

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282023

研究課題名(和文)新規エピゲノム因子Brd4を介した食習慣蓄積機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism underlying accumulation of dietary life by the novel epigenetic factor Brd4

研究代表者

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：80423838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病は、日々の食生活をはじめとする様々な生活習慣が体内に蓄積することによって発症する。本研究では、日々の食習慣は、新規エピゲノム因子Brd4を介し蓄積し、生活習慣病の発症を促進するという仮説を検証した。本研究によって、Brd4は、肝臓や脂肪組織において脂肪合成蓄積・インスリン感受性関連遺伝子の発現を増大させることが明らかとなった。さらに、健康時のBrd4の活性化は肥満・脂肪肝を誘導するが、肥満時のBrd4の活性低下は、インスリン抵抗性を誘導することが明らかとなった。また、Brd4の活性化を示すエピゲノムバイオマーカーは、生活習慣病の発症を予測する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Life style related diseases are developed by the accumulating information related to various lifestyle habits including dietary habits. In this study, we examined whether life style related diseases are developed by the accumulating dietary habits via the novel epigenetic factor Brd4. We found that Brd4 induced expression of genes related to fat synthesis/accumulation and insulin sensitivity in the liver and adipose tissues. Moreover, Brd4 activation at the healthy state induced obesity and fatty liver, whereas Brd4 repression at the obesity state induced insulin resistance. In addition, we demonstrated in this study that epigenetic biomarkers indicating Brd4 activation would predicts development of life style related diseases.

研究分野：分子栄養

キーワード：Brd4 生活習慣病 エピゲノム 食習慣 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

糖質（特に精製糖）の過剰摂取は、食後の血糖上昇およびインスリンの過剰分泌を促すことによって、脂肪組織における脂肪合成・蓄積関連遺伝子（LPL, FAS など）の発現を誘導し、糖質を脂肪に変換して脂肪の蓄積を誘導する。また、過剰な脂肪の蓄積は、脂肪細胞をインスリン抵抗性細胞へと変化させ、脂肪合成・蓄積関連遺伝子および他のインスリン感受性遺伝子（アディポネクチンなど）の発現を劇的に低下させる。これによって脂肪組織の変化に伴うアディポサイトカインの分泌が変動し、エネルギーの代謝や蓄積に関与する組織（肝臓、骨格筋）における糖・脂肪の取り込み・蓄積関連遺伝子の発現を劇的に低下させる。

また小腸においては、糖質の消化吸収関連遺伝子（*Si*, *Mgam*, *Glut5*, *Sglt1*）の発現が糖質摂取およびインスリン抵抗性増大により誘導するので、食後高血糖およびインスリン抵抗性をもたらす食生活は、糖質の消化速度をさらに増大させる。さらに、食後の高血糖およびインスリン抵抗性の増大が、末梢白血球、肝臓、脂肪組織における炎症性サイトカイン（IL-1 β , TNF- α など）の遺伝子発現を増大させることによって2型糖尿病の発症進展が促進される。これらの生活習慣は、後天的に体内に蓄積していくため、DNA上の配列ではない後天的な情報すなわちエピゲノム情報（ヒストン修飾やDNAの化学修飾）によって制御されると考えられている。近年、研究代表者のグループは、糖質摂取時およびインスリン感受性増大時の小腸糖質消化吸収関連遺伝子、肝臓および脂肪組織における脂肪合成関連遺伝子、単球様培養細胞における炎症関連遺伝子の発現増大時には、それら遺伝子周辺のヒストン修飾、特に、転写の増大に関与するヒストンH3、H4のアセチル化修飾およびH3 リジン(K)4のメチル化修飾が増大することを見いだした。特に、これら遺伝子の発現増大時には、上記のヒストン修飾は従来転写に関わるとされてきた転写開始点付近のプロモーター領域ではなく、その下流の転写領域（Gene body）において著しく促進されていた。研究代表者はこれまでに、転写領域のアセチル化ヒストンに転写伸長促進因子（P-TEFb 複合体）を集合させることによって、RNAポリメラーゼIIを活性化するエピゲノム因子Brd4を同定した。

それゆえ、糖応答遺伝子の発現誘導は、Brd4-P-TEFb-転写伸長エピゲノム因子複合体によって調節される可能性が高いことを示している。さらに、Brd4は、インスリン抵抗性時には不活性化される。それゆえ、Brd4は、日々の食事の摂取に応じて体内のエネルギーバランスをモニターし、その活性攪乱が肥満、2型糖尿病などの生活習慣病の発症を促進すると可能性が考えられる。

2. 研究の目的

研究背景を受け、本研究では以下の仮説を検証する。

- (1) Brd4は、食習慣の蓄積をモニターするエピゲノム因子である。
- (2) 食習慣の蓄積によるBrd4の活性攪乱は、生活習慣病の発症を誘導する。
- (3) Brd4の活性攪乱を反映するエピゲノムバイオマーカーは、生活習慣病の発症を予測する。

3. 研究の方法

- (1) 3T3-L1脂肪細胞におけるBrd4の役割の検討：3T3-L1脂肪培養細胞に、Brd4-アセチル化ヒストン結合阻害剤(+)-JQ1を投与し、脂肪合成およびインスリン感受性関連遺伝子のmRNA発現が低下するかをqRT-PCRによって調べた。さらに、インスリン感受性関連遺伝子周辺のヒストンアセチル化修飾およびBrd4の結合をクロマチン免疫沈降（ChIP）法によって検出した。
- (2) フルクトース誘導性の肝臓代謝遺伝子のBrd4による制御：C57BL/6Jマウスにフルクトース水を3時間おき2回投与し、最初の投与から6時間後にマウスを解剖し、肝臓を採取し、マイクロアレイ、qRT-PCRで代謝関連遺伝子のmRNA発現を調べるとともに、ChIP法によってこれら遺伝子へのヒストンアセチル化修飾やBrd4の結合状態を調べた。
- (3) Brd4による脂肪肝形成機構：(+)-JQ1を含む食餌をC57BL/6Jマウスに3週間投与し、肝臓の重量や代謝関連遺伝子のmRNA発現(qRT-PCR)を測定した。
- (4) インスリン抵抗性に対するBrd4の役割：インスリン抵抗性惹起物質TNF- α を脂肪3T3-L1培養細胞の投与にし、脂質蓄積関連遺伝子のmRNA発現およびこれら遺伝子へのヒストンアセチル化修飾やBrd4の結合状態をChIP法によって調べた。
- (5) *Brd4*ヘテロ欠損へのスクロース負荷の繰り返しによる耐糖能異常の増大機構：*Brd4*ヘテロ欠損マウスに高ショ糖・高脂肪食を投与し、軽度耐糖能異常マウスを作成した（対照は、通常食）。さらに、軽度耐糖能異常*Brd4*ヘテロ欠損マウスに1日1回繰り返しスクロース \pm 食後高血糖抑制剤ミグリトールを14日間負荷した食後高血糖モデルマウスを作成し、肝臓における代謝関連遺伝子の発現を測定した。
- (6) 老齢期の耐糖能異常に対するBrd4の役割：老齢期の*Brd4*ヘテロ欠損マウス、正常マウス（C57BL/6J）に高脂肪・高ショ糖食を与え、耐糖能異常や臓器重量の変化を観察した。
- (7) Brd4の活性攪乱を反映するエピゲノムバイオマーカーの探索：静岡県I市において、横断研究を実施し、Brd4の標的タ

ンパク質の ALBP と IL-1 の血中濃度を測定し、臨床検査パラメータや食生活との関連を検証した。

4. 研究成果

- (1) 3T3-L1 脂肪細胞における Brd4 の役割の検討：3T3-L1 脂肪培養細胞に(+)-JQ1 を投与すると、脂肪細胞の分化関連遺伝子 (*Pparg1*, *Pparg2*, *Apm1*, *Fabp4*) 脂肪合成関連遺伝子 (*Acaca*, *Acacb*, *Fasn*, *Dgat1*, *Lpl*) の mRNA 発現量および脂肪の蓄積量が顕著な低下および *Lpl* 遺伝子の転写開始点下流領域のヒストン H3 のアセチル化修飾および Brd4 の結合の低下を認めた。
- (2) C57BL/6J マウスにフルクトース水を 3 時間おき 2 回投与し、最初の投与から 6 時間後に肝臓の脂肪合成関連遺伝子 (*Gpd1*, *Me*) の発現は、グルコース投与群と比較して、これらの遺伝子発現は顕著に高く、その発現は、(+)-JQ1 の共投与によって抑制された。C57BL/6J マウスにフルクトース水を投与すると、肝臓の脂肪合成関連遺伝子 (*Cyp8b1*, *Plin5*) の発現およびこれら遺伝子の転写領域におけるアセチル化ヒストンおよび Brd4 の結合が増大すること、これらは (+)-JQ1 を共投与によって低下することが明らかとなった。
- (3) Brd4 による脂肪肝形成機構：(+)-JQ1 を含む食餌を C57BL/6J マウスに 3 週間投与すると、フルクトース食摂取誘導性の肝肥大が顕著に抑制された。フルクトース食の 3 週間摂取によって誘導される肝臓における脂肪合成関連遺伝子の発現が(+)-JQ1 の投与によって抑制された。
- (4) インスリン抵抗性に対する Brd4 の役割：インスリン抵抗性惹起物質 TNF- α を脂肪 3T3-L1 培養細胞の投与により脂肪培養細胞内のインスリン抵抗性病態を作り出し、Brd4 タンパク質の脂質蓄積関連遺伝子への結合状態を調べた。その結果、脂肪蓄積関連遺伝子 *Lpl* の転写開始点下流領域のヒストン H3 のアセチル化修飾および Brd4 結合が低下した。このことより、インスリン抵抗性病態下では、脂肪蓄積関連遺伝子 *Lpl* の発現は、同遺伝子転写開始点下流域のアセチル化ヒストンの低下に伴う Brd4 の結合低下が関与することが明らかとなった。TNF- α 投与による 3T3-L1 脂肪細胞における脂質代謝関連遺伝子の発現低下には、転写領域におけるヒストンアセチル化修飾の低下が関与すること、これらの低下は短鎖および中鎖脂肪酸の投与により改善した。
- (5) *Brd4* ヘテロ欠損マウスへのスクロース負荷の繰り返しによる耐糖能異常の増大機構：*Brd4* ヘテロ欠損マウスは、脂肪の蓄積能が低いことから肥満誘導性のインスリン抵抗性および脂肪肝を発症

しにくいことが明らかとなった。一方で *Brd4* ヘテロ欠損マウスは、脂肪蓄積能が低いために食後高血糖は増大しやすいと考えられた。そこで、高ショ糖・高脂肪食によって誘導した軽度耐糖能異常マウスに繰り返しスクロースを負荷した食後高血糖モデルマウスを作成し、肝臓における糖応答性シグナルに及ぼす *Brd4* ヘテロ欠損マウスでの影響を検討した。その結果、*Brd4* ヘテロ欠損マウスでは、食後高血糖の増大、インスリンの分泌不足による肝臓における解糖系の抑制、糖新生および脂肪合成関連遺伝子の発現の亢進が観察された。これらは、食後高血糖を抑制する薬剤 (ミグリトール) を投与すると改善される傾向が明らかとなった。

- (6) 老齢期の耐糖能異常に対する Brd4 の役割：老齢期の生活習慣病発症に対する Brd4 の役割を検証するために、高週齢の *Brd4* ヘテロ欠損マウスに高脂肪・高ショ糖食を与え、正常マウスと比較した。その結果、高脂肪食を与えた *Brd4* ヘテロ欠損マウスの内臓脂肪量は、高脂肪食を摂取した Wild タイプマウスと比較して顕著に低いこと、顕著な食後高血糖が観察されることが明らかとなった。上記の結果は、Brd4 の発現低下は、脂肪細胞への糖の取り込みを低下させることによって、顕著な血糖増加を誘導することを示唆している。
- (7) *Brd4* の活性攪乱を反映するエピゲノムバイオマーカーの探索：ヒトにおいて同様なことが観察されるか調べるために、横断研究を実施した。まず、*Brd4* ヘテロ欠損マウスのような痩せ型体質について解析するために、BMI < 23 のほぼ健康な対象者を抽出し、血糖上昇と伴い増大する動脈硬化リスク因子 IL-1 β の血液中の濃度と食生活との関連との関連を検証した。その結果血中 IL-1 β 濃度の増大には、血糖上昇が関連するとともに、脂肪とタンパク質の摂取が正に関連することが明らかとなった。それゆえ、痩せ型の日本人においても、高脂肪食摂取が血糖値や血中 IL-1 β 濃度の増大と関連することが考えられた。さらに、IL-1 β は、脂肪細胞における Brd4 の活性低下による耐糖能異常のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。さらに、*Brd4* の標的タンパク質である ALBP の血中濃度は、全腹部面積や腹囲等の肥満の指標と強い性の関連を持つことが明らかとなった。

以上の結果より、*Brd4* は、肝臓において脂肪合成蓄積関連遺伝子の発現の増大を介し脂肪肝を促進させること、インスリン発現を促進させることが明らかとなった。さらに、2

型糖尿病発症前における Brd4 の活性化は、肥満・脂肪肝を誘導すること、肥満誘導後の Brd4 の活性低下は、インスリン抵抗性を誘導することが明らかとなった。また、Brd4 の活性化を示すエピゲノムバイオマーカーは、生活習慣病の発症を予測する可能性が示唆された。さらに、中鎖脂肪酸は、ヒストンのアセチル化を増大させることによって Brd4 の活性化し、インスリン抵抗性を改善する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Mochizuki K, Hariya N, Honma K, Goda T. Relationship between epigenetic regulation, dietary habits, and the Developmental Origins of Health and Disease theory. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2017 Feb 7.
2. Yamada A, Honma K, Mochizuki K, Goda T. BRD4 regulates fructose-inducible lipid accumulation-related genes in the mouse liver. *Metabolism* 65(10), 1478–1488 (2016)
3. Inamochi Y, Dey A, Nishiyama A, Kubota T, Ozato K, Goda T, Mochizuki K. Transcription elongation factor Brd4-P-TEFb accelerates intestinal differentiation-associated SLC2A5 gene expression. *Biochem Biophys Rep.* 7, 150–156 (2016)
4. Kubota T, Mochizuki K. Epigenetic Effect of Environmental Factors on Autism Spectrum Disorders *Int J Environ Res Public Health* 14;13(5), 1-12 (2016)
5. Honma K, Mawatari R, Ikeda M, Mochizuki K, and Goda T. Fasting during the suckling-weaning transient period of rats induces inflammatory gene expression in the adipose tissue and peripheral leukocytes *Nutrition*. 32(11-12),1268-1274 (2016)
6. Kubota T, Miyake K, Hariya N, Nguyen Quoc VT, Mochizuki K. Prader-Willi syndrome: the disease that opened up epigenomic-based preemptive medicine. *Diseases* 4(1), 15 (2016)
7. Honma K, Hikosaka M, Mochizuki K, Goda T. Loss of circadian rhythm of circulating insulin concentration induced by high-fat diet intake is associated with disrupted rhythmic expression of circadian clock genes in the liver. *Metabolism* 65(4):482-491(2016)
8. Ikeda M, Honma K, Mochizuki K, and Goda T. Fasting for 3 days during the suckling-weaning transient period in male rats induces metabolic abnormalities in the liver and is associated with impaired glucose tolerance in adulthood. *Eur J Nutr.* 55(3):1059-67 (2016)
9. 望月和樹, 針谷夏代, 本間一江, 合田敏尚, 久保田健夫 Gene body 領域のエピゲノム修飾に基づいた代謝関連遺伝子の発現制御機構 *BIO Clinica* Vol.30 N0.9, 903-908 (2015)
10. Tamasawa A, Mochizuki K, Hariya N, Saito M, Ishida H, Doguchi S, Yanagiya S, Osonoi T. Hydrogen gas production is associated with reduced interleukin-1 β mRNA in peripheral blood after a single dose of acarbose in Japanese type 2 diabetic patients. *Eur J Pharmacol.* 762:96-101 (2015)
11. Imai C, Harazaki T, Inoue S, Mochizuki K and Goda T. Treatment with DPP-4I anagliptin or α -GI miglitol reduces IGT development and the expression of CVD risk factors in OLETF rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 61(4):313-21 (2015)
12. Yamada M, Mochizuki K, Honma K, Miyauchi R, Kasezawa N, Tohyama K and Goda T. Serum fatty acid binding protein 4 concentrations are positively and independently associated with blood pressure and abdominal fat among parameters in health check-ups in middle-aged general Japanese males. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 61 (4): 291-8 (2015)
13. Suzuki T, Muramatsu T, Morioka K, Goda T, Mochizuki K. ChREBP binding and histone modifications modulate hepatic expression of the Fasn gene in a metabolic syndrome rat model. *Nutrition* 31(6):877-83 (2015)

[学会発表](計 16 件)

1. 望月和樹, 合田敏尚, 久保田健夫 糖刺激による BRD4-ヒストンアセチル化依存的転写伸長の増進機構 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 BMB2015 2015 年 12 月 1-4 日(神戸ポートアイランド 兵庫県・神戸市)
2. 川村 武蔵, 望月和樹 老齢期の非肥満型耐糖能異常マウスに対する中鎖脂肪酸の有効性-GLP-1 分泌促進作用-第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2017 年 2 月 10 日(金)~11 日(土) (はまぎんホール ヴィアマーレ 神奈川県・横浜市)
3. 高見紗依子, 松本氣寧子, 本間一江, 望月和樹, 合田敏尚 絶食-再摂食時の肝臓における解糖系および脂肪酸合成系の遺伝子発現に及ぼす脂肪酸の影響 第 71 回 日本栄養・食糧学会 中部支部大会 2016 年 11 月 19 日(静岡県立大学 静岡県・静岡市)
4. 望月和樹, 針谷夏代, 本間一江, 合田敏尚 「Relations between epigenetic regulation by dietary habits and DOHaD」 2016 年 7 月 29 日 日本先天異常学会第 56 回学術集会(姫路商工会議所 兵庫県・姫路市)
5. 川村 武蔵, 合田直樹, 針谷夏代, 望月和樹 短鎖・中鎖脂肪酸によるインスリン

- 抵抗性体質の改善作用—マウス培養細胞を用いた検討— 第5回日本 DOHaD 研究会学術集会 2016年7月23日(国立成育医療研究センター 東京都・世田谷区)
6. 山下紗輝、山下さやか、望月和樹 短鎖・中短鎖・中鎖脂肪酸によるインスリン抵抗性体質の改善作用—マウス培養細胞を用いた検討— 第5回日本 DOHaD 研究会学術集会 2016年7月23日(国立成育医療研究センター 東京都・世田谷区)
 7. 川村武蔵、合田直樹、久保田健夫、望月和樹 脂肪細胞における短鎖・中鎖脂肪酸によるインスリン抵抗性改善作用 第70回日本栄養・食糧学会大会 2016年5月14日(武庫川女子大学 兵庫県・神戸市)
 8. 本間一江、鈴木友莉、山田有紀、望月和樹、合田敏尚 ヒストンアセチル化を介した小腸消化吸収関連遺伝子の転写制御 第70回日本栄養・食糧学会大会 2016年5月15日(武庫川女子大学 兵庫県・神戸市)
 9. 望月和樹「周産期の栄養と DOHaD 仮説」第18回 脂質栄養シンポジウム『栄養事情の今-身近に潜む低栄養』2016年1月(お茶の水女子大学 東京都・文京区)
 10. 今井千裕、望月和樹、久保田健夫、合田敏尚 新規エピゲノム因子 Brd4 を介した単回のグルコース応答性炎症関連遺伝子の発現持続機構 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 BMB2015 2015年12月1-4日(神戸ポートアイランド 兵庫県・神戸市)
 11. 山田有紀、本間一江、望月和樹、久保田健夫、合田敏尚 フルクトース誘導性の肝臓代謝関連遺伝子の Brd4 を介した発現調節機構 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 BMB2015 2015年12月1-4日(神戸ポートアイランド 兵庫県・神戸市)
 12. 望月和樹、合田敏尚、久保田健夫 糖刺激による BRD4-ヒストンアセチル化依存的転写伸長の増進機構 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 BMB2015 2015年12月1-4日(神戸ポートアイランド 兵庫県・神戸市)
 13. 針谷夏代、望月和樹、久保田健夫、合田敏尚 「ヒト骨格筋由来幹細胞 Hu5/E18 の脂肪細胞への分化と転写因子 FOXO1 の役割」第4回日本 DOHaD 研究会学術集会 2015年8月1-2日(昭和大学 品川区・東京都)
 14. Aki Yamada, Kazue Honma, Kazuki Mochizuki, Toshinao Goda Regulation of fructose inducible genes in the liver by the bromodomain protein Brd4. 2015年10月30日(金) 31日(土) 第20回静岡健康・長寿学術フォーラム 静岡県立大学 静岡(品川区・東京都)
 15. Chihiro Imai, Kazuki Mochizuki and Toshinao Goda Suppression of the vascular endothelial damage related genes by inhibiting neutrophil elastase activity in type 2 diabetic model OLETF rats. 2015年10月30日(金) 31日(土) 第20回静岡健康・長寿学術フォーラム 静岡県立大学 静岡県・静岡市)
 16. 藤井貴子、本間一江、望月和樹、合田敏尚 「胎児期の低栄養による膵臓およびインスリン標的組織の変化」第4回日本 DOHaD 研究会学術集会 2015年8月1-2日(昭和大学 品川区・東京都)
- 〔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・総合研究部・准教授
研究者番号：80423838
 - (2) 研究分担者
合田 敏尚(GODA, Toshinao)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：70195923
 - (3) 連携研究者
本間 一江(HONMA, Kazue)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：80724765
 - (4) 研究協力者
針谷 夏代(HARIYA, Natsuyo)
山梨学院大学・健康栄養学部・准教授
研究者番号：80732784