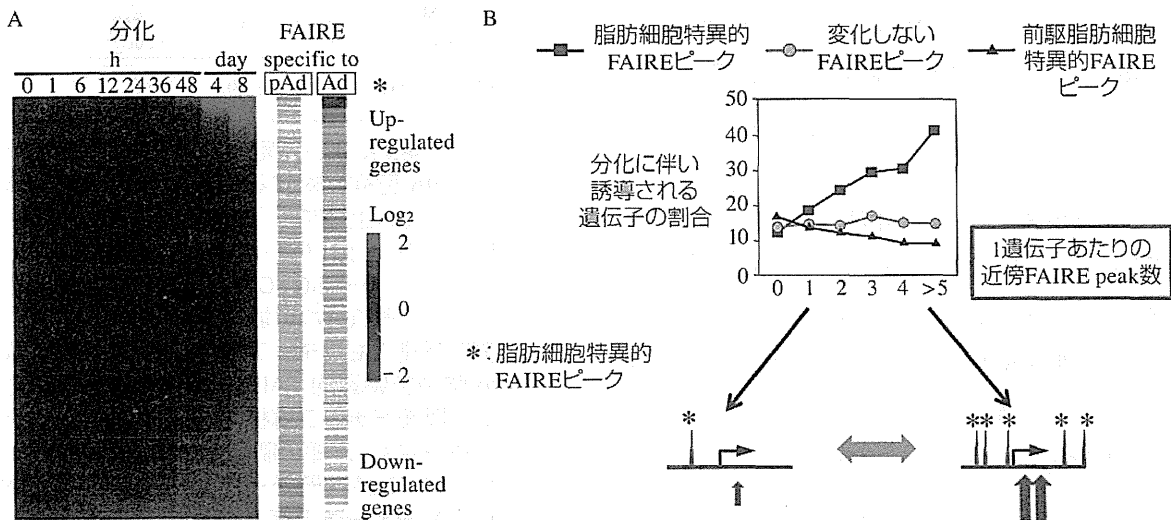


図5 脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域 (図3の*) が近傍に存在する遺伝子 (パネル A, Ad のカラムの黒線) は、脂肪細胞分化に伴って脂肪細胞分化で転写が制御される (パネル A, カラーパネル, 最も上部が分化に伴って強く誘導される遺伝子) (口絵 No. 8 参照)

1 遺伝子あたりの脂肪細胞特異的 FAIRE ピークの数が多いほど、分化によって制御される確率が高い。(Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, et al. : Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011 ; 7 : e1002311. より引用)

質代謝にかかわる遺伝子の近傍に濃縮しており (data not shown), その数が多いほど遺伝子の転写が制御される傾向にあった¹⁶⁾(図

5B). 実際に PPAR γ や C/EBP α , Klf15 など強く脂肪細胞に伴い誘導される遺伝子 (図 1, data not shown) の近傍には多数の脂肪細胞特異的

オープンクロマチン領域が存在することから、適切な細胞特異的な転写制御には、複数の遠位エンハンサーの存在が重要であることが示唆される。

前項「高速シーケンサーによるゲノムワイド解析とエンハンサーの新しい考え方」で述べたとおり、これまで特定の遺伝子のエンハンサーの同定には、レポーター遺伝子を用いた遺伝子の近位プロモーター領域の機能解析が大きな役割を果たしてきた。しかしながら近位プロモーターの解析ではエンハンサーを同定できない例も存在する。脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ と C/EBP α は互いに制御され、ポジティブフィードバックを形成していることが、*in vitro* の実験や¹⁷⁾、PPAR γ 欠損マウスの脂肪細胞分化において C/EBP α 遺伝子が誘導されないなどの結果¹⁸⁾ から明らかとされてきた。しかしながら、PPAR γ による C/EBP α 遺伝子における転写制御領域は同定されていなかった。C/EBP α 遺伝子領域では上述のとおり、脂肪細胞分化に特異的なオープンクロマチン領域が遺伝子の下流数十 kb にわたって複数存在しており、その多くは PPAR γ /RXR α の結合領域と一致していた。これらの結合領域の DNA 配列の解析では、PPAR γ /RXR α の結合モチーフである direct repeat 1 (DR1) と呼ばれる AGGTCA-n-AGGTCA に類似した配列が存在しており (data not shown)、それらの多くがゲルシフト解析で実際に PPAR γ /RXR α ヘテロダイマーに結合し、ルシフェラーゼを用いたレポーター解析で、PPAR γ /RXR α の応答領域 (PPAR response element, PPRE) として作用した (data not shown)。これらの領域はすべてコンベンショナルなレポーター解析が行われる近位プロモーター領域とは離れた下流に存在しており、また、強い転写制御を受ける遺伝子の近傍には“複数”の遠位エンハンサーが存在するこ

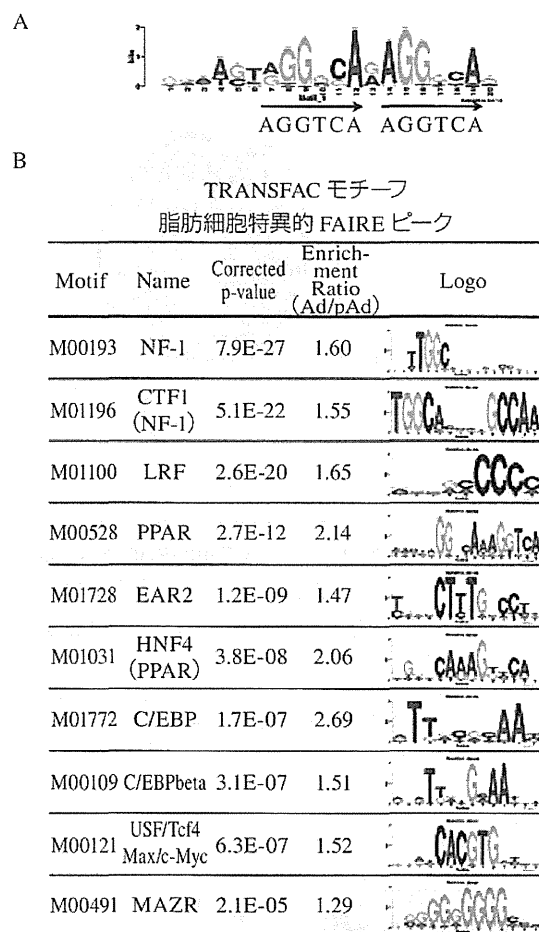


図6 ChIP-seq により同定された PPAR γ 結合領域の DNA 配列に対する de novo モチーフ解析 (A)。最も上位にくるモチーフは、PPAR γ /RXR α のヘテロダイマーの結合モチーフ AGGTCA-n-AGGTCA が既知の知識なしに得られた。それぞれの塩基で厳密性は異なり、5'側の外側にもモチーフが存在する (本文参照)。脂肪細胞特異的 FAIRE ピークの配列に対する、既知モチーフ解析 (B) (TRANSFAC データベース)。既知の制御因子である PPAR γ や C/EBP の結合モチーフ以外に転写因子 NFI の結合モチーフの有意な濃縮を認めた

(Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, *et al.*: Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002311. より引用)

とも考慮すると (図3, 図5B), これまでの近位プロモーターのレポーター解析は全体像の一部しか捉えられていない可能性, そしてエンハンサーの正確な同定および全体像の把握には, FAIRE-seq や ChIP-seq などのアプローチが非

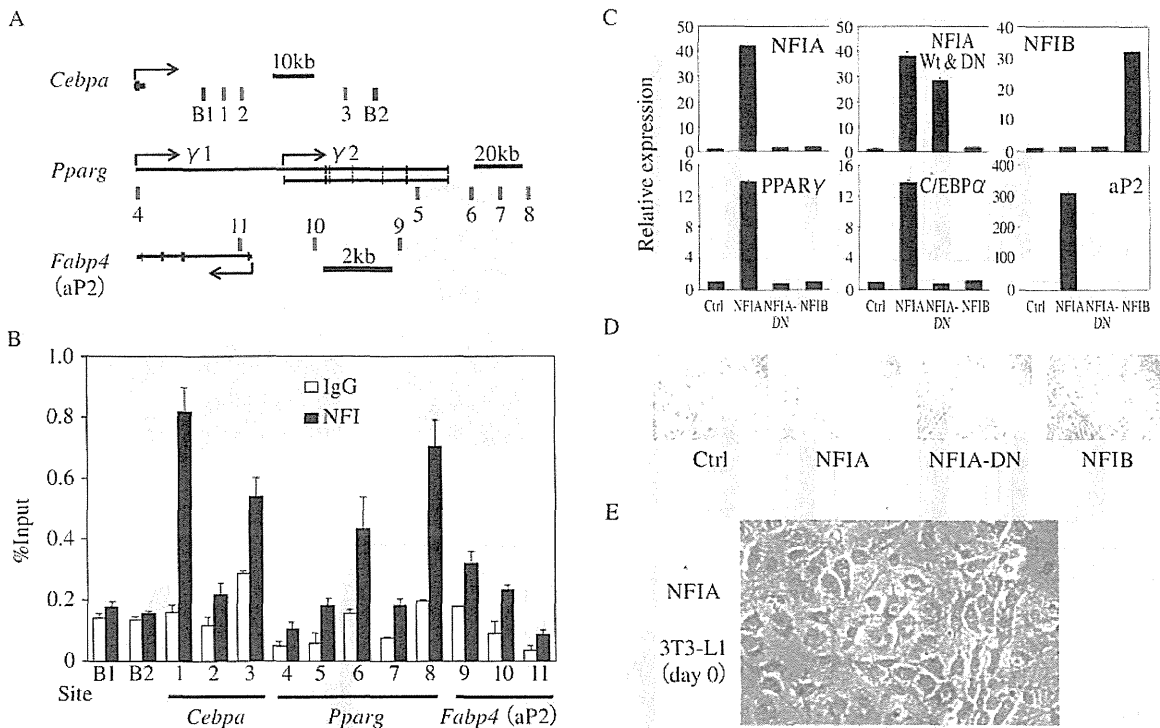


図7 PPAR γ , C/EBP α および aP2 遺伝子領域の脂肪細胞特異的 FAIRE 領域 (A) への NFI の結合 (B, ChIP-qPCR). 3T3-L1 細胞における NFIA の過剰発現では PPAR γ , C/EBP α および aP2 遺伝子の発現レベルが 10~300 倍に上昇し (C), 分化刺激なしで脂肪滴の形成を認めた (D, E: 高倍率) (口絵 No. 9 参照)

(Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, et al.: Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002311. より引用)

常に有効で、かつ必要であることが示唆される。

モチーフ解析と FAIRE-seq の組み合わせによる新たな分化制御因子の同定

FAIRE-seq は特定の転写因子に対する ChIP-seq と異なり、エンハンサーを既存の知識なしにバイアスなく検出する。FAIRE-seq により同定されたエンハンサー領域の DNA 配列に対して、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、そのプロセスにおける重要な転写因子および新たな制御因子の同定に有用であると考えられる。モチーフ解析は特定の DNA 配列のなかに、数 bp から十数 bp 程度の転写因子が結合しうる塩基配列 (結合モチーフ) が存在しているかどうかを解析する手法で、既存の配列の知識なしに有意に多く存在

する結合モチーフを見出す de novo モチーフ解析と、既知の転写因子の結合モチーフのデータベース (Transfac[®] など) が有意に多く存在するかどうかを検討する既知モチーフ解析が存在する。図 6A は ChIP-seq により同定された PPAR γ の結合領域に対する de novo モチーフ解析の結果だが、最も上位にくるモチーフは、PPAR γ /RXR α のヘテロダイマーの結合モチーフ AGGTCA-n-AGGTCA であり、既存の知識に一致した¹⁶⁾。それぞれの塩基で厳密性は異なり、5'側の外側にもモチーフが存在する。この領域は最近 PPAR γ /RXR α のヘテロダイマーの結晶構造解析で明らかにされた DNA Binding Domain に続く“ヒンジ領域”の DNA との結合領域に相当し¹⁹⁾、モチーフ解析の正確性・妥当性が示唆される。そこで脂肪細胞特異的 FAIRE

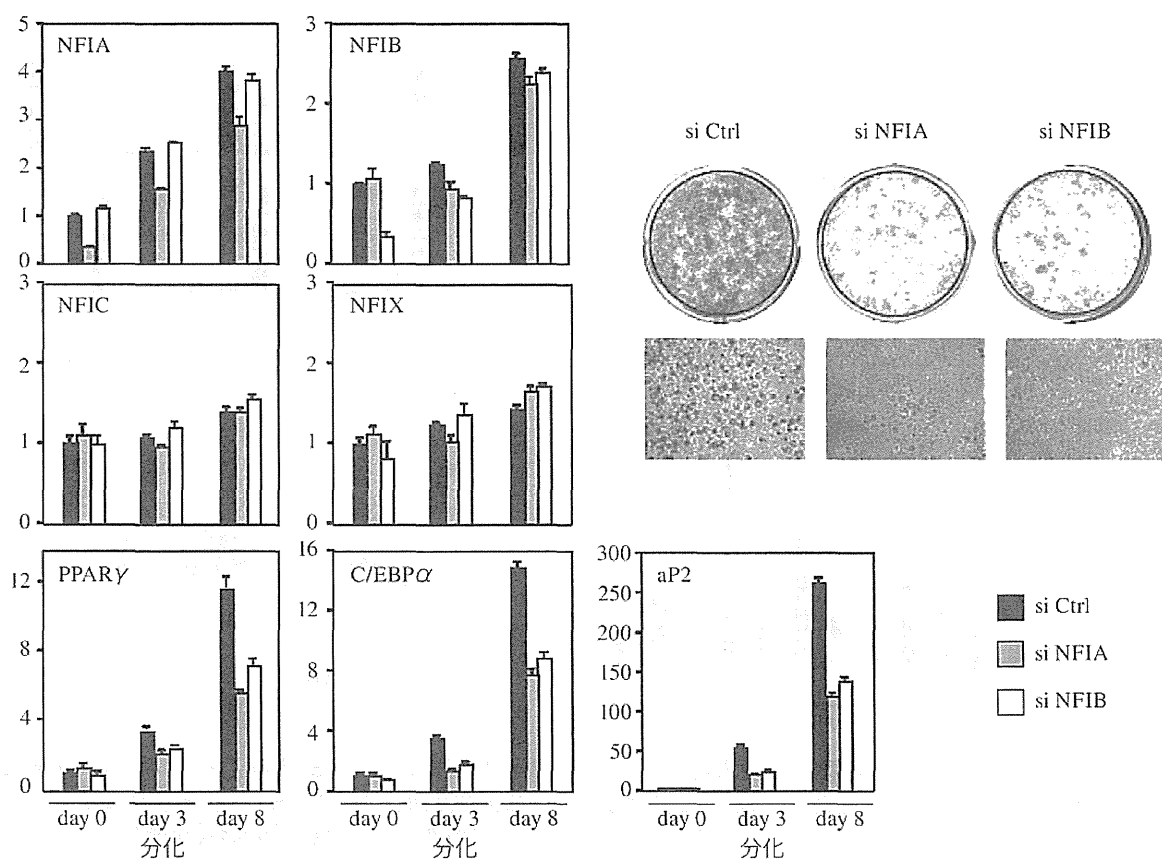


図8 3T3-L1細胞におけるNFIAとNFIBのノックダウンによりPPAR γ , C/EBP α , aP2の誘導(左)と、脂肪滴の蓄積(右)が抑制された

(Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, *et al.*: Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002311. より引用)

ピークのDNA配列に対して既知モチーフ解析を施行したところ、既知の制御因子であるPPAR γ やC/EBPの結合モチーフ以外に脂肪細胞における機能が知られていない転写因子NFIの結合モチーフの有意な濃縮を認めた(図6B)¹⁶⁾。実際に、PPAR γ , C/EBP α およびaP2遺伝子領域の脂肪細胞特異的FAIRE領域では、NFIの結合がChIP-qPCRで認められ(図7A, B), 3T3-L1細胞においてNFIAを過剰発現させるとPPAR γ , C/EBP α およびaP2遺伝子の発現レベルが10~300倍に上昇し、分化刺激なしで脂肪滴の形成を認めた(図7C, D, E)。一方、3T3-L1細胞においてNFIAやNFIBをノックダウンすると分化時のPPAR γ , C/EBP α , aP2の誘導と、脂肪滴の蓄積が抑制され、脂肪細胞

分化におけるこれらの因子の生理的な役割が示唆された(図8)¹⁶⁾。

おわりに

高速シーケンサーの出現により、エンハンサーや転写因子研究においてこれまでにない切り口が生まれ、その全体像を把握することが可能になってきた。われわれは脂肪細胞分化におけるエンハンサーを、オープンクロマチン領域を検出するFAIRE-seq法を用いて網羅的に同定し、分化制御にかかわる主要な因子の転写制御において複数の遠位エンハンサーが重要な役割を果たすことを示唆した。またFAIRE-seqによるエンハンサーの同定とモチーフ解析の組み合わせは、分化を制御する因子を既存の知識や

バイアスなく同定することが可能で、既知の制御因子 PPAR γ や C/EBP に加えて NFI が脂肪細胞の分化制御因子として同定した。NFIA は分化の初期段階である分化誘導前のコンフルエント状態に伴いその発現が上昇する（未発表データ）。図 7 で認めた NFI の結合領域は分化後半で PPAR γ が結合してくる領域であり、分化誘導前の 3T3-L1 細胞に NFI を過剰発現させ、これらの領域を FAIRE-qCPR で検討すると、DNA へのアクセシビリティが増加している（未発表データ）。現在 NFI が PPAR γ の共存因子として作用している可能性について検討している。

最後にご指導いただいている門脇 孝先生、油谷浩幸先生、酒井寿郎先生、山内敏正先生、共同研究者である中村正裕先生、若林賢一先生ほかご協力いただいた多数の先生方にこの場をかりて感謝申し上げます。

文献

- 1) Spiegelman BM, Frank M, Green H : Molecular cloning of mRNA from 3T3 adipocytes. Regulation of mRNA content for glycerophosphate dehydrogenase and other differentiation-dependent proteins during adipocyte development. *J Biol Chem* 1983 ; **258** : 10083-10089.
- 2) Graves RA, Tontonoz P, Platt KA, *et al.* : Identification of a fat cell enhancer : analysis of requirements for adipose tissue-specific gene expression. *J Cell Biochem* 1992 ; **49** : 219-224.
- 3) Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, *et al.* : Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 1994 ; **22** : 5628-5634.
- 4) Lehrke M, Lazar MA : The many faces of PPARgamma. *Cell* 2005 ; **123** : 993-999.
- 5) Wu C : The 5' ends of Drosophila heat shock genes in chromatin are hypersensitive to DNase I. *Nature* 1980 ; **286** : 854-860.
- 6) Song L, Crawford GE : DNase-seq : a high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2010 ; **2010** : pdb prot5384.
- 7) Simon JM, Giresi PG, Davis IJ, *et al.* : Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat Protoc* 2012 ; **7** : 256-267.
- 8) Visel A, Blow MJ, Li Z, *et al.* : ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 2009 ; **457** : 854-858.
- 9) Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, *et al.* : Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 2009 ; **459** : 108-112.
- 10) Bulger M, Groudine M : Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* 2011 ; **144** : 327-339.
- 11) Cheung E, Kraus WL : Genomic analyses of hormone signaling and gene regulation. *Annu Rev Physiol* 2010 ; **72** : 191-218.
- 12) Lefterova MI, Steger DJ, Zhuo D, *et al.* : Cell-specific determinants of peroxisome proliferator-activated receptor gamma function in adipocytes and macrophages. *Mol Cell Biol* 2010 ; **30** : 2078-2089.
- 13) Voss TC, Schiltz RL, Sung MH, *et al.* : Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. *Cell* 2011 ; **146** : 544-554.
- 14) Zaret KS, Carroll JS : Pioneer transcription factors : establishing competence for gene expression. *Genes Dev* 2011 ; **25** : 2227-2241.
- 15) John S, Sabo PJ, Thurman RE, *et al.* : Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. *Nat Genet* 2011 ; **43** : 264-268.
- 16) Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, *et al.* : Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011 ; **7** : e1002311.
- 17) Wu Z, Rosen ED, Brun R, *et al.* : Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999 ; **3** : 151-158.
- 18) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, *et al.* : PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999 ; **4** : 597-609.
- 19) Chandra V, Huang P, Hamuro Y, *et al.* : Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 2008 ; **456** : 350-356.

トピック

Keystone Symposia, Genetic and Molecular Basis of Obesity and Body Weight Regulation (J7), Pathogenesis of Diabetes (J8) に参加して

東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科 脂肪細胞機能制御学

協 裕典

はじめに

2012年1月29日～2月3日にKeystone Symposia, Genetic and Molecular Basis of Obesity and Body Weight Regulation (J7), Pathogenesis of Diabetes (J8)¹⁾のジョイントセッションが、米国ニューメキシコ州サンタフェのSanta Fe Community Convention Centerで開催された(図1)。サンタフェはニューメキシコ州の州都であり、1607年に創設された、アメリカ合衆国の中でも最も古い歴史を持つ街の一つである。Santa Fe trailやRoute 66などが通っており古くからの交通の要衝であった。アルバカーキー空港からの途上は延々と続く土漠で(図2)、この様な土地柄からか、付近には原爆の研究で有名なロスアラモス研究所もあるようだ。一方、会場の建物を含めて、サンタフェの街は漆喰造りのプエブロ(Pueblo, 中南部のネイティブアメリカン)風の建築で特徴づけられ、アメリカ合衆国の都市部には見られない独特の雰囲気である。玄関であるアルバカーキー空港にもいかにもインディアンと思われる顔立ちの職員が目立った。今回は肥満と糖尿病のジョイントセッションということもあり、合わせて800人を超える参加者が集い、今年のKeystone Symposiaで最大のミーティングだった。今回のセッションは、ジェネティクス、白色脂肪細胞の褐色化(Browning, BRITening, Beiging)、脂肪細胞の起源としての血

管上皮細胞、オミクスからエピジェネティクスまで幅広いテーマで新しく今話題のトピックスが討議された。

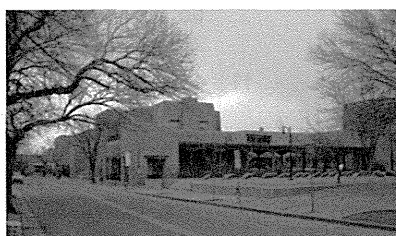


図1 会場のSanta Fe Community Convention Center



図2 アルバカーキー空港からの途上

ジェネティクス

今回のミーティングはKeynoteスピーカーとして、University of PennsylvaniaのDr. Daniel J. Raderと、University of California, Los AngelesのDr. Aldons J. Lusisのお二人によるジェネティクスの講義でスタートした。Dr. Raderは、ゲノムワイド関連解析(Genome-wide association study: GWAS)が、病態の形成メカニズムの解明に結びついた成功例の一つとして、コレステロールを指標としたGWASで原因SNP/遺伝子として同定されたSortilin (*Sort1*) について発表した。コレステロールGWASで同定さ

れたSNP rs646776のリスクアリルとノンリスクアリルの比較では、15 mg/dlの血清Low Density Lipoprotein (LDL) コレステロール値の差が認められ、近傍の遺伝子である*Sort1*の発現レベルに約4倍の差がみられた。AAVウイルスとsiRNAを用いたスクリーニングで、肝臓におけるSortilinの過剰発現、ノックダウンにより、血清LDLコレステロール値の大きな変化を認め、転写解析により原因SNPも同定された。その後の生化学的な解析からSortilinがapoBのレセプターとしてLow Density Lipoprotein (LDL) の代謝を制御する重要な因子であることが解明されたという報告を行った^{2,3)}。

一方、Dr. Lusisはマウスジェネティクスとシステム生物学の専門家であるが、現在のGWASの課題について「Common-disease common-variant仮説」の限界に加えて、遺伝子-遺伝子相互作用、遺伝子-環境因子相互作用、遺伝子-性別相互作用などを考慮する重要性を述べた。また現在のGWASは糖尿病における空腹時血糖値や肥満における体重(BMI)などの単純な指標による解析であるが、糖尿病や肥満などのheterogeneityを持つ疾患に対する将来の方向性として、サブ表現型やOmics解析、臓器間相互作用などを指標とする「多」対「多」による解析の組み合わせの必要性を指摘した⁴⁾。

University of CambridgeのDr. Sadaf Farooqiは肥満の分野でRare variant

(マイナーアレル頻度MAFが0.001未満)ではあるが, エフェクトの大きい遺伝子変異を中心に進めている研究について紹介した. この分野では高速シーケンサーの発達に伴い, エキソームシーケンシングが非常に有用なツールとして用いられるようになってきている⁵⁾. 稀な変異であるがエフェクトの大きい遺伝子変異はより高頻度で遺伝子のコーディング配列に変異があると考えられ, 様々な単一遺伝子疾患においてエキソーム(コーディング配列)の網羅的な解析で効率的に変異が同定されている. 彼らはUK10Kと呼ばれる単一遺伝子によると考えられる稀な高度肥満家系を含む疾患ゲノムコホートを用いて, エキソーム解析によりPOMCやPC1/3, レプチンやレプチン受容体, SIM1, MC4Rなどの変異が同定されていること, また症例として, 成長障害, 便秘, 発達障害を見せる6歳児の家系において, *de novo*の甲状腺ホルモン受容体 α (THRA)の変異を同定した研究を紹介した⁶⁾. エキソームシーケンシングで同定されてくる数万という数多くの候補変異のなかから正しく原因となる変異を見出すために, 大きいMAFを持つSNPの除外, アミノ酸配列への影響の予測, 良質な家系の情報が重要であり, より効率的な戦略が求められている⁵⁾.

Browning, BRITening, Beiging

褐色脂肪組織は寒冷時の熱産生・エネルギー消費に重要な臓器である. ヒト(成人)においても機能的な褐色脂肪組織が存在することが明らかにされたこと⁷⁻¹⁰⁾, また褐色脂肪細胞の起源がリニエージトレーシング法を用いて骨格筋細胞と共通した幹細胞に由来していることや, BMPシグナルの重要性が明らかにされてきたことから^{11, 12)}, 近年盛んに研究が行われている. 一方白色

脂肪細胞においても寒冷刺激など一定の刺激により部位特異的に褐色脂肪細胞様の形質を獲得することが知られており, 最近ではその様な細胞を, Beige (ベージュ) cells, BRITE (brown in white) cellsなどと呼び, 白色脂肪細胞が「褐色化」することはBrowning, BRITening, Beigingなどと呼ばれている. 今回のKeystone Symposiaにおいて様々な演題で白色脂肪細胞の「褐色化」が取り上げられ, 現在の研究の焦点の中心の一つであることを物語った.

Dr. Bruce M Spiegelman (Dana-Farber Cancer Institute)は, 骨格筋特異的なPGC1 α マウスの解析から, 運動によって誘導される骨格筋由来の新たな分泌タンパクとしてIrisinを同定した¹³⁾. 興味深いことに, 慢性的にIrisinを投与すると白色脂肪組織にUCP1の増加などの褐色脂肪組織様の変化(browning)を起こさせ, 体重減少やインスリン抵抗性の改善作用を有することを見出した. ヒトにおいても運動時に血中Irisin値が増加するデータも示しており, 今後肥満や糖尿病治療につながる可能性が期待される.

FGF21は主に肝臓において絶食時にPPAR α の標的遺伝子として誘導される因子で, ケトン体新生, 糖新生, Torper(冬眠様状態)など全身代謝の制御因子として治療的側面からも注目されている¹⁴⁾. 寒冷刺激や β アドレナリン受容体刺激によって褐色脂肪組織ではFGF21が誘導されることが報告されていた^{15, 16)}. Beth Israel Deaconess Medical CenterのDr. Eleftheria Maratos-Flierらの検討では, 寒冷刺激では肝臓での発現や血清FGF21値の変化は認められないが, 褐色のみならず白色脂肪組織(皮下脂肪, 腎周囲脂肪)でFGF21の発現が上昇することを示した. FGF21を投与すると白色脂肪組織(皮下脂肪, 腎

周囲脂肪)における熱産生関連遺伝子を誘導した. 一方FGF21欠損マウスでは, 寒冷刺激時のUCP1の増加が減弱していた. 更にFGF21投与における白色脂肪組織の“browning”作用はPGC1 α 欠損マウスにおいて減弱していた. このことからFGF21の白色脂肪組織への“browning”作用はPGC1 α を介しており, そのメカニズムとしてFGF21がPGC1 α をタンパク質レベルで増加させることを報告した¹⁷⁾.

一方, 引き続きFGF21の代謝作用を同定したUniversity of Texas Southwestern Medical CenterのDr. Steven A Kliewerらのグループは肝臓におけるPPAR α による制御とは対照的に白色脂肪組織においてはPPAR γ により制御されていることを報告した. PPAR γ アゴニストによるFGF21の転写レベルの上昇は, 血中FGF21レベルには反映されず, オートクライン・パラクライン的な作用が示唆された. 興味深いことにFGF21欠損マウスではPPAR γ アゴニストによる標的遺伝子の誘導が部分的に抑制されており, アゴニストによる抗糖尿病作用, 及び副作用である体重増加や浮腫の双方ともが減弱していた. またその分子メカニズムとしてPPAR γ により誘導されるFGF21がPPAR γ のSUMO化による不活性化を抑制し, PPAR γ の活性状態を維持する機構を示した¹⁸⁾. また最後に, FGF21の投与や過剰発現では骨量が減少し脂肪細胞が骨髄内で増加すること, FGF21の欠損細胞において骨量が増加し脂肪細胞が骨髄内で減少する現象を報告し¹⁹⁾, FGF21の薬理的な副作用となりうる点に注意を促した.

脂肪細胞の起源としての血管内皮細胞

脂肪細胞の起源はStromal vascular fraction (SVF) 内に存在しており, 中

でも血管周囲の壁細胞が脂肪細胞に分化する可能性²⁰⁾が示唆されていた。今回のKeystone Symposiaでは血管内皮細胞が脂肪細胞の起源ではないかという興味深い発表があった。

Spiegelman 研究室のDr. Rana K. Gupta (Dana-Farber Cancer Institute) は、前駆脂肪細胞への運命決定を司る転写因子としてin vitroのスクリーニングから同定してきたZfp423²¹⁾について、Green fluorescent protein (GFP) を代わりに挿入したBACトランスジェニックマウスを作成し、in vivoの脂肪組織におけるZfp423の発現をマーカーに脂肪前駆細胞の同定を試みた²²⁾。脂肪組織内のStromal vascular fraction (SVF) 内のZfp423陽性細胞は高頻度に脂肪細胞に分化し、in vivoの前駆細胞の分化マーカーとして機能していることが示された。但し、Scal⁺, CD24⁺などのこれまで提唱されている前駆細胞のマーカーの分布とは完全に一致せず、皮下と生殖器周囲でもその一致度が異なっており、部位による特異性があった。免疫組織化学において、Zfp423は成熟脂肪細胞と、血管周囲に位置する細胞に発現しているが、興味深いことに血管内皮細胞の一部にも発現していた。

この研究に引き続き、以前脂肪組織内の炎症細胞の集簇像であるCrown-like structureを電子顕微鏡で観察、報告²³⁾したUniversity of AnconaのDr. Saverio Cintiらは、生後間もないマウスの白色脂肪組織の発生段階の電子顕微鏡像の解析に基づいて、血管内皮細胞が血管内腔から間質へ遊離して脂肪細胞へ分化しているという、分化系を跨いだ分化過程 (Endothelial mesenchymal transformation: EMT) を経ているという説を提唱した²⁴⁾。更に彼らは遺伝子工学的な証明として、内皮細胞特異的なVEカドヘリンを用いたリニエージトレーシング実験を行い、

成熟脂肪細胞が分化過程で一度、内皮細胞特異的のマーカーを発現していることを証明した。今後長い間明らかでなかった脂肪細胞の幹細胞の起源・由来についての研究に、新たな扉を開くものと考えられる。

オミックス

オミックスと題したセッションでは、Dr. Christopher K. Glass (University of California, San Diego) が発表したリポドミックスを用いた核内受容体Liver X receptor (LXR) の内因性のリガンドの新たな知見の報告が興味深かった。LXRはコレステロール過剰の状態では活性化され、ABCA1などの排出系の促進、またIdolの活性化によるLDL受容体の分解により、細胞内のコレステロールのホメオスタシスを保つ。従来はLXRの内因性アゴニストとしてOxysterolが想定されていた。LDL受容体欠損マウスの肝臓のトランスクリプトーム解析では、SREBPの標的遺伝子が強く抑制、LXRの標的遺伝子が強く誘導されていた。LDL受容体欠損マウス(高脂肪食・高コレステロール食)でのリポドミックス解析を行ったところ、コレステロール経路では、4S OH-, 25 OH-, 27 OH-の各Oxysterolの量は変化しないのに対して、コレステロールの前駆体の一つであるDesmosterolが著明に増加していた。Desmosterolにはこれまで弱いLXRアゴニスト活性が報告されている。彼らはコレステロール過剰状態でDesmosterolからCholesterolへの変換酵素であるDhcr24の発現が著明に減少することを見出し、それに伴いDesmosterolが上昇、そしてLXRの標的遺伝子であるAbcalの発現が増加していた。これらのLXRの活性化メカニズムは、Oxysterolをコレステロールから合成する3つのhydroxylaseのトリプル欠損細胞でも消失しないことか

ら、コレステロール負荷時にLXRの内因性アゴニストとして働いているのはOxysterolよりもDesmosterolであることが示唆された。

エピジェネティクス

エピジェネティクスのセッションでは、今回のオーガナイザーの一人でもあるDr. Evan D. Rosen (Beth Israel Deaconess Medical Center), Dr. Mitchell A. Lazar (University of Pennsylvania), Dr. Susanne Mandrup (University of Southern Denmark) に加えて、私共が最近施行した脂肪細胞におけるFAIRE-seqを用いたオープンクロマチン解析²⁵⁾が採択され、ショートトークとして発表した。いずれも近年進歩している高速シーケンシング技術を用いて、転写因子結合やヒストン、クロマチンの修飾状態をゲノムワイドに解析する手法を用いて代謝臓器での分化・病態の解明を試みている。

Dr. Rosenはマウスとヒトの脂肪細胞で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な比較解析を行い、PPAR γ は標的遺伝子から遠位領域に多数結合しており、標的遺伝子の近傍に存在する個々の結合領域は予想外に保存されていないということを報告した²⁶⁾。またレプチン遺伝子の転写制御領域を多数のBACトランスジェニックマウスを用いて絞り込み同定し、エンハンサーマークとなるヒストンのアセチル化のChIP-seqによるゲノムワイド解析との組み合わせで責任領域を数百bpレベルまで絞り、DNA配列によるアフィニティー精製による結合蛋白を質量分析器で同定する手法で、脂肪細胞分化や肥満動物の脂肪組織で増加している転写因子Fosl2がレプチン遺伝子の転写を制御していることを示した²⁷⁾。ヒト肥満状態におけるエピゲノム変化を解析するため

に、肥満・正常ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いて、20以上継代してもインスリン抵抗性が維持されていることに着目し、これらの細胞を用いて現在ヒストンアセチル化などのChIP-seq解析に着手している進行中のプロジェクトを紹介した。

Dr. Lazarは、Cistromes and the Tissue-Specific Physiology of HDAC3と題して、サーカディアンリズムを司る核内受容体Rev-erb α のChIP-seq解析の結果を示した。Rev-erb α は発現レベルで大きな日内変動を繰り返しており、Rev-erb α に結合するコリプレッサー HDAC3のChIP-seqの解析から、この領域でヒストンのアセチル化が大きく日内変動を起こしていること、また、これらの結合領域の遺伝子が、Gene ontology解析から脂質代謝系のプロセスにリンクしていることを見出し、実際に肝臓におけるHDAC3組織特異的欠損マウスの解析で強力な脂肪肝を呈することから、Rev-erb α がHDAC3の肝臓の脂質代謝の日内変動に重要な役割を果たすことを示した²⁸⁾。

Dr. Mandrupは、脂肪細胞分化において、エンハンサーなどゲノム上の制御領域となりうるオープンクロマチン構造を検出するDNase hypersensitivity assayを行い、分化刺激4時間という早期の時期にオープンクロマチン領域が急増することを見出した。これらの領域は、分化刺激として用いられるDexamethasone, IBMX, Insulin (DMI)刺激の下流にあり、分化早期の制御因子である、グルココルチコイド受容体(GR), Stat5a, C/EBP β, δ が結合していること、特にこれらの複数の因子が同じ領域に集合して結合する“hot spot”と呼ぶ領域が存在し、そのうちの一部は分化後期に重要な転写因子PPAR γ やC/EBP α に置き換わるというモデルを示した²⁹⁾。

私共は、脂肪細胞分化においてエンハンサーなどゲノム上の制御領域となりうるオープンクロマチン領域を検出するFAIRE-seqを行い、非プロモーターFAIRE領域はプロモーターFAIRE領域と比較して分化や細胞種により非常にダイナミックに変化しており、分化・細胞特異的な転写制御に重要な役割を果たすことを示した²⁵⁾。これらの領域はコンベンショナルなレポーター解析の対象となる近位プロモーターには10%以下しか存在せず、大部分の分化・細胞特異的なオープンクロマチン領域はイントロンや遺伝子間など多様な領域に存在していた。C/EBP α やAdipoR2などこれまで脂肪細胞分化・PPAR γ により転写制御を受けるものの既存の方法では検出できなかった転写制御領域を、転写開始点下流のイントロンに複数同定した。特定のDNA配列にどのような転写因子の結合モチーフが濃縮しているか検出するモチーフ解析と、既存の転写因子の知識を必要としないFAIRE-seq解析との組合せは、脂肪細胞分化に特異的な転写制御因子のunbiasedな解析および新規制御因子の同定に有効である。既知因子であるPPAR γ , C/EBP α やZfp423などの結合モチーフが上位を占める中、これまで脂肪細胞分化でその機能が知られていない転写因子NFIの結合モチーフが脂肪細胞特異的なオープンクロマチン領域に濃縮していた。NFIAの過剰発現細胞では脂肪細胞分化誘導前からPPAR γ やC/EBP α , 下流のaP2の著明な発現上昇、および顕微鏡下での脂肪滴蓄積を認めた。一方、NFIAやNFIBのノックダウンでは脂肪細胞分化が有意に抑制されることから生理的な役割が示唆され²⁵⁾、このアプローチが新たな制御因子の同定に有用であることを報告した。

終わりに

以上、Keystone Symposiaにおけるハイライトをまとめた。興味深い知見や新しい技術や概念が数多く報告されたミーティングであった。今回はKeystone Symposiaで初めての口演となり、会場では下村伊一郎先生、細田公則先生、篁俊成先生をはじめとして多くの日本人の先生方、またUCLAの元同僚にサポートいただいて無事に発表を済ませる事が出来ました。東京大学の門脇孝先生、油谷浩幸先生、山内敏正先生、酒井寿郎先生、植木浩二郎先生にはご指導を賜り、中村正裕先生、若林賢一先生ほか多数の先生方には共同実験者としてご協力頂きました。この場をかりて深く御礼申し上げます。



図3 会場にて。

向かって左よりSusanne Mandrup先生、著者、Mitchell Lazar先生。

参 照

- 1) <https://www.kestonesymposia.org/Meetings/ViewMeetings.cfm?MeetingID=1171>.
- 2) Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, et al.: From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. Nature 2010, 466: 714-719.
- 3) Kjolby M, Andersen OM, Breiderhoff T, et al.: Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. Cell Metab 2010, 12:

- 213-223.
- 4) Lusis AJ : Life after GWAS : functional genomics in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012, **32** : 169.
 - 5) Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. : Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011, **12** : 745-755.
 - 6) Bochukova E, Schoenmakers N, Agostini M, et al. : A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *N Engl J Med* 2012, **366** : 243-249.
 - 7) Cannon B, Nedergaard J : Yes, even human brown fat is on fire! *J Clin Invest* 2012, **122** : 486-489.
 - 8) Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. : Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009, **360** : 1518-1525.
 - 9) Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, et al. : Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009, **360** : 1500-1508.
 - 10) Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al. : High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 2009, **58** : 1526-1531.
 - 11) Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, et al. : New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 2008, **454** : 1000-1004.
 - 12) Seale P, Bjork B, Yang W, et al. : PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008, **454** : 961-967.
 - 13) Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. : A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012, **481** : 463-468.
 - 14) Potthoff MJ, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ : Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes Dev* 2012, **26** : 312-324.
 - 15) Hondares E, Iglesias R, Giral A, et al. : Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 2011, **286** : 12983-12990.
 - 16) Chartoumpakis DV, Habeos IG, Ziros PG, et al. : Brown adipose tissue responds to cold and adrenergic stimulation by induction of FGF21. *Mol Med* 2011, **17** : 736-740.
 - 17) Fisher FM, Kleiner S, Douris N, et al. : FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* 2012, **26** : 271-281.
 - 18) Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, et al. : Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 2012, **148** : 556-567.
 - 19) Wei W, Dutchak PA, Wang X, et al. : Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, **109** : 3143-3148.
 - 20) Tang W, Zeve D, Suh JM, et al. : White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 2008, **322** : 583-586.
 - 21) Gupta RK, Arany Z, Seale P, et al. : Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* 2010, **464** : 619-623.
 - 22) Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, et al. : Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab* 2012, **15** : 230-239.
 - 23) Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. : Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005, **46** : 2347-2355.
 - 24) Tran KV, Gealekman O, Frontini A, et al. : The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells. *Cell Metab* 2012, **15** : 222-229.
 - 25) Waki H, Nakamura M, Yamauchi T, et al. : Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet* 2011, **7** : e1002311.
 - 26) Mikkelsen TS, Xu Z, Zhang X, et al. : Comparative epigenomic analysis of murine and human adipogenesis. *Cell* 2010, **143** : 156-169.
 - 27) Wrann CD, Eguchi J, Bozec A, et al. : FOSL2 promotes leptin gene expression in human and mouse adipocytes. *J Clin Invest* 2012, **122** : 1010-1021.
 - 28) Sun Z, Feng D, Everett LJ, et al. : Circadian Epigenomic Remodeling and Hepatic Lipogenesis: Lessons from HDAC3. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011. Epub ahead of print (in press), PubMed ID 21900149.
 - 29) Siersbæk R, Nielsen R, John S, et al. : Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor 'hotspots' during early adipogenesis. *Embo J* 2011, **30** : 1459-1472.

特集

膵β細胞の発生生物学と再生医療への応用

Wntシグナルと膵内分泌細胞分化*

高本偉碩**

Key Words : canonical Wnt pathway, Frizzled, low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5), β catenin, T cell factor (Tcf) 712

はじめに

Wntシグナルは、Wntが細胞に作用することにより活性化される細胞内シグナルを指し、リガンドのWntが受容体のFrizzledに結合することから始まる^{1)~3)}。リガンドのWntは分子量約4万の分泌蛋白質でファミリーを形成しており、ヒトやマウスでは19種類が知られている。また、受容体である7回膜貫通型蛋白質のFrizzled (Fzd) もファミリーを形成しており、ヒトやマウスでは10種類が知られている。これに加えて、1回膜貫通型のlow density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) やLRP6などが共役受容体として知られている。なお、Wntの名前はショウジョウバエの分節遺伝子Wingless (Wg) とマウス乳癌ウイルスが誘導する遺伝子int-1に由来する (Wingless+int \rightarrow Wnt)。

Wntシグナルは生物種を超えて保存され、初期発生や器官形成、細胞の分化・増殖などを制御することが知られている。Wntシグナルには複数の情報伝達経路がある。最もよく知られているものが、 β カテニン (β catenin) を介して遺伝子発現を制御する β カテニン依存性の情報伝達経

路であり、canonical Wnt pathway (古典的Wnt経路) と呼ばれている。これのほかに、平面内細胞極性 (planar cell polarity ; PCP) を制御するPCP経路と、細胞内Ca²⁺動員を促進するCa²⁺経路などが存在し、これら β カテニン非依存性の情報伝達経路はまとめてnon-canonical Wnt pathway (非古典的Wnt経路) と呼ばれることもある。

β カテニンはカドヘリン結合蛋白質として同定され、細胞接着に重要な働きを有するが、Wntシグナルのメディエーターとしても作用する。Wntが受容体に結合すると、細胞質にある β カテニンは核内に移行し、転写因子であるT cell factor/lymphocyte enhancing factor (Tcf/Lef) ファミリー蛋白質と核内で複合体を形成して、サイクリンD1, c-Mycなどのターゲット遺伝子の発現を誘導し、細胞の分化・増殖を制御すると考えられている。

2006年、Tcfファミリーの一つであるTcf712が2型糖尿病疾患感受性遺伝子であると報告された⁴⁾。その結果は日本人においても追試されている⁵⁾。Tcf712はWntシグナルの一翼を担う転写因子であり、消化管の形成や大腸癌の発生に重要な役割を果たすことが知られていたが、糖代謝との関連に注目した検討はほとんどなかったため、この発見は驚きをもって迎えられた。また同時に、Wntシグナルと膵内分泌細胞の発生・分化や機能の関連について、注目が高まるきっか

* Wnt signaling pathway and development of pancreatic endocrine cell.

** Iseki TAKAMOTO, M.D., Ph.D.: 東京大学大学院医学系研究科糖尿病・代謝内科 [〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1]; Department of Diabetes and Metabolic Diseases, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113-8655, JAPAN

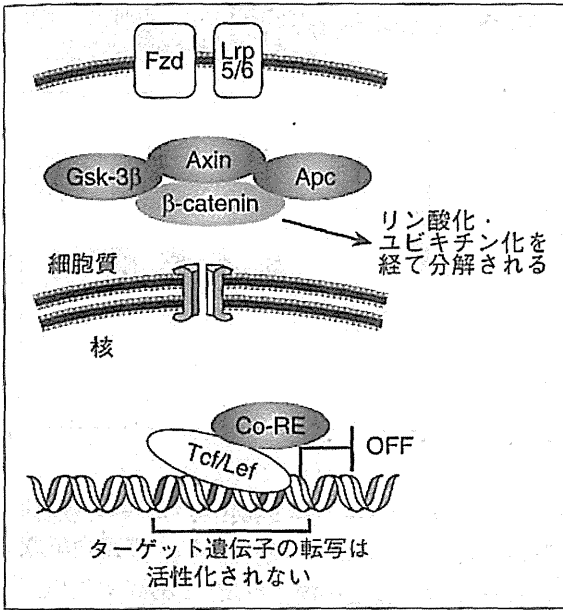


図1 Wntシグナル非刺激時の模式図
(文献⁶⁾より引用改変)

けとなった。

本稿では、Wntシグナルと膵内分泌細胞分化に関して、canonical Wnt pathwayを概説した上で、鍵分子に関する遺伝子改変マウスの表現型を紹介する。

Canonical Wnt pathwayの概要

Wntシグナル非刺激時には、細胞質内のβカテニン量は低いレベルに保たれている¹¹⁻³¹。これは、βカテニンがadenomatous polyposis coli (APC)、グリコーゲン合成酵素リン酸化酵素3β (glycogen synthase kinase 3β; GSK-3β)とともにAxinに結合し、このAxin複合体中でカゼインキナーゼ1α(casein kinase 1α; CK1α)とGSK-3βによるリン酸化とそれに伴うユビキチン化を受けて、最終的にはプロテアソームにより分解されるためである。また、Tcfファミリー蛋白質はターゲット遺伝子のプロモーターに結合しているものの、コリプレッサー(Co-RE:具体的にはGrouchoやCtBP)を誘導してターゲット遺伝子の転写を抑制していると考えられる(図1)。

一方で、Wntが受容体(FrizzledとLRP 5/6)に結合して刺激が入ると、dishevelled(Dvl)が活性化し、Axin複合体を破壊する。これによりβカテニンのリン酸化・ユビキチン化が抑制され、

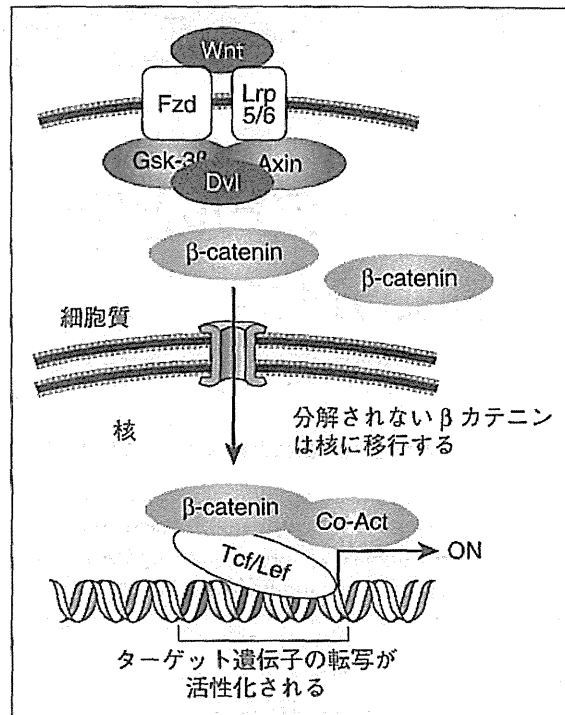


図2 Wntシグナル刺激時の模式図
(文献⁶⁾より引用改変)

細胞質内で安定型βカテニンが増加して、βカテニンが核内に移行するようになる。そして、βカテニンがTcfファミリー蛋白質と結合すると、コアクチベーター(Co-Act:具体的にはCBPやPygoなどを誘導してターゲット遺伝子の転写を活性化すると考えられる(図2)。

TcfファミリーにはTcf1, Lef1, Tcf711(=Tcf3)ならびにTcf712(=Tcf4)が含まれる⁶⁷⁾。いずれも、high-mobility group(HMG) boxと呼ばれるDNA結合ドメインと、N末端のβカテニン結合ドメインを有する(図3)。また、N末端のβカテニン結合ドメインを欠失したTcfファミリー蛋白質はDNAには結合するもののβカテニンとは結合できず転写活性化能を有さないため、dominant negative formとして作用していると考えられている(図4)。Tcf1, Lef1については以前よりdominant negative formの存在が知られていたが、Tcf712に関しても最近、内因性のdominant negative formが中枢神経系の発生の過程で発現し、重要な役割を果たしていることが報告されている⁷¹⁻⁹⁾。

以下、canonical Wnt pathwayにおいて鍵分子となるリガンドと受容体、βカテニンそしてTcf712

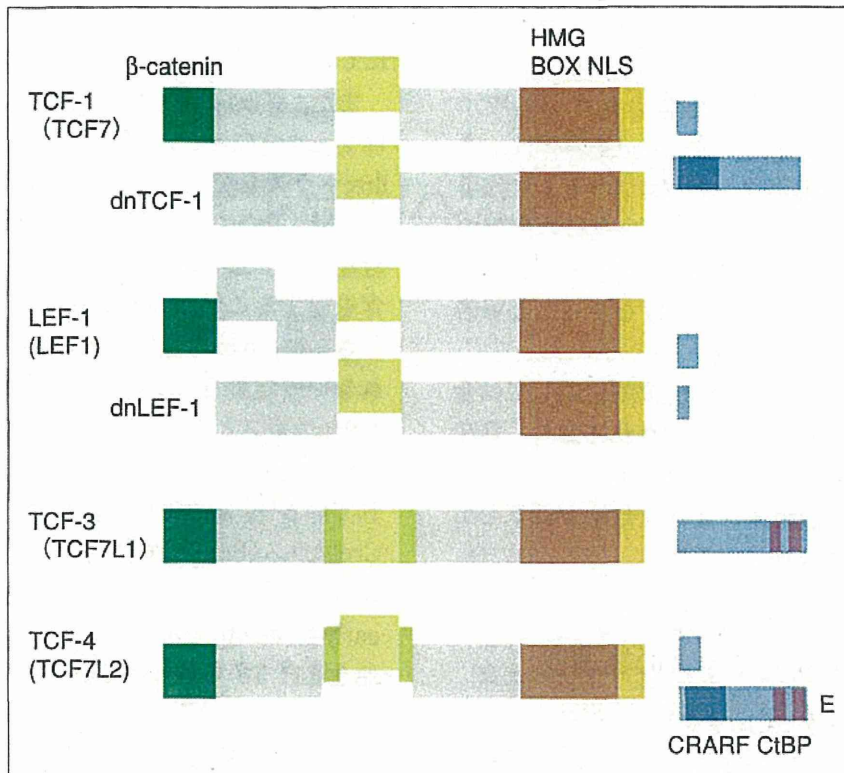


図3 Tcf/Lefファミリーの模式図

β-catenin-binding : β カテニン結合ドメイン, HMG BOX : high-mobility group DNA 結合ドメイン, NLS : nuclear localization signal(核内局在シグナル), dn : dominant negative form (文献⁷⁾より引用改変)

それぞれに関して、遺伝子改変マウスで認められた膵臓や膵内分泌細胞の表現型について述べる。

リガンドと受容体に関する
遺伝子改変マウスの表現型

膵臓・膵内分泌細胞の発生・分化の過程においては、複数のWntシグナルのリガンド(Wnt2b, 4, 5a, 7b, 11など)と受容体(Frizzled2~9など)が発現していると報告されている¹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

膵臓の発生の過程において、Pdx1プロモーターを用いてWntシグナルのリガンドを過剰発現させたマウスの表現型が報告されている。Wnt1を過剰発現させた場合(Pdx1-Wnt1-Tg)には膵臓の無形成が観察され、Wnt5aを過剰発現させた場合(Pdx1-Wnt5a-Tg)には膵臓の低形成が観察されたと報告されている¹⁰⁾。したがって、胎生早期の過剰なWntシグナルは膵臓の発生を抑制する方向に作用すると考えられる。

逆に、Pdx1プロモーターを用いて dominant

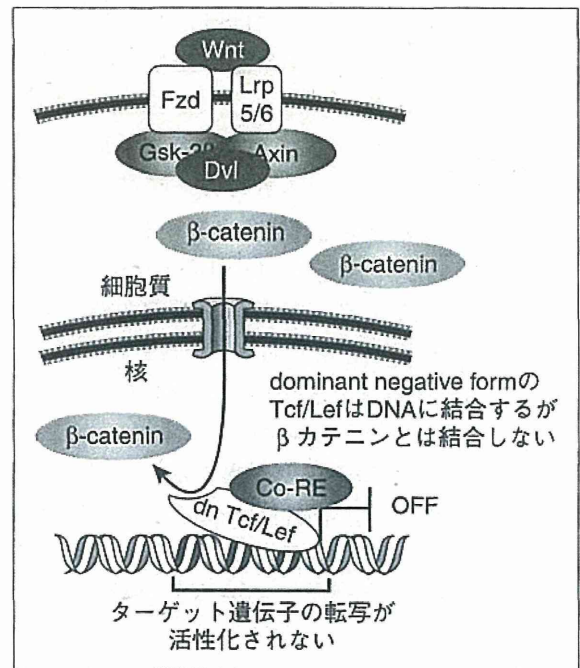


図4 Dominant negative formのTcf/Lefが存在する場合の模式図 (文献⁸⁾より引用改変)

negative formのFrizzled受容体(Frz8CRD)を過剰発現させ、Wntシグナルを遮断したマウス(Pdx1-Frz8CRD-Tg)の表現型が報告されている¹²⁾。Dominant negative formのFrizzled受容体は、内因性のWntシグナルのアンタゴニストとして作用する。本マウスでは、胎生期・出生後の膵臓の低形成が認められたが、成体の耐糖能は正常で、膵内分泌細胞には大きな異常はなかったと報告されている。

一方で、共役受容体であるLRP5に関しては全身欠損マウス(LRP5^{-/-})が作製されており、興味深いことに膵島の大きさには変化がないものの、グルコース応答性のインスリン分泌が低下していることが報告されている¹³⁾。

β カテニンに関する 遺伝子改変マウスの表現型

Pdx1プロモーターCreマウス(Pdx1-Cre)とβカテニンのfloxマウスを交配して、膵臓でβカテニンを欠損させたマウス(Pdx1-βcat-cKO)が複数の研究室で独立して作製・解析されているが、必ずしも表現型は一致していない。

Grapin-Botton AらのPdx1-βcat-cKOマウスでは、膵臓全体の大きさにはほとんど変化がないものの膵炎様の所見を呈しており、膵島が小さいと報告されている¹⁴⁾。一方で、Melton DAらのPdx1-βcat-cKOマウスでは、膵臓が低形成で膵外分泌細胞が減っているものの、膵島は正常で耐糖能に異常はないと報告されている¹⁵⁾。これと類似して、Lowy AMらのPdx1-βcat-cKOマウスでは、膵臓が低形成で膵外分泌細胞が減っているものの、膵島は正常であると報告されている¹⁶⁾。これらのマウスで表現型が一致しない理由として、使用するPdx-Creマウスによって、Creが発現する時期や発現効率が異なることが推定される。つい最近、Bernal-Mizrachi EらのPdx1-βcat-cKOマウスでは、膵臓重量が少ないだけでなく膵β細胞量も少なく、通常食では耐糖能異常を呈すること、そして驚くべきことに高脂肪食ではむしろ耐糖能がよいと報告されている¹⁷⁾。その理由として、使用したPdx1-Creマウスは膵臓だけではなく視床下部でもCreが異所性発現しており、Pdx1-βcat-cKOマウスは活動量が多く肥満抵

抗性で、インスリン感受性であることがあげられている。

また、Pdx1-CreマウスではなくインスリンプロモーターCreマウス(RIP-Cre)とβカテニンのfloxマウスを交配して、膵β細胞でβカテニンを欠損させたマウス(RIP-βcat-cKO)では、膵β細胞量が減少しており、成体では軽度の耐糖能異常を呈することが報告されている¹⁸⁾。

さらに、exon3を欠失させることでリン酸化されない安定型βカテニンを発現することが可能なfloxマウスとPdx1-Creマウスを交配して、膵臓で安定型βカテニンを発現するマウスが作製されている¹¹⁾。胎生E10.5からCreを発現するPdx1-Creマウス(Pdx1-Cre-early)を使用し、胎生E10.5から安定型βカテニンが発現し続けるマウス(Pdx1-early-βcat-active)では膵臓の無形成が観察され、胎生E11.5からCreを発現するPdx1-Creマウス(Pdx1-Cre-late)を使用し、胎生E11.5から安定βカテニンが発現し続けるマウス(Pdx1-late-βcat-active)では逆に膵外分泌細胞の増殖による膵臓の大型化が観察され、成体において耐糖能に異常はないと報告されている。

以上のように、Wntシグナルのリガンドと受容体やβカテニンの遺伝子改変マウスの表現型からは統一的な結論は得難い状況にあるが、発生早期の過剰なWntシグナルは膵臓の発生に対して抑制的に作用することは確実であると考えられる。また、胎生期を通じたWntシグナルの低下は、膵外分泌細胞の分化・増殖に対して抑制的に働き、膵内分泌細胞の分化・増殖に対しても抑制的に働く可能性があると考えられる。

Tcf7l2に関する 遺伝子改変マウスの表現型

Tcfファミリー蛋白質はβカテニンと結合して複合体を形成し、ターゲット遺伝子の発現を制御する。2型糖尿病疾患感受性遺伝子であるTcf7l2の遺伝子改変マウスに関しては、膵内分泌細胞や糖代謝に着目した解析について複数の報告がある。DNA結合ドメインであるHMG boxをコードするエクソンにhygromycin resistance geneを挿入する方法で作製した全身のTcf7l2欠損マウス(Tcf7l2^{-/-})は、小腸のcrypt stem cellsに異常があ