

15. エピゲノム因子 Brd4 を介したインスリン抵抗性誘導機構

望月 和樹

山梨大学 生命環境学部 地域食物科学科 食品栄養学研究部門

Key words : BRD4, ヒストンアセチル化, インスリン抵抗性

緒言

脂肪組織における過剰な脂肪の蓄積は、インスリン感受性脂肪細胞からインスリン抵抗性脂肪細胞への形質変容を誘導し、脂肪合成・蓄積関連遺伝子および他のアディポカインなどのインスリン感受性遺伝子の発現を劇的に低下させる。さらに、このアディポサイトカインの分泌変動などにより、骨格筋におけるグルコースの取り込みの低下、肝臓における脂肪合成経路および糖新生経路の活性化、白血球（好中球、単球、マクロファージなど）における炎症性サイトカイン・白血球遊走因子（IL-1 β 、TNF- α 、CD11c など）の遺伝子発現の増大¹⁾を介し、2型糖尿病などの生活習慣病の発症が促進される。

近年、我々は、細胞内グルコース濃度に応答し、遺伝子発現を増大させる制御機構として、エピゲノム制御機構があることを発見した。エピゲノム機構とは、後天的な情報すなわちヒストン修飾やDNAのメチル化修飾などのエピゲノム情報によって制御される機構のことである。我々は、糖質摂取による肝臓および脂肪組織における脂肪合成関連遺伝子、小腸糖質消化吸収関連遺伝子の糖質摂取および高血糖に伴う発現上昇時には、ヒストンH3、H4のアセチル化修飾およびアセチル化ヒストンに結合する新規エピゲノム因子BRD4と転写伸長促進因子（P-TEFb）の複合体の結合がそれら遺伝子の転写領域において著しく促進されることを発見した²⁻⁴⁾。上記の知見をふまえ本研究では、“BRD4は、細胞内のグルコース濃度に応答し糖応答遺伝子の転写伸長反応を調節するエネルギーセンサー因子であるとともに、インスリン感受性細胞からインスリン抵抗性細胞への変容を決定づける新規エピゲノム因子である”という仮説を検証した。

方法

1. ヒト単球様 THP-1 細胞を、低グルコース培地（5 mM）、高グルコース培地（25 mM）、高グルコース培地に (+)-JQ1（BRD4-アセチル化ヒストン結合阻害剤、終濃度 100 nmol/L）で 24 時間培養したのちに（0day）、すべての培地を低グルコース培地に交換し、さらに 2-4 日間培養し細胞を回収した。
2. 雌性 C57BL/6J マウスに、低糖質/高脂質食³⁾を 1 週間与えたのちに、4 時間絶食下において、23.7 %のグルコース水溶液もしくは 23.7 %のフルクトース水溶液（1.61 mL/100 g of body weight）、またフルクトース水溶液に、(+)-JQ1（0.74 μ g/100 g of body weight）を添加したものを 3 時間おきに 2 回経口投与を投与し、6 時間後に屠殺し肝臓を採取した。
3. 3T3-L1 細胞に脂肪分化誘導【分化誘導培地（10 % ウシ胎児血清、0.5 mM IBMX、2 μ M Dex、1.74 μ M インスリンを含む DMEM で 2 日間培養】終了後 4 日目から 24 時間 5 ng/mL TNF- α を投与し、細胞を回収した。
4. 3T3-L1 細胞に脂肪分化誘導【分化誘導培地で 4 日間培養】終了後 6 日目から 5 ng/mL の TNF- α および各種脂肪酸【酪酸（C4）、ヘキサ酸（C6）、カプリル酸（C8）、カプリン酸（C10）、パルミチン酸（C16）】を終濃度 1,000 μ M で投与し、48 時間後に細胞を回収した。

遺伝子発現量を Real-time RT-PCR 法によって、遺伝子周辺のヒストン修飾および BRD4 の結合をクロマチン免疫沈降法で調べた。データは、平均値 ± 標準誤差で示した。統計的有意は $P < 0.05$ とした (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$)。

結果

1. BRD4 阻害による炎症関連遺伝子の発現抑制

THP-1 細胞を高グルコース培地で 24 時間培養し、その後低グルコース培地に換えて 2 - 4 日間培養した後の TNF- α の mRNA 発現量および TNF- α 遺伝子周辺 (特に転写領域) のヒストン H3 のアセチル化修飾および BRD4 の結合は、低グルコース培地で培養した細胞と比較して高かった。これらの誘導は、(+)-JQ1 の投与によって抑制された。(図 1)。

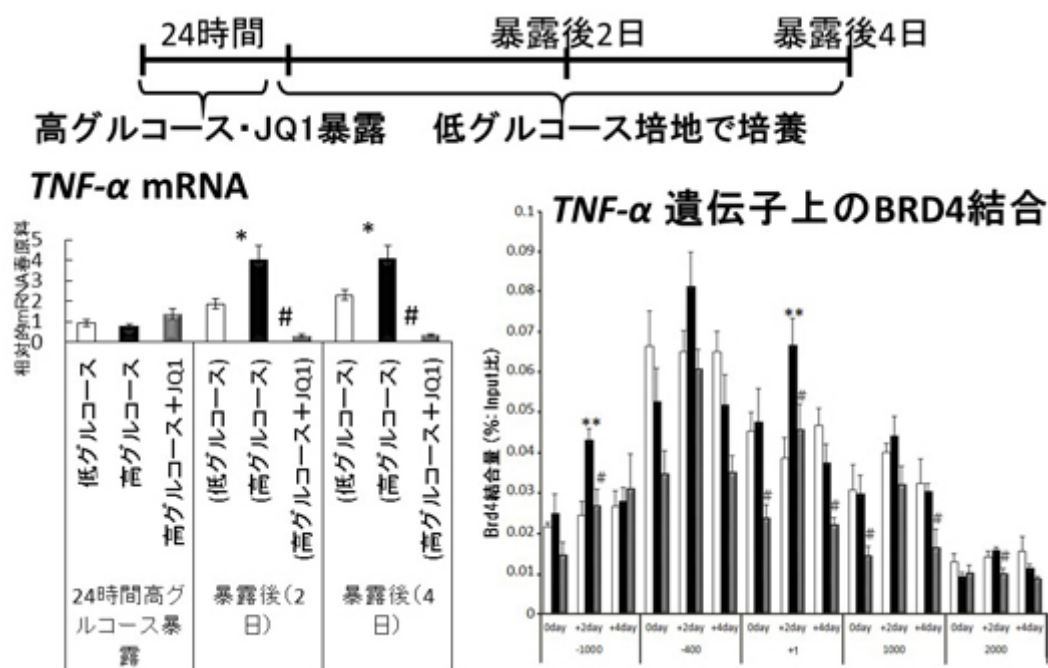


図 1. BRD4 阻害による炎症関連因子の発現抑制

平均値 ± 標準誤差で示した。統計的有意は $P < 0.05$ とした (Student t -test: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$)。

2. BRD4 阻害による肝臓脂質代謝関連遺伝子の発現抑制

脂質代謝関連遺伝子 (*Cyp8b1*, *Plin5*) の発現はフルクトースの強制投与によって増大すること、(+)-JQ1 を共投与によって低下することが明らかとなった。これら遺伝子近傍のヒストン H3, H4 のアセチル化修飾や BRD4 の結合が、グルコース強制投与群に比較してフルクトース強制投与群で高い傾向を示した。フルクトース摂取によるこれらの誘導は、(+)-JQ1 の投与によって低下もしくは低下する傾向が観察された (図 2)。

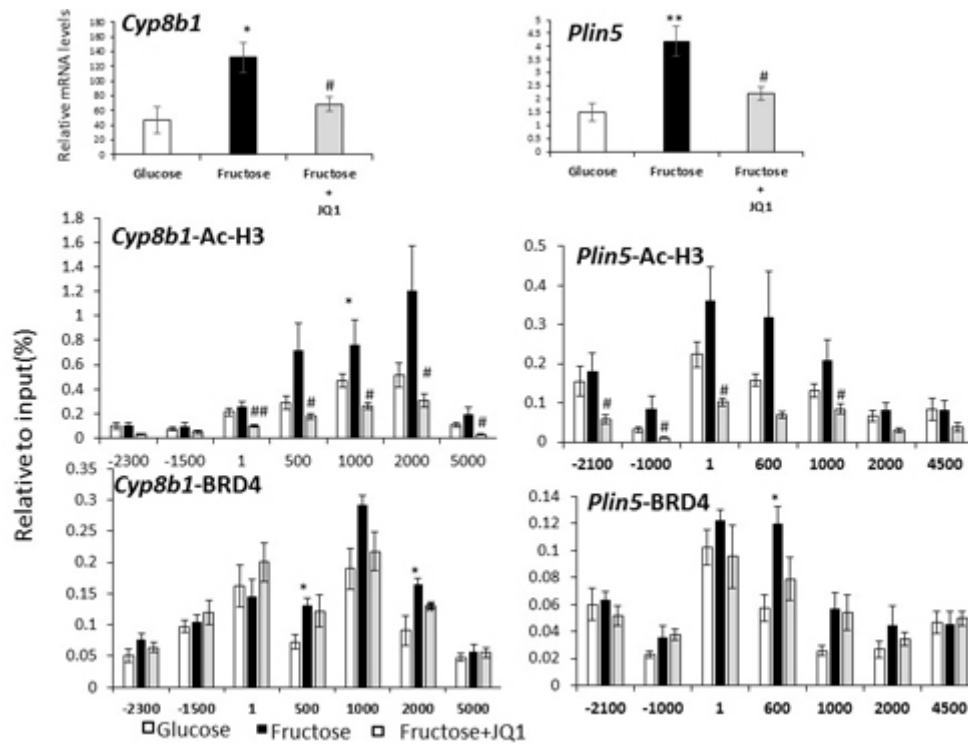


図2. BRD4 阻害による肝臓の脂質代謝遺伝子発現の抑制

平均値±標準誤差で示した。統計的有意は $P < 0.05$ とした (Student *t*-test: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$)。

3. インスリン抵抗性脂肪細胞における BRD4 の不活性化

3T3-L1 脂肪細胞に TNF- α を投与すると、脂肪分化関連遺伝子であるアディポネクチン (Apm1)、脂肪の合成・蓄積に関与するグルコース輸送担体 (Glut4) やグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Gpd1)、リポタンパク質リパーゼ (Lpl) の遺伝子発現量が低下した。Lpl 遺伝子周辺 (特に転写領域) の BRD4、CDK9、アセチル化ヒストンの結合は、TNF- α の投与によって顕著に低下した (図3)。

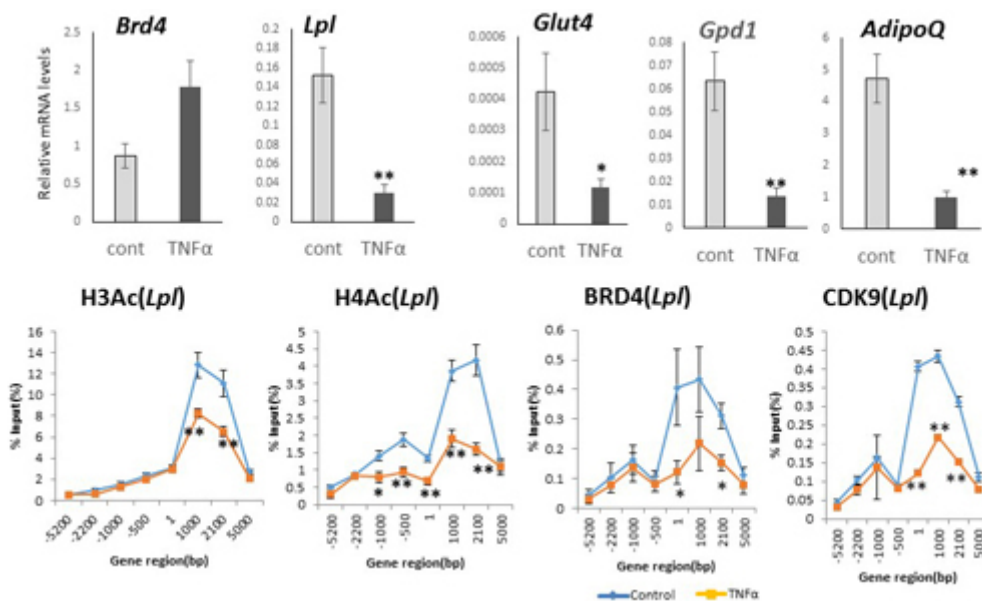


図3. インスリン抵抗性脂肪細胞における BRD4 の不活性化

平均値 \pm 標準誤差で示した。統計的有意は $P < 0.05$ とした (Student *t*-test: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$)。

4. 脂肪細胞における中鎖脂肪によるヒストンアセチル化の活性化

3T3-L1 脂肪細胞に TNF- α を投与すると、Cidec や Gpd1 などの脂質代謝関連遺伝子の発現遺伝子の発現量が低下した。これらの遺伝子発現は、酪酸、カプリン酸投与もしくはその両方の投与で増大した。Gpd1 と Cidec 遺伝子周辺のヒストン H3 および H4 のアセチル化量は、TNF- α 投与により低下するとともに、その低下は短鎖および中鎖脂肪酸の投与により抑制された (H3 Cidec : C4, C8, C10 ; Gpd1 : C8, C10, H4Cidec : C8) (図 4)。

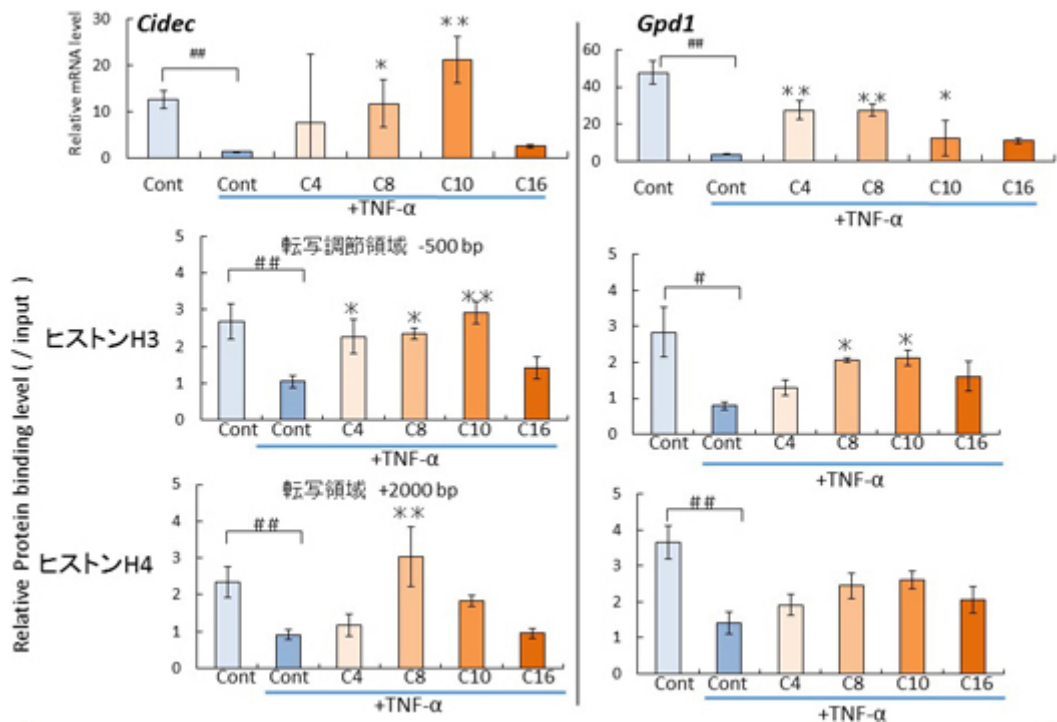


図4. 脂肪細胞における中鎖脂肪酸によるヒストンアセチル化の活性化

平均値±標準誤差で示した。統計的有意は $P < 0.05$ とした (二元配置分析: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$)。

考 察

本研究によって、糖刺激が、単球様細胞における $TNF-\alpha$ の発現を増大させること、肝臓における脂肪合成関連遺伝子の発現を増大させることが明らかとなった。特に、単回の高グルコース刺激が長期間にわたって持続すること、糖刺激による遺伝子発現増大には、ヒストンアセチル化修飾およびエピゲノム因子 BRD4 が関与することを明らかにした。さらに、BRD4アセチル化ヒストン結合阻害剤 (+)JQ1 を共投与すると、これら遺伝子発現の増大が抑制された。これらの研究成果は、ヒストンアセチル化修飾およびエピゲノム因子 BRD4 が、糖質のシグナルを受容し、蓄積させることによって生活習慣病の発症を促進する可能性が高いことを示唆している。

一方、脂肪細胞における脂肪蓄積関連遺伝子である *Lpl*, *Glut4*, *Gpd1*, *AdipoQ* の発現および *Lpl* 遺伝子の転写領域におけるヒストンアセチル化修飾、BRD4転写伸長因子 P-TEFb の結合が $TNF-\alpha$ 投与によって低下することを明らかにした。インスリン抵抗性脂肪細胞では、インスリン作用の低下により GLUT4 の膜移行の低下により細胞内へのグルコースの取り込みが低下する。よって、 $TNF-\alpha$ によるヒストンアセチル化修飾および BRD4 の結合低下には、インスリン抵抗性による細胞内グルコース低下が原因である可能性が考えられた。さらに、短鎖・中鎖脂肪酸を投与するとこれらの遺伝子の発現および転写領域のヒストン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、脂肪細胞における短鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸がヒストンアセチル化修飾を促進することによってインスリン抵抗性を改善する可能性を示唆している。今後、短鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸の投与によって BRD4 の脂質蓄積関連遺伝子の転写領域への結合が増大するかを調べると必要がある。

以上により、BRD4 は、細胞内のグルコース濃度に応答し糖応答遺伝子の転写伸長反応を調節するエネルギーセンサー因子であるとともに、インスリン感受性細胞からインスリン抵抗性細胞への変容を決定づける新規エピゲノム因子であることが明らかとなった。さらに、BRD4 の活性を正常に維持することが、2 型糖尿病などの生活習慣病の予防および治療に重要である可能性が示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、山梨大学医学部の針谷夏代特任助教、静岡県立大学食品栄養科学部栄養生理学研究室の合田敏尚教授、静岡県立大学食品栄養科学部栄養生理学研究室の本間一江助教である。

文 献

- 1) Fujimoto, S. et al. Insulin resistance induced by a high-fat diet is associated with the induction of genes related to leukocyte activation in rat peripheral leukocytes. *Life sciences* 87, 679-685, doi:10.1016/j.lfs.2010.10.001 (2010).
- 2) 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, 877-883, doi:10.1016/j.nut.2015.01.005 (2015).
- 3) Mochizuki, K., Honma, K., Shimada, M. & Goda, T. The regulation of jejunal induction of the maltase-glucoamylase gene by a high-starch/low-fat diet in mice. *Molecular nutrition & food research* 54, 1445-1451, doi:10.1002/mnfr.200900467 (2010).
- 4) Inoue, S., Honma, K., Mochizuki, K. & 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* 31, 366-372, doi:10.1016/j.nut.2014.07.017 (2015).