

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282027

研究課題名(和文)食習慣を反映するエピゲノムバイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of epigenome biomarkers reflecting the eating habit

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：食後の高血糖をもたらす食習慣の履歴が、白血球や肝臓などの組織において、炎症関連遺伝子やインスリン抵抗性関連遺伝子の発現応答性の変化として反映されることを、2型糖尿病や肥満モデル動物を用いて明らかにした。高血糖に24時間曝露した単球では、炎症やインスリン抵抗性に関するTNF 遺伝子のmRNA レベルと、それに伴うヒストンのアセチル化修飾(エピゲノムの変化)が持続的に増大することが明らかになった。ヒトにおける血糖上昇の履歴を示すマーカーとして、耐糖能の低下に關与する肝臓由来マイクロRNAや血漿中の可溶性細胞接着分子が利用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated using animal models of type two diabetes and obesity that the history of postprandial hyperglycemia is reflected by a change in the responding capability regarding the expression of the genes related to inflammation and insulin resistance in the peripheral leukocytes and the liver. The mononuclear cells exposed to a high glucose concentration for 24h showed persistently elevated levels of the mRNA and histone H3 acetylation (an epigenetic modification) of TNF $\alpha$  gene, which plays a pivotal role in inflammation and insulin resistance. Candidates of epigenome biomarkers for the history of postprandial glucose spikes include a hepatocyte-derived micro RNA and plasma soluble cell adhesion molecules.

研究分野：保健栄養学

キーワード：エピゲノム バイオマーカー 食後高血糖 慢性炎症 末梢血

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病、脂質異常症などの慢性代謝性疾患を中心とした生活習慣病のリスク低減のためには、肥満の予防により脂肪組織における炎症の慢性化を防ぎ、インスリン抵抗性を抑制することが必要であるが、インスリン分泌能力の低い日本人にとっては、食後高血糖を抑制することが重要な方策と考えられた。

(2) 申請者らは、これまでの地域健診受診者における横断研究により、血漿中の IL-1 や IL-6 の濃度は、空腹時の血糖値や食べる速さなど、血糖コントロールの是非を反映する鋭敏なバイオマーカーであることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、食後の高血糖あるいは内臓脂肪の蓄積をもたらす食習慣の履歴が、白血球や肝臓などの組織において、炎症関連遺伝子やインスリン抵抗性関連遺伝子の発現応答性の変化(エピゲノムの変化)として反映されるという仮説を動物および細胞を用いたモデル実験によって検証し、さらに、血液中の指標の中からエピゲノムバイオマーカーを探索・開発し、その有用性を日本人を対象として検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 過食型 2 型糖尿病自然発症モデルラット (OLETF) を用い、毎日 1 回のスクロース経口負荷 (2g/kg 体重) により急激な血糖上昇を断続的に起こし、8 日目のスクロース経口負荷の直前、1 時間後および 3 時間後に尾末端から採血した。末梢血白血球における炎症関連遺伝子 (IL-1、TNF- $\alpha$ 、S100a8、IL-18) の発現量を、real-time RT-PCT 法によって測定した。また、当該遺伝子のプロモータ領域から転写領域までの広い遺伝子領域におけるヒストンのアセチル化修飾を、クロマチン免疫沈降法によって解析した。

(2) 単球様 THP-1 細胞を高グルコース条件 (25 mmol/L) で 24 時間培養した後、低グルコース環境 (5 mmol/L) に 4 日間置き、炎症関連遺伝子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1、S100a9、S100a8) の発現の変動経過を観察した。高グルコース培地に曝露する際に、Brd4 阻害剤 JQ1 を添加した場合と比較した。当該遺伝子のプロモータ領域から転写領域までの広い遺伝子領域におけるヒストンのアセチル化修飾をクロマチン免疫沈降法によって解析した。

(3) C57BL/6J 雄性マウスおよび Brd4 ヘテロ欠損マウスに高脂肪食を 21 週間投与してインスリン抵抗性モデル動物を作成した。その後、1 日 1 回、2 週間にわたりスクロース水溶液を経口投与 (0.2g/100g 体重) して間歇的な血糖上昇を繰り返した後に屠殺した。対照群には、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤 (ミグリトール) を添加したスクロース水溶液を経口投与した。肝臓から総 RNA を抽出し、ALT-1、ALT-2、 $\alpha$ -GTP-1、HNF4A、CBP、p300 の遺伝子の発現量を real-time RT-PCT 法によって測定した。

(4) ヒト肝臓由来細胞株 HepG2 細胞を高グルコース (16.5 mmol/L) 環境で 48 時間培養し、これまでに糖尿病の発症・進展への関与が確認・予測された 84 種類の miRNA の中で、発現量が変動するものがあるかを検討した。さらに、発現が変動した miRNA の中で、3' UTR を介して発現を調節している可能性のある候補遺伝子ならびにそのシグナルの下流の標的遺伝子の発現量を real-time RT-PCT 法によって測定した。

(5) 人間ドック健診受診者 (男性) 1165 名 (平均年齢 54.8 $\pm$ 6.5 歳) の中から 2 型糖尿病患者群 353 名と健常者群 448 名を抽出して、ケースコントロール研究を行った。末梢血白血球から DNA を抽出し、糖尿病関連遺伝子上の一塩基多型の中から、潜在的に miRNA と結合する可能性のある 3' UTR の部位を探索し、これらの一塩基多型が糖尿病と関連しているかを検証した。

(6) DPP-4 阻害薬による治療で血糖管理が不良と判断された 2 型糖尿病患者 14 名に  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤ミグリトールを 3 か月追加投与した。食事負荷前および食事負荷 1、2 時間後に血液を採取し、末梢血白血球における TNF- $\alpha$ 、IL-1 および IL-8 の遺伝子発現量を real-time RT-PCT 法によって測定した。血漿中の可溶性細胞接着分子タンパク質である sE-セレクチンと sVCAM-1 の濃度を、MILLIPLEX イムノアッセイ法を用いて測定した。

## 4. 研究成果

(1) 末梢血白血球における炎症関連遺伝子のエピゲノム調節機構の解析：

2 型糖尿病自然発症モデルラット (OLETF) では、毎日 1 回の糖経口負荷により糖負荷に

対する応答性は徐々に強くなり、8日目では、糖負荷により、末梢白血球における炎症関連遺伝子 IL-1、TNF- $\alpha$ 、S100a8、IL-18 の発現が著しく増大することが明らかになった。それゆえ、末梢白血球における炎症関連遺伝子は、食後高血糖の繰り返しによって発現レベルを変動させるという、エピジェネティックな調節を受けることが示唆された。

(2) 単球様培養細胞における高グルコース刺激による炎症関連遺伝子の発現制御：

単球様 THP-1 細胞を高グルコース条件で 24 時間培養すると、その後、低グルコース環境に 4 日間置いた後でも、TNF $\alpha$ 、IL-1、S100a9 ならびに S100a8 の遺伝子発現が高いレベルを維持することが明らかになった。

高グルコース刺激を短期間受けた細胞では、TNF 遺伝子のプロモータ領域 (-400bp) だけでなく、転写領域 (+1000bp および +2000bp) においても、ヒストン H3 のアセチル化の増大が、低グルコース環境に置かれて 4 日後でも高いレベルに維持されていた。これらの領域では、ヒストン H3 のアセチル化との増大と平行してプロモドメインタンパク質 Brd4 の結合の増大が見られた。

一方、これらの炎症関連遺伝子の発現増大およびヒストン H3 のアセチル化の増大は、アセチル化ヒストン結合タンパク質 Brd4 の阻害剤の存在下では完全に抑制された。

それゆえ、末梢白血球における高グルコース刺激の履歴は、ヒストン H3 のアセチル化とそれに伴う転写伸長因子複合体の形成持続機構を介して、TNF $\alpha$  遺伝子の発現増大を持続させることが示唆された。

(3) 肝臓におけるインスリン抵抗性関連遺伝子のエピゲノム調節機構：

C57BL/6J 雄性マウスに高脂肪食を 21 週間投与して作成したインスリン抵抗性モデルでは、肝臓における ALT-1、ALT-2 および -GTP-1 遺伝子の発現が増大した。1 日 1 回のスクロース投与による血糖上昇を 2 週間繰り返すと、ヒストンのアセチル化を促す CBP と p300 の遺伝子発現が増大するとともに、インスリン抵抗性の候補遺伝子である ALT-2 遺伝子の発現が有意に増大した。一方、Brd4 のヘテロ欠損マウスでは、スクロース投与によるこれら遺伝子の発現促進作用が消失した。それゆえ、インスリン抵抗性惹起に伴う肝臓 ALT および -GTP 遺伝子の発現増大には、ヒストンコードの変化が関与している可能性が示唆された。

(4) 肝臓由来培養細胞における高グルコース刺激による血糖調節関連遺伝子のエピゲノム制御：

HepG2 細胞を高グルコース環境で培養したところ、hsa-miR-24-3p の発現が低下するとともに、この miRNA により 3' UTR を介して発現抑制が示されている HNF1B 遺伝子の mRNA 量が増大し、HNF1B の標的遺伝子である糖新生律速酵素の遺伝子発現が増大した。それゆえ、肝細胞への高グルコース刺激は、インスリンによる糖新生抑制作用を、エピゲノム調節機構によって減弱させる可能性が示唆された。

(5) 健康診査受診者の末梢白血球における炎症関連遺伝子の発現を反映するエピゲノムバイオマーカーの開発：

健診受診男性 1,165 名の血球から DNA を抽出し、糖尿病関連遺伝子における潜在的 miRNA 結合部位における一塩基多型と空腹時血糖値との関連を検討したところ、HNF1B 遺伝子の rs2229295 および rs1800929 の一塩基多型の組合せが、空腹時血糖値の高値と強く関連することが明らかになった。

(6) 食後高血糖抑制を目的とした介入試験による炎症関連バイオマーカーの変動：

2 型糖尿病患者 14 名に  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤 (ミグリトール) を追加投与することによって食事負荷による血糖上昇を抑制したところ、末梢白血球における TNF $\alpha$ 、IL-1 および IL-8 の遺伝子発現の増大が抑制されるとともに、可溶性細胞接着分子タンパク質である sE-セレクトリンならびに sVCAM-1 の血漿濃度が有意に低下した。それゆえ、食後高血糖の抑制は、2 型糖尿病の発症進展および合併症のリスクを低減させるものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

- 1) Honma, K., Kamikubo, M., Mochizuki, K., and Goda, T., Insulin-induced inhibition of gluconeogenesis genes, including glutamic pyruvic transaminase 2, is associated with reduced histone acetylation in a human liver cell line. *Metabolism*, in press.
- 2) Wakasugi, Y., Hashidume, S., Sano, A., Mochizuki, K., Goda, T., and Ichikawa, Y.,

Glycemic response in healthy Japanese subjects after consuming potatoes and white rice. *J. ARAHE*, 査読有, 23 (1): 1-8, 2016

3) Yamada, A., Honma, K., Mochizuki, K., and Goda, T., Brd4 regulates fructose-inducible lipid accumulation-related genes in the mouse liver. *Metabolism* 査読有, 65: 1478-1488, 2016

4) Inamochi, Y., Dey, A., Nishiyama, A., Kubota, T., Ozato, K., Goda, T., and Mochizuki, K., Transcription elongation factor Brd4-P-TEFb accelerates intestinal differentiation-associated SLC2A5 gene expression. *Biochemistry and Biophysics Reports* 査読有, 7: 150-156, 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* 査読有, 32: 1268-1274, 2016

6) 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 associated with impaired glucose tolerance. *Eur. J. Nutr.* 査読有, 55: 1059-1067, 2016

7) Goda, N., Murase, H., Kasezawa, N. Goda, T., and Yamakawa-Kobayashi, K., Polymorphism in microTNA-binding site in HNF1B influences the susceptibility of type 2 diabetes mellitus: a population based case-control study. *BMC Med. Genet.* 査読有, 16: 75, 2015

DOI: [10.1186/s12881-015-0219-5](https://doi.org/10.1186/s12881-015-0219-5)

8) Imai C., Harazaki T., Inoue S., Mochizuki K., and Goda T., Treatment with DPP-4I anagliptin or -GI miglitol reduces IGT development and the expression of CVD risk factors in OLETF rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 61: 313-321, 2015

9) 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 health check-ups in middle-aged general Japanese males. *J.*

*Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 61: 291-298, 2015

10) Oe, Y., Mochizuki, K., Miyauchi, R., Misaki, Y., Kasezawa, N., Tohyama, K., and Goda, T., Plasma TNF- $\alpha$  is associated with inflammation and nutritional status in community-dwelling Japanese elderly. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 61, 263-269, 2015

11) Suzuki T., Muramatsu T., Morioka K., Goda T., and Mochizuki K., ChREBP binding and histone modifications modulate hepatic expression of the Fasn gene in a metabolic syndrome rat model. *Nutrition* 査読有, 31: 877-883, 2015

12) Hariya, N., Miyake, K., Kubota, T., Goda, T., and Mochizuki, K., Putative PPAR target genes express highly in skeletal muscle of insulin-resistant MetS model SHR/NDmc-cp rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 査読有, 61: 28-36, 2015

13) Inoue, S., Honma, K., Mochizuki, K., and Goda, T., Induction of histone H3K4 methylation at the promoter, enhancer, and transcribed regions of the Si and Sglt1 genes in rat jejunum in response to a high-starch/low-fat diet. *Nutrition* 査読有, 31: 366-372, 2015

14) Mochizuki K., Yamada M., Miyauchi R., Misaki Y., Kasezawa N., Tohyama K., and Goda T., Self-reported faster eating is positively associated with accumulation of visceral fat in middle-aged apparently healthy Japanese men. *Eur. J. Nutr.* 査読有, 53: 1187-1194, 2014

15) Hariya N., Mochizuki K., Inoue S., Saito M., Fuchigami M., and Goda T., Switching Insulin -glucosidase inhibitors to miglitol reduced glucose fluctuations and circulating cardiovascular disease risk factors in type 2 diabetic Japanese patients. *Drugs R. D.* 査読有, 14: 177-184, 2014

16) Honma, K., Masuda, Y., Mochizuki, K., and Goda, T., Re-feeding rats a high -sucrose diet after 3 days starvation enhances histone H3 acetylation in transcribed region and expression of jejunal GLUT5 gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有, 78: 1771-1773, 2014

17) Morishita, S., Mochizuki, K., and Goda, T., Bindings of ChREBP and SREBP1, and

histone acetylation around the rat liver fatty acid synthase gene are associated with induction of the gene during suckling-weaning transition. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 査読有, 60: 94-100, 2014

〔学会発表〕(計 26 件)

- 1) Goda, T., Molecular regulations of mucosal maltase expressions, Starch digestion consortium workshop: Complimentary starch feeding of the young child, Dec, 2016, Houston, USA
- 2) Honma K., et al., Combination therapy with  $\alpha$ -glucosidase inhibitor and DPP-4 inhibitor in patients with type 2 diabetes mellitus. The 21<sup>th</sup> Shizuoka Forum on Health and Longevity, Nov, 2016, Shizuoka, Japan
- 3) 本間一江ら、「ヒストンアセチル化を介した小腸消化吸收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、兵庫
- 4) 今井千裕ら、「好中球エラスターゼ活性阻害剤の食後高血糖動物モデルへの投与は動脈硬化関連遺伝子の発現を低下させる」第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会、2016 年 5 月、京都
- 5) 望月和樹ら、「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」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同学会、2015 年 12 月、神戸
- 6) 山田有紀ら、「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」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同学会、2015 年 12 月
- 7) 今井千裕ら、「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」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同学会、2015 年 12 月、神戸
- 8) Imai C. et al., Suppression of the vascular endothelial damage-related genes by inhibiting neutrophil elastase activity in type 2 diabetic model OLETF rats. The 20<sup>th</sup> Shizuoka Forum on Health and Longevity, Oct, 2015, Shizuoka, Japan
- 9) Yamada A. et al., Regulation of fructose inducible genes in the liver by the bromodomain protein Brd4. The 20<sup>th</sup> Shizuoka Forum on Health and Longevity, Oct, 2015, Shizuoka, Japan
- 10) 針谷夏代ら、「低栄養ストレスによる発達

期の 2 型糖尿病発症メカニズム～転写因子 FOXO1 を介した異所性脂肪細胞分化～」第 4 回日本 D0HaD 研究会学術集会、2015 年 5 月、東京

- 11) 今井千裕ら、「2 型糖尿病自然発症 OLETF ラットへのアナグリプチンの長期投与は肝臓における白血球浸潤マーカーの発現を抑制する」第 58 日本糖尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月、山口
- 12) 山田有紀ら、「エピゲノム因子 Brd4 は肝臓と骨格筋におけるインスリンシグナル伝達経路に關与する」第 58 日本糖尿病学会年次学術集会、2015 年 5 月、山口
- 13) Honma K., et al., The effect of starvation in weaning period on diet-related changes in the expression of inflammation-related genes in the adipose tissue. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, May, 2015, Yokohama, Japan
- 14) Hariya N., et al., Putative PPAR target genes express highly in skeletal muscle of insulin-resistant MetS model SHR/NDmc-cp rats. 12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition, May, 2015, Yokohama, Japan
- 15) Goda T., Pharm-food efficacy and epigenetic inflammation biomarkers. The 2nd International Conference on Pharma and Food, Nov, 2014, Shizuoka, Japan
- 16) Honma K., et al., The effect of starvation in weaning period on diet-related changes in the expression of inflammation-related genes in peripheral leukocytes. The 19<sup>th</sup> Shizuoka Forum on Health and Longevity, Nov, 2014, Shizuoka, Japan
- 17) Goda N. et al., Identification of the SNPs altering microRNA binding affinity in the type 2 diabetes susceptible genes. The 19<sup>th</sup> Shizuoka Forum on Health and Longevity, Nov, 2014, Shizuoka, Japan
- 18) Imai C. et al., Transient high glucose exposure promotes subsequent inductions of inflammation-related genes and the histone acetylation around the genes in human monocyte-like THP-1 cell. The 19<sup>th</sup> Shizuoka Forum on Health and Longevity, Nov, 2014, Shizuoka, Japan
- 19) 山田有紀ら、「フルクトースによる肝臓脂肪合成関連遺伝子の発現変動におけるプロモドメインタンパク質 Brd4 の関与」第 67 回日本栄養・食糧学会中部支部大会、2014 年 11 月、静岡

- 20) 今井千裕ら、「短期間の高グルコース刺激がヒト単球様 THP-1 細胞の炎症関連遺伝子の発現に及ぼす影響」第3回日本 DOHaD 研究会学術集会、2014年7月、東京
- 21) 藤井貴子ら、「離乳期の低栄養による小腸糖質消化吸收関連遺伝子の食事に対する応答性の変化」第3回日本 DOHaD 研究会学術集会、2014年7月、東京
- 22) 合田敏尚、生活習慣病バイオマーカーを活用した DOHaD への先制医療、第3回日本 DOHaD 研究会学術集会、シンポジウム「先制医療をみすえた栄養学分野の DOHaD への取り組み」2014年7月、東京
- 23) 下田恭子ら、「糖質摂取制限による空腸マルターゼ・グルコアミラーゼ遺伝子のヒストン修飾を介した発現抑制機構」第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月、札幌
- 24) 本間一江ら、「離乳期低栄養とその後の食餌組成が末梢血白血球における炎症関連遺伝子の発現に及ぼす影響」第68回日本栄養・食糧学会大会、2014年5月、札幌
- 25) 内山弓子ら、「短期間の2型糖尿病モデル OLETF ラットの骨格筋における代謝制御シグナルに及ぼす DPP-4 阻害薬の影響」第57日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月、大阪
- 26) 青木信悟ら、「日本人女性において血清 ALT 値は皮下脂肪面積よりも内臓脂肪面積とより強く関連する」第57日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月、大阪

〔図書〕(計 件)

- 1) Mochizuki K., Hariya N, Honma K., and Goda T., Relationship between epigenetic regulation, dietary habits, and the developmental origins of health and disease theory. Congenit. Anom (Kyoto), in press, 2017
- 2) 合田敏尚、「幼少期栄養環境とバイオマーカー」最新医学、70(5), 82-87, 2015
- 3) 望月和樹ら、「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, 30 (9), 83-88, 2015

〔産業財産権〕  
なし

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/nutrphys/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

市川 陽子 (ICHIKAWA, Yoko)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授  
研究者番号：50269495

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)  
山梨大学・大学院総合研究部・教授  
研究者番号：80423838

本間 一江 (HONMA, Kazue)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教  
研究者番号：80724765

(3) 連携研究者

小林 公子 (KOBAYASHI, Kimiko)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
研究者番号：90215319