

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 28 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591330

研究課題名(和文) 膵島エピゲノム変化による耐糖能異常進展過程に関するゲノム網羅的解析

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of epigenomic alterations in pancreatic islets from mice under the risk of developing glucose intolerance

研究代表者

南茂 隆生 (NAMMO, Takao)

独立行政法人国立国際医療研究センター・代謝疾患研究部・室長

研究者番号：50594115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の発症・進展には、遺伝因子と環境因子の寄与が重要であるが、その分子機構についてはほとんど明らかでない。近年、糖尿病領域でも病態の背景として、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を調節するエピゲノムの関与が想定されている。そこで、本研究では膵β細胞を標的とし、その機能制御におけるエピゲノムの関与を網羅的に解析した。結果として、高脂肪食を摂取させた肥満モデルマウス(代償期モデルマウス)、糖尿病モデルマウスにはcis発現調節領域に特徴的なエピゲノム変化が認められ、多くの近接する遺伝子の発現変化とも関連することが判明した。以上の成果は、疾患メカニズム解明および治療標的探索のために重要である。

研究成果の概要(英文)：Both genetic and environmental factors play important roles in the aetiology of diabetes, although the molecular mechanisms underlying the disease remain largely unclear. These days, epigenetic regulation of gene expression, which results from changes in a chromosome without alterations in the DNA sequence, has drawn attention to the field of diabetes research. The aim of this study was to clarify the involvement of epigenetic mechanisms in the regulation of pancreatic beta-cell function and glucose metabolism by genome-wide analyses. By testing mouse models, such as diet-induced obese mice and spontaneously diabetic mice, we found the cis-regulatory regions exhibited changes in the epigenome that were characteristic for the model. Furthermore, these effects were associated with changes in the expression of overlapping or adjacent genes. In summary, these results suggest the importance of genome-wide study of epigenome for clarifying disease mechanisms and identifying new drug targets.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常 エピジェネティクス 2型糖尿病 環境因子 ヒストン修飾 膵ランゲルハンス島 インスリン分泌 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病の発症・進展に、遺伝因子と環境因子それぞれの寄与と、相互作用が重要であることは論をまたないが、その分子機構についてはほとんど明らかでない。塩基配列の変化をとまわずに遺伝子発現を調節する、いわゆるエピジェネティクスが発生・分化や、がんを中心とした様々な病態で注目されてきた (Nature 447: 433-440, 2007)。また、糖尿病・代謝領域でも、慢性に経過し、変遷してゆく病態の背景としてエピゲノムの関与が想定されている (Diabetes 58:2718-2725, 2009; Trends Endocrinol. Metab. 21:223-229, 2010)。特に慢性高血糖や、胎内栄養環境が後年の表現型を決定する現象を中心にエピゲノムの関与が検討されているが、病態との関連はまだほとんど不明であった。そこで本研究では、糖代謝調節に特に重要な膵細胞を標的にして、その機能制御におけるエピゲノムの関与を網羅的に解析し、病態解明の突破口とすることを考えた。

(2) ゲノムワイド関連解析によって、当研究部の安田らが報告した KCNQ1 (Nat. Genet. 40:1092-1097, 2008) をはじめ、40 か所以上もの 2 型糖尿病関連多型が同定されていた (N. Engl. J. Med. 363: 1551-1589, 2010)。そのほとんどは、イントロンや遺伝子間領域など、タンパク質をコードしない非コード領域の一塩基多型 (SNP) であったが、このような領域の機能的意義を検討するためにはエピジェネティクスの研究手法が威力を発揮する。申請者は、開放型クロマチンを効率的に得る Formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) という方法に着目し、次世代シーケンサーを用いた解析を組み合わせて (FAIRE-Seq)、2 型糖尿病の病態に主要な役割を果たしているヒト膵島のクロマチン状態をゲノム網羅的に検討した (Gaulton, K.J., Nammo, T. et al. Nat. Genet. 42: 255-259, 2010)。その結果、多くの 2 型糖尿病関連 SNP がヒト膵島の開放型クロマチン領域内に存在していることがはじめて明らかとなった。特筆すべきことに、2 型糖尿病と最も強く関連する TCF7L2 遺伝子イントロンの SNP (rs7903146) が膵島選択的な開放型クロマチン領域に見出され、本 SNP は局所的なクロマチン構造の変化をもたらす、近接する遺伝子の発現を cis に調節するエンハンサー活性の変化を生じることが判明した。このように遺伝子の作用にも、エピゲノムが関与しうることを初めて明らかにした。

(3) 環境因子の影響によってエピゲノム変化がダイナミックに起こり得ることも明らかとなりつつあった。神経細胞において脱分極刺激による細胞内への  $Ca^{2+}$  流入に伴い、転写コアクチベータである CBP 結合部位として観察されるエンハンサーがゲノム上に多数誘導され、種々の遺伝子発現変化に関与す

ることが示された (Nature 465: 182-187, 2010)。また、転写コアクチベータ Mediator complex と cohesin complex が、細胞に対する外的刺激によってエンハンサー部位にリクルートされ、コアプロモーターとのループ構造形成に関連することも報告された (Genome Res. 20:578-588, 2010; Nature 467: 430-435, 2010)。これらは、環境因子の変化に対して組織・細胞特異的な適応反応がゲノム上に起こり、細胞の表現型変化をもたらす例であると考えられた。

(4) 膵島細胞の場合、肥満や過食などの環境要因によってインスリン抵抗性に慢性的に曝露されると、膵島は増大し、インスリン分泌の亢進を示す (Diabetes 59: 1192-1201, 2010)。また、こうした代償が破綻すれば、糖尿病の発症に至る。このような代償反応やその破綻の背景には、外的因子 (脂肪酸など) が直接、あるいはインスリン分泌亢進をとまなう  $Ca^{2+}$  流入などを介して、上述のような転写因子や転写コアクチベータの反応に加え、ヒストン修飾や DNA メチル化の変化といった“エピジェネティックメモリー”と呼ばれる状態を惹き起こしている可能性が考えられた。また、塩基配列の多型によってこれらの反応に障害を来すことにより、糖尿病の発症と関連する可能性もあり、遺伝因子と環境因子の相互作用メカニズムとして注目された。遺伝子発現データを含め、他のエピゲノム情報を同時に検討することによって、それぞれのデータの全体像が明らかとなり、膵島生物学および糖尿病の病態に対する理解を発展させることができるものと期待された。

## 2. 研究の目的

糖尿病の病態にエピゲノム変化が関与している可能性が示されつつあるが、その本態はほとんど明らかにされていない。申請者は、2 型糖尿病と最も強く関連する一塩基多型がヒト膵島においてエピゲノム変化を起こすことを見出した。また、様々な環境因子が細胞のエピゲノム変化を惹き起こしうるといふエビデンスも数多く示されつつある。耐糖能異常の発症・進展において膵細胞機能低下は病態の中心であるが、申請者は、背景に存在する遺伝子発現変化に対するエピゲノムの関与を、モデルマウス膵島のクロマチン状態を網羅的に解析することによって明らかにし、糖尿病発症機序の解明および新たな治療標的の同定に役立てる。

## 3. 研究の方法

(1) C57Bl/6J マウスに 60%高脂肪食 (HFD) を摂取させることにより肥満マウスを作製し、同時に通常食を摂取させた非肥満マウスも作製する。HFD 摂取 4 週間後および 27 週間後に膵島を採取し、次世代シーケンサーを用いた解析によってゲノム網羅的なエピゲノム状態 (ChIP-Seq) と遺伝子発現解析 (RNA-Seq) を行った。

(2) 近交系化された自然発症糖尿病モデルマウスである KK マウスについても検討を行った。このマウスモデルは、遺伝素因が均一であるにもかかわらず、糖尿病の経過は飼育環境によって大きく左右される。この点に着目し、無作為に二群に分けた KK マウスを、観察期間中に糖尿病の発症群（実験群）と非発症群（対照群）に分けることに成功した。実験群で血糖値が上昇する以前の「観察早期」と、高血糖が顕性化した「観察後期」において膵島を採取し、次世代シーケンサーを用いた解析によってエピゲノム状態と遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) HFD 摂取 C57Bl/6J マウスモデル：  
10 週齢から 4 週間、あるいは 27 週間にわたって HFD を摂取させた。いずれも、随時血糖に上昇は認められなかった。比較的短期間（4 週間）の HFD 負荷ではマウスの体重増加はわずかであり、腹腔内のブドウ糖負荷後には早期のインスリン分泌反応が認められた。しかし、長期間の HFD 摂取後には体重の増加が大きく、IPGTT による耐糖能は悪化しており、ブドウ糖負荷後の早期インスリン分泌反応は低下していた。これらのマウス膵島を採取し、活性化プロモーター・エンハンサーのマーカであるヒストン修飾 H3K27ac の ChIP (Chromatin immunoprecipitation) を行い、次世代シーケンサーによって ChIP-Seq 解析を行った。また、同膵島サンプルからトータル RNA も抽出し、RNA-Seq を行った。全ヒストン修飾 H3K27ac のピーク領域の中で、11,066 箇所において HFD 群の H3K27ac エンリッチメントが対照群よりも有意に増加しており、プロモーター/エンハンサー活性の増大が推察された。これらのプロモーター/エンハンサーには、7,335 種類の遺伝子が隣接あるいはオーバーラップしていることが確認された。GREAT (Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool, Nat. Biotechnol. 2010) を用いて生物学的な機能性を検討したところ、タンパク質フォールディングをはじめ細胞の代償機能と関連する遺伝子が多く含まれていることが判明した。さらに、RNA-Seq を用いた発現解析を行ったところ、HFD 摂取による H3K27ac の増大反応は、多くの隣接あるいはオーバーラップする遺伝子の発現上昇と関連していることが明らかとなった。

マウスに対し高脂肪食を摂取させると、肥満および耐糖能の増悪が認められた。膵島ゲノムにおいては、多くの領域において、ヒストン H3K27 のアセチル化が亢進することが明らかとなった。これらヒストン修飾の変化は、近接する遺伝子の発現上昇を伴うことが多く、膵島機能の代償性変化に関連するものと考えられた。

(2) KK マウス (近交系化自然発症糖尿病モデル)：

上述の HFD マウスは、随時血糖の上昇がほとんど認められなかったことから、体重増加に伴って増大するインスリン需要に対し、代償機序が働いているものと考えられた。そこで、糖尿病の発症機序を検討する目的には、近交系化された自然発症糖尿病モデルマウスの KK マウスを用いた。HFD マウスと同様に、H3K27ac の変化と遺伝子発現変化には関連が認められた。観察早期においては、実験群でも高血糖は顕性化せず、代償機序が働いていた可能性がある。この時期の膵島においては、H3K27ac が変化している全ゲノム領域のうち、過半数は対照群と比較してシグナルが増加しており、近傍の遺伝子発現を活性化する方向に変化していた。しかし、実験群で高血糖が観察される観察後期になると、シグナルの増加した H3K27ac の領域数は、シグナルの減少した領域数を下回っていることを見出した。観察後期においてシグナルの増加していた H3K27ac は、機能的な面においても代償機序の発現には不十分であったものと考えられた。糖尿病の経過中に、病態の責任臓器において、環境因子の変化や代償機序の破綻と対応して変化するヒストン修飾および遺伝子発現をゲノム網羅的に捉えた報告は未だ認められない。本研究の成果は、疾患メカニズム解明および治療標的探索を目的とした今後の研究において重要なインパクトを持ち、有用性を発揮するものと考えられた。

#### 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 11 件)

南茂 隆生、安田 和基、膵 細胞分化過程におけるエピゲノム変化、内分泌・糖尿病・代謝内科、Vol. 38、No. 4、2014、pp. 376-383  
<http://www.kahyo.com/item/B201404-384>

Pasquali L, Gaulton KJ, Rodríguez-Seguí SA, Mularoni L, Miguel-Escalada I, Akerman I, Tena JJ, Morán I, Gómez-Marín C, van de Bunt M, Ponsa-Cobas J, Castro N, Nammo T, Cebola I, García-Hurtado J, Maestro MA, Pattou F, Piemonti L, Berney T, Gloyn AL, Ravassard P, Gómez-Skarmeta JL, Müller F, McCarthy MI, Ferrer J, Pancreatic islet enhancer clusters enriched in type 2 diabetes risk-associated variants.

Nat Genet. 46:136-143, 2014.

DOI: 10.1038/ng.2870.

Nishimura W, Eto K, Miki A, Goto M, Kawaguchi M, Nammo T, Udagawa H, Hiramoto M, Shimizu Y, Okamura T, Fujiwara T, Yasuda Y, Yasuda K, Quantitative assessment of Pdx1 promoter activity in vivo using a secreted luciferase reporter system.

Endocrinology. 154:4388-4395, 2013

DOI: 10.1210/en.2012-2248.

南茂 隆生、安田 和基、膵内分泌「糖尿病の体質と環境：膵 細胞のエピジェネティクス」、日本体質医学会雑誌、査読なし、Vol.75、No.2、2013、pp. 54-57

南茂 隆生、安田 和基、膵 細胞におけるエピゲノム制御、週刊 医学のあゆみ、査読あり、Vol.244、No.12、2013、pp. 1051-1056  
<http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=924412&AC=12344>

Morán I, Akerman I, van de Bunt M, Xie R, Benazra M, Nammo T, Arnes L, Nakić N, García-Hurtado J, Rodríguez-Seguí S, Pasquali L, Sauty-Colace C, Beucher A, Scharfmann R, van Arensbergen J, Johnson PR, Berry A, Lee C, Harkins T, Gmyr V, Pattou F, Kerr-Conte J, Piemonti L, Berney T, Hanley N, Gloyn AL, Sussel L, Langman L, Brayman KL, Sander M, McCarthy MI, Ravassard P, Ferrer J, Human cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes.

Cell Metab. 16:435-448, 2012

DOI: 10.1016/j.cmet.2012.08.010.

南茂 隆生、安田 和基、特集 病態と遺伝子多型 糖尿病、森 正樹(編) SURGERY FRONTIER、査読なし、Vol.19、No.1、2012、pp. 15-21

[http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J18\\_19\\_01](http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J18_19_01)

Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe S, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T, KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma.

Nat Med. 18:375-377, 2012.

DOI: 10.1038/nm.2644.

Nammo T, Rodríguez-Seguí SA, Ferrer J, Mapping open chromatin with formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements.

Methods Mol Biol. 791:287-296, 2011.

DOI: 10.1007/978-1-61779-316-5\_21.

南茂 隆生、Jorge Ferrer、FAIRE-seq を用いたヒト膵島における開放型クロマチンの網羅的同定、岡芳知、谷澤幸生(編) 糖尿病学 2011、査読あり、2011、pp.39-45

<http://www.shindan.co.jp/books/index.php?menu=10&cd=185700&kbn=1>

南茂 隆生、安田 和基、ヒト膵島を使った研究。安田和基(編著): 別冊プラクティス 糖尿病とヒトゲノム Q&A、査読あり、2011、pp. 137-139

<http://www.ishiyaku.co.jp/search/detail>

s.aspx?bookcode=760320

〔学会発表〕(計 9 件)

南茂 隆生、宇田川陽秀、川口 美穂、衛藤 弘城、上番増 喬、平本 正樹、西村 渉、安田 和基、ゲノム網羅的解析を用いた、高脂肪食摂取による膵島の代償機序の解明、NGS 現場の会・第三回研究会、平成 25 年 9 月 4 日・5 日、神戸

南茂 隆生、宇田川陽秀、川口 美穂、衛藤 弘城、上番増 喬、平本 正樹、西村 渉、安田 和基、A genome-wide investigation into the mechanisms of islet compensation induced by a high-fat diet、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 25 年 5 月 16 日、熊本

南茂 隆生、膵内分泌「糖尿病の体質と環境：膵 細胞のエピジェネティクス」シンポジウム「Common disease の体質と環境」、第 62 回日本体質医学会総会、平成 24 年 11 月 4 日、大阪

南茂 隆生、膵島組織のエピゲノム解析と糖尿病、第 9 回東北糖尿病トータルケア研究会、平成 24 年 10 月 19 日、仙台

南茂 隆生、上番増 喬、宇田川 陽秀、衛藤 弘城、川口 美穂、西村 渉、平本 正樹、安田 和基、膵 細胞株を用いた、分泌刺激による遺伝子発現変化と FAIRE によるクロマチン状態の評価、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 24 年 5 月 19 日、横浜

南茂 隆生、安田 和基、シンポジウム 8: 糖尿病の遺伝子関連 高頻度病態から稀少疾患まで 膵 細胞のエピジェネティクス、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 24 年 5 月 18 日、横浜

南茂 隆生、次世代シーケンサーを用いたヒト膵島のエピゲノム解析と糖尿病、第 10 回山口糖尿病フォーラム、平成 24 年 1 月 23 日、山口

南茂 隆生、FAIRE-seq を用いたヒト膵島のゲノム網羅的解析と 2 型糖尿病、第 11 回 Islet Biology 研究会、平成 23 年 7 月 16 日、東京

〔図書〕(計 1 件)

南茂 隆生、安田 和基、羊土社、non-coding RNA による代謝調節 春日雅人(編): 糖尿病学イラストレイテッド、2012、pp. 274-277

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.rincgm.jp/department/dia/02/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南茂 隆生 (NAMMO, Takao)  
国立国際医療研究センター研究所  
代謝疾患研究部・室長  
研究者番号：50594115

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：