



Diet-Induced Up-Regulation of Gene Expression in Adipocytes Without Changes in DNA Methylation

Okada, Yuko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2012-12-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4650

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004650>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 岡田 裕子
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4650 号
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Diet-Induced Up-Regulation of Gene Expression in Adipocytes Without Changes in DNA Methylation(肥満関連遺伝子の発現制御における DNA メチル化の意義の検討)

審 査 委 員

主 査 教 授 片岡 徹
教 授 饗場 篤
教 授 南 康博

肥満は 2 型糖尿病や動脈硬化性疾患などの生活習慣病の発症基盤となるが、肥満時にみられる脂肪組織の増大は、脂肪細胞の数の増加および脂肪細胞のサイズの肥大により引き起こされる。後者の脂肪細胞肥大による肥満は、肥大化した脂肪組織における遺伝子発現変化により様々な代謝異常を引き起こす。肥満時の脂肪細胞における遺伝子発現プロファイルについては DNA マイクロアレイを用いて様々な検討がなされてきたが、それらの遺伝子発現の制御機構は必ずしも明らかでない。エピジェネティックな DNA およびヒストン修飾における DNA のメチレーション機構は細胞の成長および発がんの両者において重要な役割を担っているが、肥満関連の遺伝子発現の制御機構については未だ不明な点も多い。今回肥満関連遺伝子の発現において DNA のメチル化によるエピジェネティックな制御機構が関与するか検討した。

5 週齢より高脂肪食を給餌した C57BL/6 マウスにおける脂肪組織重量、脂肪細胞のサイズについて検討を行った。16 週齢以降の高脂肪食給餌マウスでは、通常食給餌マウスに比して有意な体重及び副睾丸周囲脂肪組織重量の増加を認めた。また高脂肪食給餌マウスでは 16 週齢以降の副睾丸脂肪組織の脂肪細胞のサイズの著明な増大を認めた。脂肪細胞のサイズと関連する因子を明らかにするために、C57Bl/6J マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現のプロファイルについて解析を行った。すなわち、高脂肪食給餌マウスと通常食給餌マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現の変化を、DNA マイクロアレイを用いて解析したところ 16 週齢以降の食餌誘導性の肥満マウスの脂肪組織においては通常食給餌マウスと比較して 617 遺伝子の発現が増強し、476 遺伝子の発現抑制が認められた。更に、これらの増加遺伝子のうちリアルタイム RT-PCR 法によりレプチン、Mest/Peg1 (mesoderm specific transcript/paternally expressed gene 1)、及び sFRP5 (secreted frizzled-related protein 5)を含めた遺伝子発現が肥満マウスの脂肪組織で著明に増強していることが確認された。

レプチン、Mest/Peg1 及び sFRP5 遺伝子発現は転写領域の DNA メチル化によって制御されることから、脱メチル化剤の影響を検討した。3T3-L1 培養脂肪細胞に脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-C)を 2, 4, 6 日間投与し、それぞれのサンプルにつき RT-PCR 法を用いてレプチン、Mest/Peg1 及び sFRP5 が誘導されるか検討した。0.5 μ M および 5 μ M の 5-aza-C 投与により Mest/Peg1 の mRNA 発現は増加し、4 日間の投与で最大の増加を認めた。しかし、レプチンの発現量には変化なく、sFRP5 の mRNA 発現は 3T3-L1 培養脂肪細胞では検出されなかった。この結果より、Mest/Peg1 発現は脂肪細胞において DNA メチル化により制御されている可能性が考えられた。

肥満誘導マウスの白色脂肪組織におけるレプチン、sFRP5 および Mest/Peg1 遺伝子の発現における DNA メチル化による制御の関与を検討するために、各々のプロモーター領域近傍の CpG アイランドのメチル化状態について、MALDI-TOF による質量分析にて解析した。まず、Mest/Peg1 遺伝子のプロモーター領域である、転写開始点より -175 から +92 までの 15 CpG サイトにおける DNA メチル化の状態は、高脂肪食による影響を受けないことが明らかとなった。また、レプチン、sFRP5 においても同様に、転写開始点近傍に存在する CpG アイラン

ドのメチル化の程度は、高脂肪食給餌にても変化を誘導しなかった。これらの結果より、少なくとも高脂肪食給餌による Peg1/Mest、sFRP5、レプチンの発現制御に関しては、DNA メチルによるエピジェネティックな制御機構の関与は少ないと考えられた。

脂肪細胞の肥大化に伴って発現増加を認める肥満関連遺伝子としてのレプチン、Mest/Peg1 及び sFRP5 の発現制御に関しては、少なくとも転写開始点近傍の DNA メチル化と関連はほとんどないことが今回示された。メチル化の程度は、遺伝的なジーンサイレンシング機構と深く関連してしており、CpG アイランドが完全にメチル化をうけている不活化 X 染色体や、インプリンティング遺伝子などが挙げられる。Mest/Peg1 は父親由来の DNA アレルからのみ発現するインプリンティング遺伝子のひとつである。培養脂肪細胞において脱メチル化剤である 5-aza-C 処理を行うと Mest/Peg1 の mRNA 発現増加を認めたことからメチル化による制御を受けている可能性が考えられたが、肥満誘導時の Mest/Peg1 プロモーター領域のメチル化状態には変化を認めなかった。一方、レプチンや sFRP5 のメチル化状態は、前述のインプリンティング遺伝子などの親由来のメチル化状態とは異なっている。たとえばレプチンは 3T3-L1 培養脂肪細胞においてもヒトの脂肪細胞においても、前駆脂肪細胞の状態では高度にメチル化されているが脂肪細胞の分化に伴って脱メチル化されることが報告されている。更に、3T3-L1 脂肪細胞及びマウスの脂肪組織のレプチンのプロモーター領域のメチル化状態を比べると、マウスの脂肪組織においてはより脱メチル化されていることがわかった。これらの事実より、脂肪細胞分化や肥大時のレプチンの発現が DNA メチル化による制御を受けている可能性が考えられたが、高脂肪食給餌マウスの脂肪組織においてレプチンおよび sFRP5 のメチル化の程度にも変化を認めなかった。従って肥満誘導時のレプチンおよび sFRP5 の発現増加は DNA メチル化による制御を受けていないことが明らかとなった。しかし脂肪細胞肥大と関連する遺伝子発現には、DNA メチル化と異なるヒストンのアセチル化やメチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化や異性化などの他のエピジェネティックな制御が関わっているかもしれない。このようなヒストンの翻訳後修飾による制御との関連についても今後検討されることが望まれる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1986号	氏 名	岡田 裕子
論文題目 Title of Dissertation	Diet-induced up-regulation of gene expression in adipocytes without changes in DNA methylation (肥満関連遺伝子の発現制御における DNA メチル化の意義の検討)		
審査委員 Examiner	主 査 片岡 徹 Chief Examiner 副 査 南 康博 Vice-examiner 副 査 饗場 篤 Vice-examiner		
審査終了日	平成21年 2月 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

肥満は2型糖尿病や動脈硬化性疾患などの生活習慣病の発症基盤となるが、肥満時にみられる脂肪組織の増大は、脂肪細胞の数の増加および脂肪細胞のサイズの肥大により引き起こされる。後者の脂肪細胞肥大による肥満は、肥大化した脂肪組織における遺伝子発現変化により様々な代謝異常を引き起こす。エピジェネティックな DNA およびヒストン修飾における DNA のメチレーション機構は、細胞の成長および発がんの両者において重要な役割を担っていることがわかっている。本研究では、肥満関連遺伝子の発現において DNA のメチル化によるエピジェネティックな制御機構が関与するか検討した。

5週齢より高脂肪食を給餌した C57BL/6 マウスでは、16週齢以降に、通常食給餌マウスに比して有意な体重及び副睾丸周囲脂肪組織重量の増加、また脂肪細胞の著明なサイズ増大が認められた。本研究者は、脂肪細胞のサイズと関連する因子を明らかにするために、高脂肪食給餌マウスと通常食給餌マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現の変化を、DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、16週齢以降の食餌誘導性の肥満マウスの脂肪組織においては通常食給餌マウスに比較して617遺伝子の発現が増強し、476遺伝子の発現抑制が認められた。更に、これらの増加遺伝子のうちリアルタイム RT-PCR 法によりレプチン、Mest/Peg1 (mesoderm specific transcript paternally expressed gene 1)、及び sFRP5 (secreted frizzled-related protein 5) を含めた遺伝子発現が肥満マウスの脂肪組織で著明に増強していることが確認された。

レプチン、Mest/Peg1 及び sFRP5 遺伝子発現は転写領域の DNA メチル化によって制御されることから、脱メチル化剤の影響を検討した。3T3-L1 培養脂肪細胞に脱メチル化剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-C) を 2, 4, 6 日間投与し、それぞれのサンプルにつき RT-PCR 法を用いてレプチン、Mest/Peg1 及び sFRP5 が誘導されるか検討した。5-aza-C 投与により Mest/Peg1 の mRNA 発現は増加したが、レプチンの発現量には変化なく、sFRP5 の mRNA 発現は 3T3-L1 培養脂肪細胞では検出されなかった。この結果より、Mest/Peg1 発現は脂肪細胞において DNA メチル化により制御されている可能性が考えられた。

さらに、本研究者は、肥満誘導マウスの白色脂肪組織におけるレプチン、sFRP5 および Mest/Peg1 遺伝子の発現における DNA メチル化による制御の関与を検討するために、各々のプロモーター領域近傍の CpG アイランドのメチル化状態について、MALDI-TOF による質量分析にて解析した。Mest/Peg1、レプチン及び sFRP5 遺伝子の転写開始点近傍に存在する CpG アイランドにおける DNA メチル化の状態は、高脂肪食による影響を受けないことが明らかとなった。これらの結果より、高脂肪食給餌による脂肪細胞の肥大化に伴って発現増加を認める肥満関連遺伝子としてのレプチン、Mest/Peg1 及び sFRP5 の発現制御に関しては、少なくとも転写開始点近傍の DNA メチル化と関連はほとんどないことが示された。しかし、脂肪細胞肥大と関連する遺伝子発現には、DNA メチル化と異なるヒストンの翻訳後修飾などの他のエピジェネティックな制御が関わっている可能性があり、この検討が今後の課題とされた。

本研究は、肥満時にみられる脂肪組織の増大について、それに伴う肥満関連遺伝子の発現制御機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった DNA メチル化によるエピジェネティックな制御機構の関与の度合いについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。