

# 食環境による視床下部摂食調節ニューロンの エピジェネティクス調節の変調と肥満の発症

河野大輔

自治医科大学医学部生理学講座 特命助教

(現 群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット 助教)

## 緒言

肥満は近年、世界の多くの地域で急速に増加しており、生活習慣病の増加の原因となっている。近年の肥満の増加の原因はいまだ不明な点が多いが、遺伝子の変化では説明がつかないほど急速に起きていることや、同時期に食事の高脂肪食化や身体活動の低下などの環境の変化も起きていることなどから、主に環境要因が原因になって起こっていると考えられている。

生体の環境応答機構にエピジェネティクスがある。エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列の変化を伴わない後天的な遺伝子の修飾機構のことであり、DNAのメチル化やヒストンの修飾が代表的なものである。最近の研究により、DNAのメチル化が環境要因による肥満の発症に関与していることが明らかになってきた。環境要因によって引き起こされる肥満のひとつとして、胎児期の環境に由来する肥満が知られている。胎児期や出生後間もない時期に低栄養状態や偏った栄養状態にさらされると、将来、肥満や生活習慣病になるリスクが高くなることが疫学研究や動物実験により明らかにされている<sup>1-3)</sup>。胎児期や出生後間もない時期はDNAのメチル化修飾が作られる時期でもあるため、環境要因の影響を受けて作られたDNAのメチル化修飾が将来の遺伝子発現パターンに影響を与え、肥満を発症するリスクを高めているのではないかと推測されている。

DNAのメチル化が成長と肥満と関係していることを推測させるいくつかの報告がある。ミツバチは、働き蜂も女王蜂も遺伝子構成は同じであるがロイヤルゼリーを与えられた幼虫のみが女王蜂になり体も大きくなる。興味深いことに、DNAメチル化酵素、Dnmt3をノックダウンしたミツバチはローヤルゼリーを与えなくても女王蜂になり、体も大きくなる<sup>4)</sup>。したがって、Dnmt3によるDNAメチル化がミツバチの食事依存的な成長に関与していると考えられる。さらにヒトにおいてもDNAメ

チル化は成長と関係している。ヒトにおける過成長症候群の患者がDNAメチル化酵素、Dnmt3a遺伝子に変異を持つことが最近、報告されている<sup>5)</sup>。これらのことから、DNAメチル化が成長に関与していることが明らかであり、成長と類似点の多い肥満とも関係している可能性がある。

そこで我々は、DNAメチル化酵素の肥満発症における役割を検討した。体重の調節には、食欲や熱産生を調節することで全身のエネルギーバランスを制御している視床下部摂食代謝中枢が重要な働きをしている。そこで視床下部摂食代謝中枢におけるDNAメチル化酵素と肥満との関係について検討した。

## 実験方法

### 1. 高脂肪食負荷マウスの作成とDNAメチル化酵素の発現レベルの解析

4週齢のC57B6マウスに普通食(4%脂肪食)または高脂肪食(42%脂肪食)を与え、10週齢で視床下部室傍核、弓状核、腹内側核を採取した。定量PCR法を用いてDnmt1、Dnmt3b、Dnmt3aのmRNAの発現レベルを調べた。

### 2. 視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスの表現型の解析

Dnmt3a floxマウス<sup>6,7)</sup>と、主に視床下部室傍核にCreを発現するSim1-Creマウス<sup>8)</sup>を掛け合わせ、視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウス(Dnmt3a<sup>lox/lox</sup>/Sim1-Creマウス)を作製した。Dnmt3a<sup>lox/lox</sup>マウス(コントロール)とDnmt3a<sup>lox/lox</sup>/Sim1-Creマウス(Sim1-Cre特異的Dnmt3a欠損マウス)の体重、体長、脂肪量、摂食量、酸素消費量、呼吸商を測定した。さらに、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験を行った。

結 果

1. 高脂肪食負荷によるDNMT3a mRNAの発現レベルの変化

主要な環境因子である食事の影響によるDNAメチル

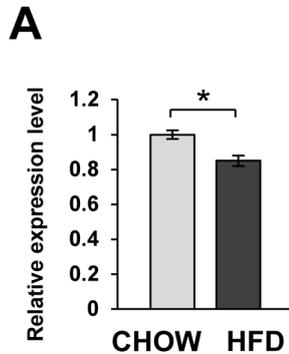


Fig. 1 Gene expression levels. QPCR analysis of Dnmt3a mRNA expression levels in the PVH ( $n=4$ ) of regular chow-or HFD-fed mice ( $n=4$ ) \* $p<0.05$ .

化酵素の発現の変化を調べるため、高脂肪食負荷による肥満マウスの視床下部神経核におけるDNAメチル化酵素の発現レベルを調べた。視床下部室傍核においてDnmt3a mRNAの有意な低下を認めた (Fig. 1)。一方で、Dnmt1およびDnmt3b mRNAの発現に有意な変化は見られなかった。また、視床下部弓状核および腹内側核においては、Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3bのmRNA発現レベルに変化は見られなかった。

2. 視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスの表現型の解析

(1) 体重・体長・脂肪量

結果1により、視床下部室傍核のDnmt3aの発現低下が肥満の発症に関与している可能性が示唆されたため、視床下部室傍核のDnmt3aに焦点を当てて研究を進め

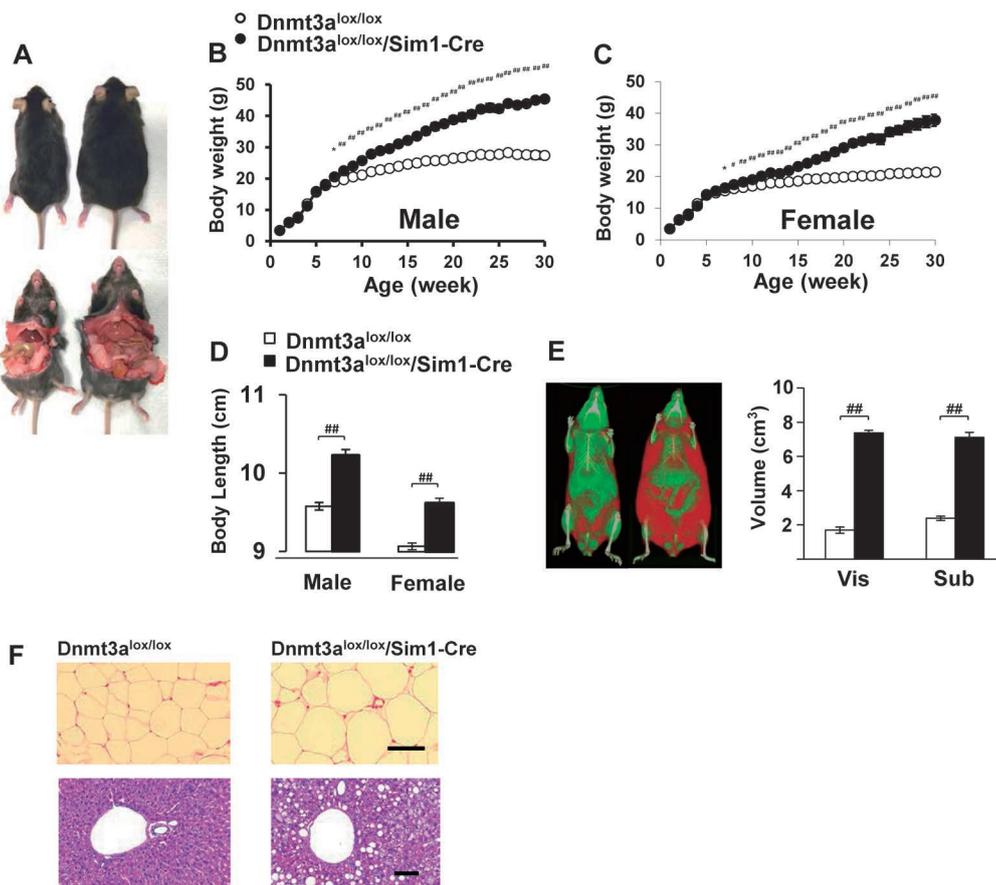


Fig. 2 Development of obesity in Sim1-Cre specific Dnmt3a deletion mice. (A) Dnmt3a<sup>lox/lox</sup> mouse (left) and Dnmt3a<sup>lox/lox</sup>/Sim1-Cre mouse (right) at 22 weeks of age. Weekly body weight of male ( $n=4-13$ ) (B) and female ( $n=9-16$ ) mice (C). (D) Body lengths of 23-week-old male ( $n=6$ ) and female ( $n=10$ ) mice. (E) Left picture: Representative CT-scan image. Left: Dnmt3a<sup>lox/lox</sup> mouse, Right: Dnmt3a<sup>lox/lox</sup>/Sim1-Cre mouse. Green: muscle, red: fat. The volumes of visceral and subcutaneous fats of 23-week-old male mice ( $n=4$ ). (F) Epididymal fat (upper panel) and liver (lower panel) of 24-week-old Dnmt3a<sup>lox/lox</sup> and Dnmt3a<sup>lox/lox</sup>/Sim1-Cre male mice (H & E staining). Scale bars: 100  $\mu$ m. \* $p<0.05$ , # $p<0.005$ , ## $p<0.001$ .

た。主に視床下部室傍核にCreを発現するマウス、Sim1-CreマウスとDnmt3a floxマウスを掛け合わせて、視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウス(Dnmt3a<sup>lox/lox</sup>/Sim1-Creマウス)を作製し、表現型を解析した。視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスはコントロールマウスと比較し、7週齢以降で有意に体重の増加を呈した(Fig. 2B, C)。さらに体長も有意に増加していた(Fig. 2D)。脂肪量が有意に増加しており、CTスキャンにより、皮下脂肪および内臓脂肪の容積がともに増加していた(Fig. 2E)。HE染色により、白色脂肪細胞のサイズの増大と肝臓における脂肪の蓄積が認められた(Fig. 2F)。したがって、視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスにおける肥満は、脂肪量の増加によることが明らかになった。

### (2) 肥満発症の機序について

肥満の発症の機序を明らかにするために、摂食量および酸素消費量を11週齢のマウスを用いて測定した。視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスはコントロールマウスと比較して、一日あたりの摂食量が有意に増加していた。さらに暗期前半において、酸素消費量の有意な低下と呼吸商の有意な増加を認めた。これらのことから、視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスにおける肥満の発症は、過食およびエネルギー消費量の低下によって起きていると考えられる。

### (3) 血糖値の調節について

糖尿病の発症リスクは肥満により増加することが知られている。そこで、肥満発症後の視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウス(12週齢)において、血糖値の調節が正常に行われているか調べるために、ブドウ糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行った。ブドウ糖負荷試験において、ブドウ糖投与60分後および120分後の血糖値が有意に増加していた。また、インスリン負荷試験において、視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスにおいて、インスリン投与30分後から120分後に血糖値が有意に増加していた。したがって、視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスは耐糖能とインスリン感受性が低下していることが明らかになった。

## 考 察

本研究により、DNAメチル化酵素の一つであるDnmt3aが高脂肪食負荷による肥満マウスの視床下部室傍核において有意に発現低下をしていることが明らかになった。さらに、視床下部室傍核特異的なDnmt3a欠損マウスの

表現型の検討から、視床下部室傍核におけるDnmt3aは、正常なエネルギー恒常性の維持に不可欠であり、欠損すると肥満や過食、血糖調節の異常が引き起こされることが明らかになった。

肥満と関連したDnmt3aの発現の変化に関しては、肥満マウスの白色脂肪細胞においてDnmt3aの発現が増加していることが報告されている<sup>9)</sup>。一方、高脂肪食を与えられた授乳中のラットの肝臓ではDnmt3aの発現が低下していることが報告されており、このDnmt3aの低下はメチル基を多く含む食品を与えることにより解除される<sup>10)</sup>。これらことから、Dnmt3aの発現に肥満や食事が関係していることが考えられる。Dnmt3aの発現制御機構はいまだに不明な点が多いが、今後、いかなる分子機序でDnmt3aの発現を変化するのか明らかにしたい。

メチル化DNA結合タンパクのひとつであるMeCP2のSim1-Cre特異的欠損マウスも肥満を呈することが報告されている<sup>11)</sup>。このマウスの肥満の表現型は、肥満発症の週齢などが我々のSim1細胞特異的Dnmt3a欠損マウスと類似している。DNMT3aおよびMeCP2は共通する標的遺伝子に対するDNAメチル化の作成および読み出しを行っている可能性がある。今後、視床下部室傍核のDNAメチル化調節異常を原因とする肥満発症の分子機構について、詳細を明らかにしていきたい。

## 要 約

肥満は世界の多くの地域で急速に増加している。最近の研究により、環境要因が肥満の増加に関与していることが示唆されている。そこで我々は、生体内環境応答機構であるエピジェネティクスに注目し、主要なエピジェネティクスであるDNAメチル化の視床下部摂食代謝中枢における役割を検討した。高脂肪食誘導性肥満マウスにおけるDNAメチル化酵素の発現レベルを調べたところ、Dnmt3aの発現が視床下部室傍核で有意に低下していた。そこで視床下部室傍核特異的Dnmt3a欠損マウスを作製し、表現型を解析した。体重、体長の増加、脂肪の蓄積、過食、エネルギー消費の低下、そして耐糖能およびインスリン感受性の低下を認めた。これらのことから、視床下部室傍核におけるDnmt3aは、エネルギー恒常性を正常に保つために不可欠な役割をしていることが明らかとなった。視床下部室傍核におけるDnmt3aの発現低下が近年の肥満の発症や増加の分子機序の一部である可能性がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご支援賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) G. P. Ravelli, et al.: *N. Engl. J. Med.*, **295**, 349-353, 1976.
- 2) D. J. Barker, C. Osmond: *Lancet*, **1**, 1077-1081, 1986.
- 3) S. Yura, et al.: *Cell Metab.*, **1**, 371-378, 2005.
- 4) R. Kucharski, et al.: *Science*, **319**, 1827-1830, 2008.
- 5) K. Tatton-Brown, et al.: *Nat. Genet.*, **46**, 385-388, 2014.
- 6) M. Kaneda, et al.: *Nature*, **429**, 900-903, 2004.
- 7) J. E. Dodge, et al.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 17986-17991, 2005.
- 8) N. Balthasar, et al.: *Cell*, **123**, 493-505, 2005.
- 9) Y. Kamei, et al.: *Obesity (Silver Spring)*, **18**, 314-321, 2010.
- 10) P. Cordero, et al.: *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 24422-24437, 2013.
- 11) S. L. Fyffe, et al.: *Neuron*, **59**, 947-958, 2008.