

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 平池 勇雄

褐色脂肪組織はミトコンドリアにおける **Uncoupling protein-1 (UCP1)**の作用を介して熱を産生しエネルギーを消費する点に特徴があり、一般にエネルギーの貯蔵を担う白色脂肪組織とは対照的な組織である。本研究は肥満症、メタボリックシンドローム、肥満2型糖尿病の新規治療標的として期待されている褐色脂肪組織について、ゲノムワイドなオープンクロマチン解析とモチーフ解析によって新規制御因子 **Nuclear factor I-A (NFIA)**を同定しその作用メカニズムを解析したものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス褐色脂肪組織、内臓白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織に対して **Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements coupled with high-throughput sequencing (FAIRE-seq)**を実施し、ゲノム上のオープンクロマチン領域を網羅的に同定した。褐色脂肪組織特異的なオープンクロマチン領域のモチーフ解析を実施したところ、**NFI** 転写因子ファミリーの結合モチーフが最も強く濃縮していた。**RNA** 及び蛋白の発現を確認すると、各アイソフォームのうち **NFIA** のみが骨格筋や白色脂肪組織と比較して褐色脂肪組織において高発現していた。
2. 褐色脂肪組織と骨格筋は同一の前駆細胞から分化するという報告を踏まえ、**C2C12**筋芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて **NFIA** を導入したところ脂肪滴の蓄積を認めた。遺伝子発現については脂肪細胞分化のマスター転写因子 **Pparg**や褐色脂肪遺伝子 **Ucp1**、**Cidea** の誘導を認めた一方、**Myod1**をはじめとする骨格筋遺伝子は抑制された。**RNA-seq**を用いた網羅的遺伝子発現解析においても、褐色脂肪遺伝子の多くが **NFIA** の導入で誘導された一方、骨格筋遺伝子の多くは抑制された。また褐色脂肪細胞において **shRNA** を用いて **NFIA** をノックダウンしたところ脂肪細胞分化の程度は保たれていたが、**Ucp1**を含む褐色脂肪遺伝子は有意に抑制された。
3. **NFI** の **Chromatin immunoprecipitation coupled with high-throughput sequencing (ChIP-seq)**を施行すると、**Ucp1**や **Cidea** のエンハンサー領域に結合ピークを認めた。**NFI** は脂肪細胞分化のマスター転写因子である **PPAR γ** と褐色脂肪遺伝子エンハンサーで高頻度に共局在(**co-localize**)しており、かつ分化の過程において **PPAR γ** に先行して結合していた。ゲノムワイド解析では、分化後に **NFI** と **PPAR γ** が共局在する領域の半数以上において、分化前の時点で **NFI** が先行して結合していた。その結果オープンクロマチン構造の形成及び標的遺伝子の発現が促進された。

4. NFIA ノックアウトマウスは中枢神経系の表現型によって出生後すぐに死亡するため、新生児の褐色脂肪組織を採取して解析した。ノックアウトマウスの褐色脂肪組織では野生型に比べて UCP1 の遺伝子発現、蛋白発現が低下していた。PPAR γ の発現は低下していないにもかかわらず、*Ucp1* エンハンサーへの PPAR γ の結合は失われていた。RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析では褐色脂肪遺伝子の低下と骨格筋遺伝子の上昇が確認された。

5. 褐色細胞腫及び非機能性副腎腫瘍の患者から腎周囲の褐色脂肪組織を採取し解析したところ、褐色細胞腫患者の検体では *UCP1* など褐色脂肪遺伝子と *NFIA* の発現が共に上昇しており、褐色脂肪遺伝子の発現と *NFIA* の発現は正に相関していた。

審査後、下記の修正を行った。

1. FAIRE-seq や ChIP-seq を始めとする実験の方法について、記載を拡充した
2. 本研究が肥満症、メタボリックシンドローム、肥満 2 型糖尿病の治療に貢献し得る可能性について、記載を拡充した。

以上、本論文ではマウス褐色脂肪組織のゲノムワイドなオープンクロマチン解析とモチーフ解析によって褐色脂肪組織の新規制御因子 *NFIA* を同定した。*NFIA* と脂肪細胞分化のマスター転写因子 PPAR γ は褐色脂肪遺伝子エンハンサーにおいて高頻度に高局在し、かつ *NFIA* は PPAR γ に先行してエンハンサーに結合し PPAR γ の結合、オープンクロマチン構造の形成、標的遺伝子の発現を促進した。

現状、肥満症の治療は食事療法や運動療法といった患者自身の努力に依存する程度が非常に大きい。食欲抑制や脂肪吸収の抑制を意図した薬剤は存在するが、副作用の懸念等から実臨床で十分に活用されてはいない。高度肥満症の患者については外科治療が有望な選択肢として挙げられるが、すべての患者に適応可能な治療法とは言い難い。また、上に述べた薬物治療、外科治療がすべて「エネルギー摂取を抑制する」ことで効果をもたらす一方、褐色脂肪組織の数を増やす、ないし働きを強める治療が可能になれば「エネルギー消費を促す」という全く新しい考え方に基づく治療となる。

本研究は褐色脂肪組織の分化メカニズムの理解、及び褐色脂肪組織を標的とした肥満症の治療を目指す上で重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値すると考えられる。