

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22680054

研究課題名(和文) 食後高血糖によるエピジェネティック制御機構と代謝性疾患発症との関連

研究課題名(英文) Relation between epigenetic regulation by postprandial hyperglycemia and development of metabolic diseases

研究代表者

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：80423838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円、(間接経費) 5,760,000円

研究成果の概要(和文)：糖質摂取の情報がヒストン蛋白質上の化学修飾として刻印され、その刻印をリードし転写量を増大させる新規エピゲノム制御因子Brd4タンパク質を見いだした。具体的にはBrd4は脂肪細胞におけるインスリン感受性遺伝子や小腸糖消化吸收関連遺伝子などの糖応答遺伝子の転写領域のアセチル化ヒストンに結合し、転写伸長因子(P-TEFb)を活性化させることにより転写伸長反応を促進することを明らかにした。さらに、Brd4の発現増大は肥満・インスリン抵抗性を誘導するとともに、Brd4の標的であるタンパク質(ALBP, ALT)の血中量は、肥満・インスリン抵抗性のバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found the Brd4 protein as a new epigenetic factor to enhance mRNA levels by leading histone modifications induced by carbohydrate intake. The Brd4 enhances transcription by recruiting positive elongation factor b (P-TEFb) on transcribed region of carbohydrate-responsive genes such as carbohydrate digestion and absorption-related genes in the small intestine and insulin sensitivity genes in adipocytes. In addition, we found that increased Brd4 expression induces obesity, insulin resistance in mice. Furthermore, we found Brd4 target proteins in blood such as ALBP, ALT are useful biomarkers for obesity and insulin resistance in human.

研究分野：生活科学

科研費の分科・細目：食生活学・健康と食生活

キーワード：エピゲノム 転写伸長 Brd4 糖応答遺伝子 食習慣 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

研究者は、糖質摂取による小腸糖質消化吸収関連遺伝子の発現増大時には、それら遺伝子転写領域のヒストン H3、H4 のアセチル化および H3 の K4 のメチル化が増大することを発見した。脂肪組織への糖質の流入に伴う脂肪酸合成酵素 (FAS) の遺伝子発現増大時にも、FAS 遺伝子の転写領域のヒストンのアセチル化が増大することを明らかにした。脂肪細胞分化時のアディポネクチン遺伝子の発現誘導時にも、アディポネクチン遺伝子の転写領域上のヒストン H3、H4 のアセチル化が増大することを明らかにした。さらに研究者は、アセチル化ヒストンに結合するプロモドメインタンパク質 Brd4 の性質を検討する過程で、Brd4 が細胞周期制御関連遺伝子の転写領域上にあるアセチル化ヒストンに mRNA 伸長促進因子 (P-TEFb 複合体) を集合させ、それら遺伝子の mRNA 伸張反応を増大させることを発見した。これらの研究成果は、糖質摂取による各組織の糖応答遺伝子の発現増大には、転写因子による転写の ON-OFF による転写開始反応誘導機構という従来の概念に加えて、エピジェネティックメモリーの変動が、転写伸長因子 (Brd4-P-TEFb) の標的遺伝子転写領域への結合の変動を介して mRNA の伸張反応を促進し mRNA の量的な調節を行っているという新たな概念を導入する必要があることを示唆している。さらに、食後高血糖の繰り返しによる転写領域におけるエピジェネティックメモリーおよび Brd4-P-TEFb の攪乱が、代謝性疾患発症リスクの増大させる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

食後の高血糖は、インスリンの過剰分泌を誘導し、肝臓および脂肪組織において脂肪の合成・蓄積をもたらす。さらに、白血球の活性化による炎症の増大を誘発する。本研究では、糖質に反応する各組織 (小腸、脂肪組織、肝臓、末梢血白血球) の遺伝子発現調節の共通した機構として、後天的に遺伝子上に記載されるヒストン修飾および修飾ヒストン結合タンパク質による制御機構、特に、修飾ヒストン上に結合する mRNA 伸張複合体による制御機構に焦点を当てる。さらに、食後の高血糖による修飾ヒストン mRNA 伸長因子の攪乱が、肥満・糖尿病などの代謝性疾患発症リスクの増大をもたらすかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞における Brd4 タンパク質の役割：脂肪細胞分化時およびインスリン抵抗性発症時のインスリン感受性遺伝子およびこれら遺伝子周辺のヒストン修飾・Brd4-P-TEFb の結合を調べた。さらに Brd4 ヘテロ欠損マウスおよび siRNA を使用し、Brd4 タンパク質が脂肪細胞においてインスリン感受性遺伝子の発現を制御するかを調べた。

(2) 小腸細胞における Brd4 タンパク質の役割：小腸の糖質摂取時における小腸消化吸収関連遺伝子およびこれら遺伝子周辺のヒストン修飾・Brd4-P-TEFb の結合を調べた。さらに Brd4 ヘテロ欠損マウスおよび siRNA を使用し、Brd4 タンパク質が小腸細胞において小腸消化吸収関連遺伝子の発現を制御するかを調べた。

(3) 単球様細胞における Brd4 タンパク質の役割：単球様細胞を高グルコースおよびインスリン抵抗性惹起物質 TNF を投与した時の炎症関連遺伝子およびこれら遺伝子周辺のヒストン修飾・Brd4-P-TEFb の結合を調べた。

(4) 肝実質細胞における Brd4 タンパク質の役割：肝実質培養細胞にインスリン投与時の糖新生関連遺伝子とおよびこれら遺伝子周辺のヒストン修飾・Brd4-P-TEFb の結合を調べた。

(5) 高脂肪食によるインスリン抵抗性発症におよぼす Brd4 の役割：Brd4 の活性増大と代謝性疾患との関連を探索するため、高脂肪食を摂取させたマウスの脂肪組織・肝臓において、Brd4 の標的である脂肪蓄積関連遺伝子およびインスリン感受性遺伝子の発現変動を通常 (Brd4 (+/+)) マウスで調べるとともに、これらの発現変動が Brd4 ヘテロ欠損マウスにおいて観察されるかを検討してみた。

(6) Brd4 標的タンパク質を用いた代謝性疾患発症リスクのヒトにおける評価：S市の健康増進センターにて健康診査を受診した30-64歳の男性のうち、代謝性疾患の治療を受けていない320名を対象とした。内臓脂肪面積および皮下脂肪面積は、CTスキャンによって測定した。Brd4の標的遺伝子であるALBPの血中タンパク質濃度をELISA法によって測定した。血中ALBP濃度と関連する臨床検査指標ならびに脂肪蓄積面積を重回帰分析により調べ、さらに、共分散分析(ANCOVA)および多重ロジスティック回帰分析(MLRA)によって、交絡因子を調整した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞におけるBrd4タンパク質の役割：脂肪細胞分化時に増大するアディポネクチン遺伝子の発現増大には、転写領域 (Gene body) におけるヒストンアセチル化修飾の増大に伴うエピゲノム因子Brd4および転写伸長因子P-TEFbの結合の増大が関与することを明らかにした。この結果は、脂肪細胞の他のインスリン感受性遺伝子の発現増大にもヒストンアセチル化修飾に伴うBrd4-P-TEFbの結合増大が関与している可能性を示唆している。そこで、Brd4遺伝子に特異的なsiRNAをレトロウイルスベクターを用いてマウス脂肪細胞培養株3T3-L1に安定発現させ、遺伝子発現の変化を観察した。その結果、Brd4の発現が低下した3T3-L1脂肪細胞では、脂肪細胞特異的遺伝子 (ALBPなど) や脂質合成遺伝子 (FAS, DGATなど) の発現が通常細胞に比べ低いことが明らかとなった。さらに、Brd4 siRNA発現3T3-L1脂肪細胞と通常脂肪細胞においてマイクロアレイ解析を行ったところ、脂質の蓄積に関与する多くの遺伝子 (約60個 例Acs11, Dgat2, GLUT5, Gpd1など) および、それら活性を調節する転写因子 (PPAR γ 2, LXR α , SREBP1, Spot14) の発現が、Brd4 siRNA発現脂肪細胞において、control siRNA発現脂肪細胞と比較して低いことが明らかとなった。これらの遺伝子周辺のBrd4の結合をクロマチン免疫沈降法によって調べてみると、Brd4 siRNA発現脂肪細胞では顕著に低下していた。さらに、Brd4 siRNA発現脂肪細胞において、control siRNA発現脂肪細胞と比較して脂肪の蓄積が顕著に低いことが明らかとなった。

さらに、脂肪蓄積関連遺伝子およびインスリン感受性遺伝子の発現低下は、離乳期のBrd4ヘテロ欠損マウスにおいても観察された。また、Brd4ヘテロ欠損マウスでは、顕著に脂肪の蓄積が抑制されていることが明らかとなった。これらの結果は、マウス脂肪細胞において、Brd4は、脂肪細胞におけるインスリン感受性遺伝子および脂肪蓄積関連遺伝子の発現を正に調節し脂肪の蓄積を促進することを示唆している。

さらにヒト正常細胞でBrd4の役割を調べるために、ヒト脂肪培養細胞の樹立をヒトiPS細胞を用いて行なった。その結果、ヒトiPS細胞に脂肪細胞分化誘導試薬を添加すると、脂肪細胞特異的でBrd4標的遺伝子であるアディポネクチンの発現増加が観察された。

(2) 小腸細胞におけるBrd4タンパク質の役

割：小腸の糖質摂取時には、ヒストンアセチル化修飾およびヒストンH3K4メチル化修飾が小腸糖消化吸収関連遺伝子周辺、特に転写領域において顕著に増大するとともに、Brd4-P-TEFb、ヒストンアセチル化酵素GCN5およびメチル化ヒストン結合タンパク質CHD1の転写領域への結合が増大することを明らかにした。さらに、メチル化ヒストンH3K4に結合するタンパク質としてp32を同定した。これらの結果は、小腸糖質消化吸収酵素の発現増大にはヒストンアセチル化修飾に伴うBrd4-P-TEFbおよびp32の活性増大が関与している可能性を示唆している。そこで、Brd4およびp32遺伝子に特異的なsiRNAをレトロウイルスベクターを用いて小腸様培養細胞株Caco-2に安定発現させた。その結果、Brd4およびp32のsiRNAの導入により小腸糖消化吸収関連遺伝子 (GLUT5, SGLT1など) の発現が顕著に低下することが明らかとなった。さらに、Brd4-P-TEFb複合体がGLUT5遺伝子の発現を直接調節することがChIP法によって明らかとなった。さらに、小腸のGLUT5遺伝子の発現が、Brd4 (+/-) マウスにおいて、Wildタイプと比較して顕著に低い結果が得られた。

(3) 単球様細胞におけるBrd4タンパク質の役割：白血球単球様U937細胞に高グルコース刺激ならびにTNF α 刺激を与えると、炎症関連遺伝子 (IL-1 β , TNF- α) の発現が増大することが明らかとなった。さらに、炎症関連遺伝子の転写領域のヒストンアセチル化修飾、ヒストンH3K4およびH3K36のメチル化修飾およびBrd4の結合が増大することを明らかにした。

(4) 実質細胞におけるBrd4タンパク質の役割：肝実質培養細胞株HEPG2において、インスリン投与によるALT2遺伝子の発現低下に転写領域および遺伝子上流域のヒストンアセチル化修飾の低下が関与することが明らかとなった。さらに、肝臓における脂肪合成遺伝子 (FAS) の発現がインスリン抵抗性発症によって増大する時には、FAS遺伝子周辺のヒストンH3・H4のアセチル化修飾が増大することが明らかとなった。これらの研究成果は、肝臓におけるインスリン抵抗性時のALT2遺伝子およびFAS遺伝子の発現増大には、転写領域におけるヒストンアセチル化修飾およびBrd4の結合増大が関与している可能性があることを示唆している。

(5) 高脂肪食によるインスリン抵抗性発症におよぼすBrd4の役割：野生のジェノタイプ

プを持つ Brd4 (+/+)マウスでは、高脂肪食摂取により体重、脂肪組織重量、肝臓重量が増大するとともに、血中のインスリン濃度が増大した。このことは、高脂肪食摂取が、通常のマウスでは顕著なインスリン抵抗性を誘導することを示唆している。さらに Brd4 (+/+)マウスでは、高脂肪食摂取により脂肪酸の合成や取り込みに関連する遺伝子 (*Acacb*, *Lpl*) およびインスリン感受性に関連する遺伝子 (*Pparg2*, *Slc2a4*, *Adipoq*, *Retn*, *Fabp4*) の発現低下が確認された。このことから、通常モデルでは、高脂肪食摂取が顕著なインスリン抵抗性を誘導することが推察され、脂肪組織における脂肪蓄積関連遺伝子およびインスリン感受性関連遺伝子の発現低下が、高脂肪食摂取によるインスリン抵抗性の増大の一つの要因である可能性が示唆された。一方、高脂肪食を摂取した Brd4 (+/-)マウスでは、Brd4 (+/+)マウスと比較して、顕著に体重、副睾丸脂肪重量およびインスリン濃度が低く、脂肪組織におけるインスリン感受性関連遺伝子の発現が高かった。さらに、Brd4 (+/+)マウスの肝臓では高脂肪食摂取により糖新生関連遺伝子 (*Pck1*, *Ppargc1a*, *Nr3c1*, *Fbp2*, *G6pc*, *ALT2*) の発現が顕著に増大したのに対し、高脂肪食を摂取した Brd4 (+/-)マウスでは、Brd4 (+/+)マウスと比較して、糖新生関連遺伝子の発現が顕著に低かった。これらの結果は、ヘテロ欠損による Brd4 の発現抑制は、過剰な脂肪の蓄積を予防し、脂肪組織における脂肪蓄積関連遺伝子およびインスリン感受性関連遺伝子の発現を高く維持し、肝臓における糖新生関連遺伝子の発現を抑制することを示唆している。このことから、ヘテロ欠損による Brd4 の適度な発現抑制は、脂肪組織や肝臓における遺伝子発現の制御を介してインスリン抵抗性の進展抑制に寄与する可能性が考えられた。

(6) Brd4 標的タンパク質を用いた代謝性疾患発症リスクのヒトにおける評価： 血中 FABP4 濃度は、血圧と強い正の関連性が見られたが、MLRA を用いた解析により、血中 ALBP 濃度と血圧との関連は脂肪蓄積を介したものである可能性が示唆された。

以上の結果より、糖質摂取の情報がヒストン蛋白質上の化学修飾として刻印され、その刻印をリードし転写量を増大させる新規エピゲノム制御因子 Brd4 タンパク質を見いだした(図1)。具体的には Brd4 は脂肪細胞におけるインスリン感受性遺伝子や小腸糖消化吸収関

連遺伝子などの糖応答遺伝子の転写領域のアセチル化ヒストンに結合し、転写伸長因子 (P-TEFb) を活性化させることにより転写伸長反応を促進することを明らかにした(図2)。さらに、Brd4 の発現増大は肥満・インスリン抵抗性を誘導するとともに、Brd4 の標的であるタンパク質 (ALBP, ALT) の血中量は、肥満・インスリン抵抗性のバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。

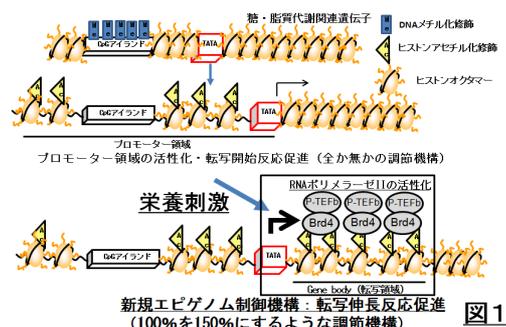


図1

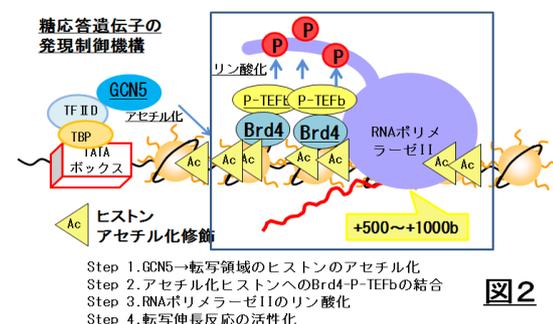


図2

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計13件)

- Honma K, Masuda Y, **Mochizuki K**, and Goda T. Re-feeding rats a high-sucrose diet after 3 days of starvation enhances histone H3 acetylation in transcribed region and expression of jejunal GLUT5 gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem. In press.* (2014) 査読有
- Hariya N, **Mochizuki K**, Inoue S, Morioka K, Shimada M, Okuda T, Goda T. Insulin Resistance in SHR/NDmc-cp Rats Correlates with Enlarged Perivascular Adipocytes and Endothelial Cell Dysfunction in Skeletal Muscle. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2014;60(1):52-9. 査読有
- Harazaki T, Inoue S, Imai C, **Mochizuki K**, Goda T. Resistant starch improves insulin resistance and reduces adipose tissue weight and CD11c expression in rat OLETF adipose tissue. *Nutrition*. 2014 May;30(5):590-5. 査読有

4. Inamochi Y, **Mochizuki K**, Goda T. Histone code of genes induced by co-treatment with a glucocorticoid hormone agonist and a p44/42 MAPK inhibitor in human small intestinal Caco-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840(1):693-700 (2014). 査読有
5. Honma K, **Mochizuki K**, and Goda T. Fructose force-feeding induces histone H3 and H4 acetylation at their lysine residues around the Slc2a5 gene and induces its expression in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem. In press.* (2013). 査読有
6. Shimada M, **Mochizuki K**, Goda T. Methylation of histone H3 at lysine 4 and expression of the maltase-glucoamylase gene are reduced by dietary resistant starch. *J Nutr Biochem.* 24(3):606-12 (2013) 査読有
7. Mochizuki, H., **Mochizuki K**, Suruga, K., Igarashi, M., Takase, S., Goda, T. Induction of the BCMO1 gene during the suckling-weaning transition in rats is associated with histone H3 K4 methylation and subsequent coactivator binding and histone H3 acetylation to the gene. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2012;58(5):319-26. 査読有
8. Yoshinaga, Y., **Mochizuki, K**, Goda, T. Trimethylation of histone H3K4 is associated with the induction of fructose-inducible genes in rat jejunum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419(4):605-11. (2012). 査読有
9. **Mochizuki, K**, Fukaya, N., Tanaka, Y., Fuchigami, M., Goda, T. Treatment with the α -glucosidase inhibitor miglitol from the preonset stage in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats improves glycemic control and reduces the expression of inflammatory cytokine genes in peripheral leukocytes. *Metabolism.* 60(11):1560-5 (2011). 査読有
10. Iwashina, I., **Mochizuki, K**, Inamochi, Y., Goda, T. Clock genes regulate the feeding schedule-dependent diurnal rhythm changes in hexose transporter gene expressions through the binding of BMAL1 to the promoter/enhancer and transcribed regions. *J. Nutr. Biochem.* 22(4):334-43 (2011). 査読有
11. Inoue, S., **Mochizuki, K**, Goda, T. Jejunal induction of SI and SGLT1 genes in rats by high-starch/low-fat diet is associated with histone acetylation and binding of GCN5 on the genes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 57(2):162-9 (2011). 査読有
12. Shimada, M., **Mochizuki, K**, Goda, T. Feeding rats dietary resistant starch reduces both the binding of ChREBP and the

acetylation of histones on the Thrsp Gene in the Jejunum. *J. Agric. Food. Chem.* 59(4):1464-9 (2011). 査読有

13. Fujimoto, S., Goda, T., **Mochizuki, K**. *In vivo* evidence of enhanced di-methylation of histone H3 K4 on upregulated genes in adipose tissue of diabetic *db/db* mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404(1):223-7 (2011). 査読有

招待講演

[学会発表] (計3件)

1. **望月和樹** 「栄養とエピゲノム」 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 2013 年 5 月
2. **望月和樹** 「栄養による遺伝子のエピジェネティクス変化」 第 2 回 DOHaD 研究会 2013 年 6 月
3. **望月和樹**、本間一江、合田敏尚「小腸における栄養シグナルにおけるプロモドメインタンパク質の役割」第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月

[その他]

ホームページ等

<http://www.fp.yamanashi.ac.jp/fdn/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)

山梨大学・医学工学総合研究部・准教授

研究者番号：80423838

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし