

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790920

研究課題名(和文) 過剰栄養による膵細胞におけるインスリン遺伝子とIRS2遺伝子のエピゲノム修飾

研究課題名(英文) Long-Term Pancreatic Beta Cell Exposure To High Levels of Glucose but not Palmitate induces DNA Methylation within the Insulin Gene Promoter and represses Transcriptional Activity

研究代表者

恒川 新 (Tsunekawa, Shin)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40612768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満や糖尿病などの代謝疾患は遺伝的素因と環境因子が相互作用し発症する。近年、環境因子のエピゲノム修飾を介した代謝疾患への関与が注目されている。我々は過剰栄養状態による膵細胞でのインスリン遺伝子のエピゲノム修飾を検討した。長期間の高グルコース曝露は膵β細胞のインスリン遺伝子のメチル化増加とインスリン遺伝子発現低下を来した。この分子基盤には高グルコース下でのメチル化関連酵素の変化と膵β細胞への異所性脂肪沈着が重要であると判明した。糖尿病における不可逆的な膵細胞機能低下と高血糖自体によるエピゲノム修飾の関与が想定された。

研究成果の概要(英文)：Genetic and environmental factors influence the development of type 2 diabetes, and especially nutritional condition is a major component of environmental factor. Recently, DNA methylation of Insulin gene promoter has been reported to suppress insulin gene expression and be elevated in the subject with diabetes. Our study demonstrated that under over-nutritional condition, glucotoxicity, but not lipotoxicity, was essential for DNA methylation of Insulin gene promoter as well as insulin expression in pancreatic beta cell. Glucotoxicity increased the DNA methylation in time- and glucose concentration- dependent manner. Glucotoxicity increased DNA methyltransferase activity and decreased ten-eleven-translocation hydroxylase activity. Ectopic triglyceride accumulation was increased parallel to DNA methylation by glucotoxicity in pancreatic beta cells. This study helps to clarify the effect of an over-nutrition state on DNA methylation of the Ins1 promoter in pancreatic beta cells.

研究分野：糖尿病学

キーワード：エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

肥満や2型糖尿病などの代謝疾患は遺伝的素因と環境因子が相互に作用し発症する。近年、環境因子のエピゲノム修飾を介した代謝疾患への関与が注目されている。2型糖尿病患者の膵β細胞では、Insulin 遺伝子 (*Ins*) プロモーターのDNAメチル化模様が変化しており、*Ins* 発現と負の相関がみられるという報告がある。特に cAMP response element (CRE) でのDNAメチル化が最も遺伝子発現に関与していると報告されている。また、CREは膵β細胞の増殖、新生に重要である Insulin receptor substrate2 遺伝子 (*Irs2*) のプロモーターにも存在し、その遺伝子発現に影響している。

### 2. 研究の目的

今回我々は、過剰栄養による2型糖尿病の進行には *Ins*、*Irs2* におけるエピゲノム修飾が関与していると考え、各遺伝子プロモーターのCREにおけるDNAメチル化と遺伝子発現の関与を検討した。

### 3. 研究の方法

膵β細胞株 (INS-1細胞) を多様な糖濃度と脂肪酸濃度 (通常群: Glucose 11.2 mM、糖毒性群: Glucose 22.4 mM、脂肪糖毒性群: Glucose 22.4 mM, Palmitate 0.4 mM、脂肪毒性群: Glucose 11.2 mM, Palmitate 0.4 mM) で14日間培養し *Ins* と *Irs2* mRNA 量とそれぞれの遺伝子プロモーター CRE におけるDNAメチル化を評価した。各 mRNA 量はリアルタイムPCR法で評価した。*Ins* と *Irs2* プロモーターのDNAメチル化は pyrosequence 法と bisulfite sequence 法で評価した。14日間培養後の細胞を用いて、グルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) を評価した。DNAメチル化と遺伝子発現の関与は *Ins1* プロモーターを用い Luciferase Assay で評価した。また糖毒性条件下において、脱メチ

ル化 5-Aza-2'-deoxycytidine を添加し *Ins* mRNA 量の変化を評価した。さらにDNAメチル化誘導機序を解明する為、DNAメチル化誘導酵素 (DNMT) 活性とDNA脱メチル化酵素 (TET) 活性、酸化ストレス、小胞体ストレス、細胞内中性脂肪 (TAG) 蓄積の関与を検討した。糖毒性条件下に2型糖尿病治療薬 Metformin を添加し、*Ins* mRNA 量、*Ins* プロモーター CRE (*Ins1*-CRE) におけるDNAメチル化、TAG蓄積への影響を検討した。糖尿病モデル Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットの膵島での *Ins1*-CRE DNAメチル化を評価した。

### 4. 研究成果

14日間の糖毒性、脂肪糖毒性培養により *Ins* mRNA 量は有意な低下を認めしたが、*Irs2* mRNA 量は変化を認めなかった (Fig. 1A)。14日間の負荷培養後の *Ins1*-CRE DNAメチル化は、糖毒性の存在下に増加を認めた (通常群:  $4.0 \pm 0.4\%$ 、脂肪糖毒性群:  $4.6 \pm 0.4\%$ 、糖毒性群:  $15.3 \pm 0.8\%$ 、脂肪糖毒性群:  $16.3 \pm 0.4\%$ ) (Fig. 1B)。一方、*Irs2* プロモーターのCREにおけるDNAメチル化は4群間において差を認めず、糖毒性によるDNAメチル化誘導はインスリン遺伝子に特徴的であった。また糖毒性による *Ins1*-CRE DNAメチル化は培養時間と培養グルコース濃度依存性に増加した (Fig. 1C-F)。脂肪糖毒性培養後の細胞ではGSISの低下を認めしたが、*Ins1*-CRE DNAメチル化の増加を認めなかった (Fig. 1G-I)。

糖毒性による *Ins* プロモーターでのDNAメチル化誘導はCRE以外のCpG部位においても確認された (Fig. 2A)。*Ins1* プロモーターを用いた Luciferase Assay では、メチル化された *Ins1* プロモーターでは刺激のない定常状態においてプロモ-

ター活性は 90%以上低下を認めた。またメチル化 *Ins 1* プロモーターでは cAMP 刺激に対するプロモーター活性増加は完全に消失した (Fig. 2C)。脱メチル化剤は糖毒性培養下における *Ins* mRNA 量の低下を有意に改善した (Fig. 2D)。

糖毒性培養では有意な *Dnmt1* mRNA 量の増加と DNMT 活性増加を認めた (Fig. 3A-B)。また TET 活性の有意な低下を認めた (Fig. 3D)。酸化ストレス、小胞体ストレスは *Ins* mRNA 量を有意に低下させたが、*Ins1*-CRE DNA メチル化には影響しなかった (Fig. 4A-B, E-F)。また、糖毒性条件下における酸化ストレス改善剤、小胞体ストレス改善剤の添加は、*Ins1*-CRE DNA メチル化への影響を認めなかった (Fig. 4C-D, G-H)。

細胞内 TAG 蓄積は糖毒性の存在下で増加し、その蓄積パターンは *Ins1*-CRE DNA メチル化と同様であった (Fig. 5A)。Metformin 添加は糖毒性条件下において *Ins* mRNA 量を増加し、細胞内 TAG 蓄積を減少し、*Ins1*-CRE DNA メチル化を低下した (Fig. 5B-D)。

ZDF ラットの膵島では *Ins1*-CRE DNA メチル化が有意に増加していた (Fig. 6)。

#### 〔考察〕

本研究は、長期間の高グルコース曝露が *Ins1*-CRE DNA メチル化を、グルコース濃度依存性、時間依存性に増加させたことを示した。我々の知る限り本研究は、高グルコースによるインスリン遺伝子での DNA メチル化修飾の詳細機序を検討した初めての報告である。

糖毒性の主要機序は酸化ストレスと小胞体ストレスであることが知られている。酸化ストレスや小胞体ストレスによるエピゲノム修飾誘導を介した遺伝子発現への影響が報告されているが、本研究では両ストレスによる *Ins1*-CRE DNA メチル化への影

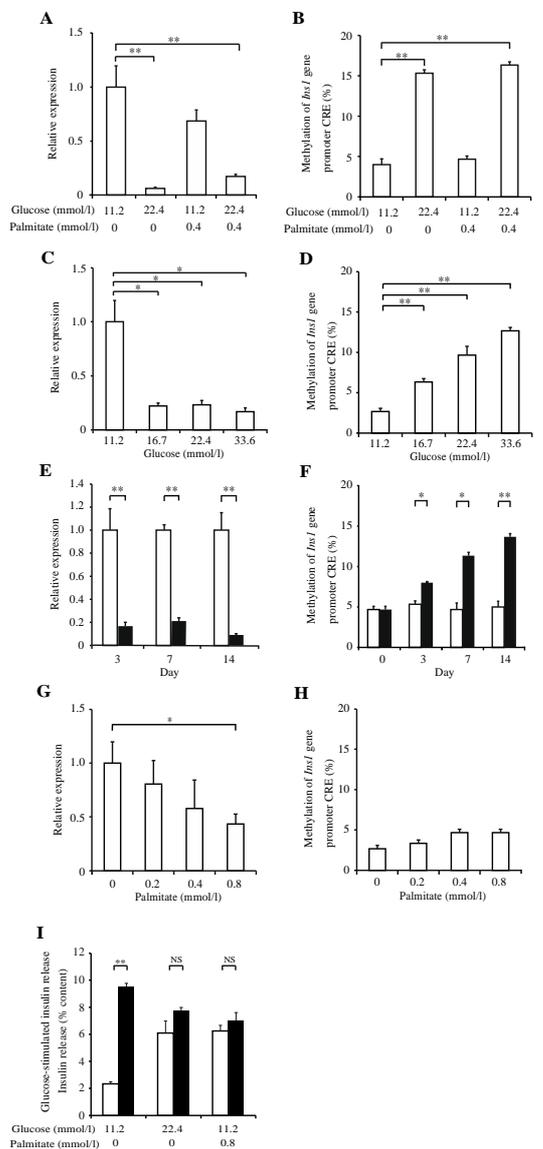
響は認めなかった。

14 日間の 22.4 mM 高グルコース培養による *Ins1*-CRE DNA メチル化誘導の機序としては、DNMT 活性増加によるメチル化誘導の増加と、TET 活性低下による脱メチル化機序の低下が考えられた。

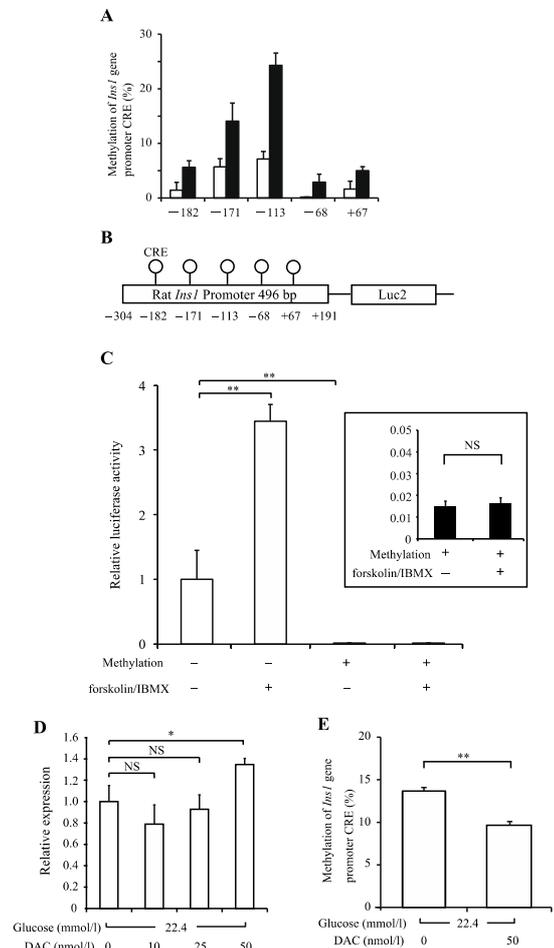
糖毒性条件下における脱メチル化剤添加は *Ins* mRNA 量を有意に増加させたが、その増加は非常に限定的であった。しかし、この脱メチル化を介した *Ins* mRNA 量増加の蓄積が、糖尿病における進行性のインスリン遺伝子発現低下の改善に寄与すると考えられた。

#### 〔結語〕

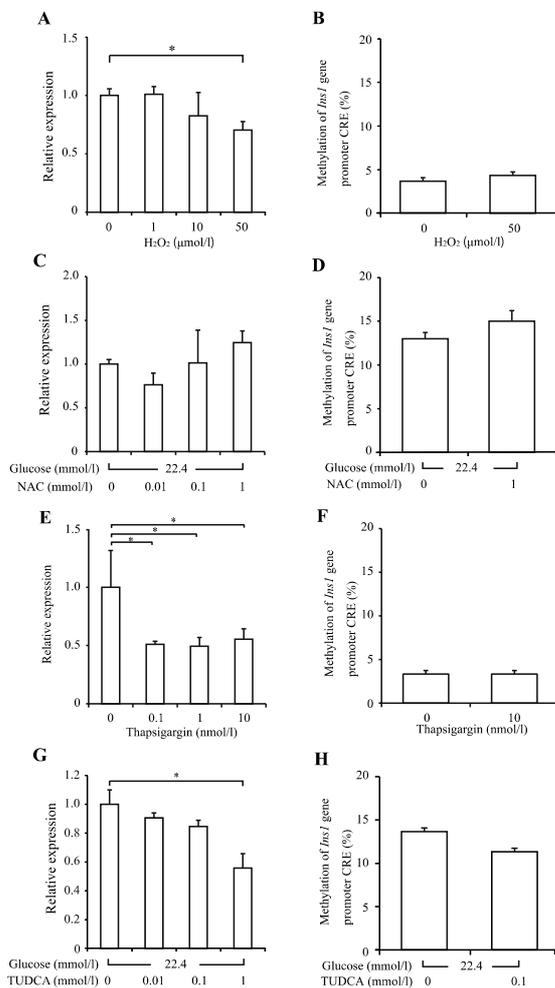
長期間の高グルコース曝露はインスリン遺伝子プロモーター CRE における DNA メチル化増加とインスリン遺伝子発現低下を来した。2 型糖尿病における不可逆的な膵 β 細胞機能低下には、長期間の高グルコースによるインスリン遺伝子プロモーターにおけるエピゲノム修飾の関与が想定された。Metformin にはインスリン遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化低下を介した抗糖尿病効果をもつ可能性が示唆された。



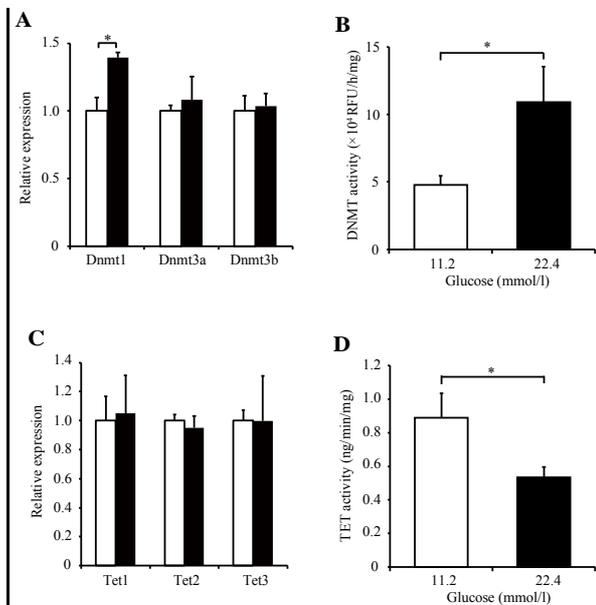
**Figure 1. Insulin mRNA levels and DNA methylation of the *Ins1* promoter in high-glucose conditions.** (A-D) INS-1 cells were cultured for 14 days. (E and F) under normal-culture-glucose (11.2 mmol/l; white bar) or experimental-high-glucose (22.4 mmol/l; black bar) conditions. (G and H) INS-1 cells cultured in 11.2 mmol/l glucose conditions with palmitate for 14 days. Insulin mRNA levels (A, C, E, and G) were examined by real-time PCR analysis. DNA methylation of the *Ins1* promoter (B, D, F, and H) was examined by pyrosequencing analysis. (I) INS-1 cells were cultured for 14 days under the indicated conditions. Following this, GSIS was performed with low glucose (2.8 mmol/l; white bar) or high glucose (16.7 mmol/l; black bar) for 30 min. All results are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



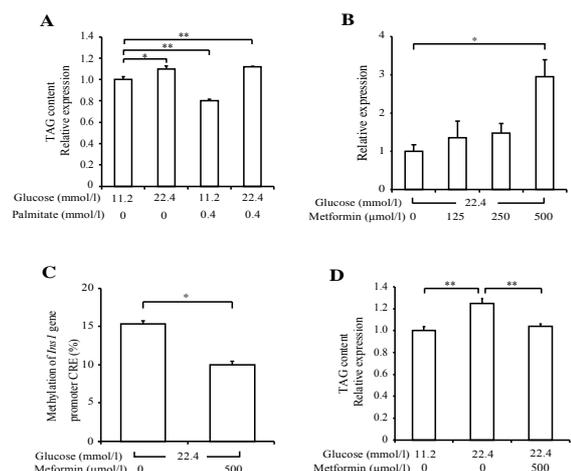
**Figure 2. The contribution of DNA methylation of the *Ins1* promoter.** (A) INS-1 cells were cultured under normal-culture-glucose (11.2 mmol/l; white bar) or experimental-high-glucose (22.4 mmol/l; black bar) conditions for 14 days. DNA methylation of the *Ins1* promoter was examined by bisulfite sequencing analysis. (B) A diagram of the 496-bp rat *Ins1* promoter (position -304 to +191 bp relative to the transcription start site) in luciferase reporter plasmids. The positions of CpG sites are represented by lollipop markers. (C) Methylated (black bar) or mock-methylated (white bar) rat *Ins1* promoter-transfected INS-1 cells were incubated at 5.6 mmol/l glucose with/without cAMP-increasing agents, 1  $\mu$ mol/l forskolin and 10  $\mu$ mol/l IBMX (forskolin/IBMX), for 3 h. Luciferase activities are presented as relative expression compared with the mock-methylated vectors without forskolin/IBMX stimulation. The inset shows a magnified image of the methylated vector. (D and E) INS-1 cells were treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine (DAC) for the last 3 days of the 14-day incubation under 22.4 mmol/l high glucose conditions, and the medium containing DAC was changed every 24 h. Insulin mRNA levels (D) were examined by real-time PCR. DNA methylation of the *Ins1* promoter (E) was examined by pyrosequencing analysis. All results are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Figure 3. The effect of a high-glucose state on DNMT and TET in INS-1 cells.** (A-D) INS-1 cells were cultured under normal-culture-glucose (11.2 mmol/l; white bar) or experimental-high-glucose (22.4 mmol/l; black bar) conditions for 14 days. The *Dnmt* (A) and *Tet* (C) mRNA levels were examined by real-time PCR. DNA methyltransferase (DNMT) (B) and ten-eleven-translocation methylcytosine dioxygenase (TET) (D) activities were examined by ELISA. All results are mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ ). Asterisks indicate statistically significant difference ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ).

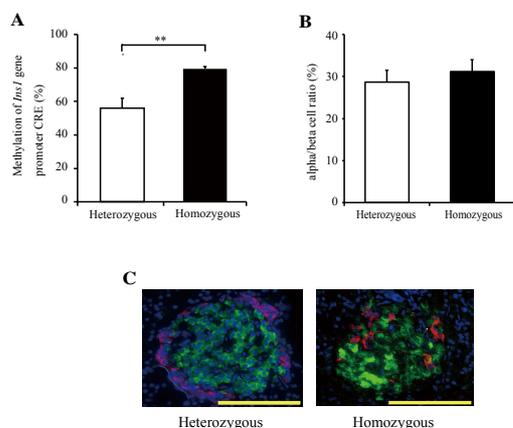


**Figure 4. Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress did not induce DNA methylation of *Ins1* promoter.** INS-1 cells were cultured for 14 days under the following conditions: (A and B) with  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 11.2 mmol/l glucose; (C and D) with N-acetyl-cysteine (NAC) in 22.4 mmol/l glucose; (E and F) with thapsigargin in 11.2 mmol/l glucose; and (G and H) with tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) in 22.4 mmol/l glucose. Insulin mRNA levels (A, C, E, and G) were examined by real-time PCR. DNA methylation of the *Ins1* promoter (B, D, F, and H) was examined by pyrosequencing analysis. All results are means  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ).



**Figure 5. Metformin improved insulin mRNA levels, intracellular triacylglycerol (TAG) content, and DNA methylation of *Ins1* promoter.** (A) INS-1 cells were cultured in glucose and palmitate for 14 days. (B-D) INS-1 cells were cultured with metformin for 14 days. Intracellular TAG levels (A and D) were examined by ELISA, insulin mRNA levels (B) were examined by real-time PCR, and DNA methylation of the *Ins1* promoter

(C) was examined by pyrosequencing. All results are means  $\pm$  SEM ( $n \geq 4$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



**Figure 6. DNA methylation of *Ins1* promoter in pancreatic islets from male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats.** (A) DNA methylation of the *Ins1* promoter was examined by pyrosequencing analysis in the pancreatic islets isolated from 12-week-old ZDF rats. (B) The alpha/beta cell ratio was calculated in islets isolated from heterozygous and homozygous ZDF rats. (C) Isolated pancreases were immunostained for insulin (green), glucagon (red), and DAPI (blue) in heterozygous and homozygous ZDF rats. Scale bars indicate 100  $\mu$ m. Results are mean  $\pm$  SEM. A:  $n = 4$  rats. B:  $n = 90$  islets from 3 rats per group. Asterisks indicate statistically significant differences (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 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 1 件)

Ishikawa K, Tsunekawa S, Ikeniwa M, Izumoto T, Iida A, Ogata H, Uenishi E, Seino Y, Ozaki N, Sugimura Y, Hamada Y, Kuroda A, Shinjo K, Kondo Y, Oiso Y.

“Long-term pancreatic beta cell exposure to high levels of glucose but not palmitate induces DNA methylation within the insulin gene promoter and represses transcriptional activity.” PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0115350. 2015. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

2013年5月16日 熊本県 熊本市 ホテル日航熊本

第56日位日本糖尿病学会年次学術集会

「Insulin 遺伝子 (Ins) と IRS2 遺伝子 (IRS2) promoter のメチル化と遺伝子発現の関与を検討」

石川孝太、池庭 誠、泉本貴子、飯田淳史、尾方秀忠、清野祐介、濱田洋司、恒川 新、大磯ユタカ

2013/6/1 米国 シカゴ

74th AmericaDiabetes Associtaiton Scientific Sessions

“Elevated glucose and fatty acids synergized to increase DNA methylation of insulin gene promoter in pancreatic beta-cells, and Metformin decreased the elevated methylation”

Kota Ishikawa, Shin Tsunekawa, Takako Izumoto, Atsushi Iida, Hidetada Ogata, Tetsuji Okawa, Atsushi Fujiya, Eita Uenishi, Yusuke Seino, Yoji Hamada, Yutaka Oiso

2013年12月7日 大阪府 豊中市 千里阪急ホテル

第25回分子糖尿病シンポジウム

「過剰栄養による膵 細胞における Insulin1 遺伝子でのエピゲノム修飾の検討」

石川孝太、池庭 誠、泉本貴子、飯田淳史、尾方秀忠、清野祐介、濱田洋司、恒川 新、大磯ユタカ

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

恒川 新; (TSUNEKAWA, Shin)  
名古屋大学医学部附属病院・助教  
研究者番号：40612768

(2)研究分担者

無し