

主論文の要旨

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

膵β細胞において長期間のパルミチン酸ではなく高グルコース暴露はインスリン遺伝子プロモーターにおけるDNAメチル化を誘導し、その転写を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：大磯 ユタカ 教授)

石川 孝太

〔諸言〕

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。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。

〔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。

〔結果〕

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)。脂肪毒性培養後の細胞では GSIS の低下を認めたが、*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ーター活性は 90%以上低下を認めた。またメチル化 *Ins1* 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 ラットの睥島では *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。