

FGF15/19 を介した糖代謝のエピゲノム制御

小塚 智沙代

申請時：琉球大学大学院 医学研究科 内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座（第二内科）

現在：理化学研究所生命医科学研究センター 疾患エピゲノム遺伝研究チーム

要旨

エピゲノム修飾は環境因子によって変化する。エピゲノム異常が生活習慣・環境に起因する肥満や糖尿病の発症リスクに関与する可能性が示唆されているが、その分子メカニズムは未だほとんど分かっていない。本研究ではアセチル化ヒストンに結合して転写を制御するプロモドメイン含有タンパク質 4 (Brd4) による糖代謝のエピゲノム制御について検討した。野生型のマウスに Brd4 阻害剤 JQ-1 を投与すると、高血糖と重度の耐糖能異常が生じた。このとき、インスリン感受性は個体レベルにおいても組織レベルにおいても変化しなかったが、インスリン分泌の低下を認めた。また、JQ-1 は小腸における線維芽細胞増殖因子 (FGF) 15 (マウス型) の発現を阻害し、肝臓における FGF 受容体 4 シグナルを低下させた。このような Brd4 阻害による糖代謝異常は、FGF19 (ヒト型) の過剰発現によって完全に回復し、高血糖が正常化した。そこで次にヒト腸管細胞を用いて、Brd4 が FGF19 の発現を制御するメカニズムを検討した。Brd4 が FGF19 のプロモーター領域に結合しており、JQ1 添加によって結合が阻害されることで FGF19 の発現が低下した。これらのことから、Brd4 が小腸における FGF15/19 と肝臓の FGF シグナルの新規転写制御因子であり、腸-肝連関を介して全身の糖代謝に寄与していることが明らかとなった。

内容

胎児期に受けた環境ストレスが出生後の肥満や糖尿病発症に影響していることが示され、そのメカニズムとしてエピゲノムが注目されている^{1, 2}。エピゲノムとは遺伝子発現を制御する DNA やヒストンへの後天的な化学修飾であり、環境ストレスに応答して変化する。どのようなエピゲノム修飾が胎児期につくられることで出生後の肥満や糖尿病を惹起しているのかは未だよくわかっていない。我々はこれまでに、胎児期の低栄養によって成長後に代謝疾患を発症するメカニズムに、胆汁酸-Fibrosoid X receptor (FXR) -Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) 経路 (図 1) により介在される腸-肝連関の異常が関与していることを

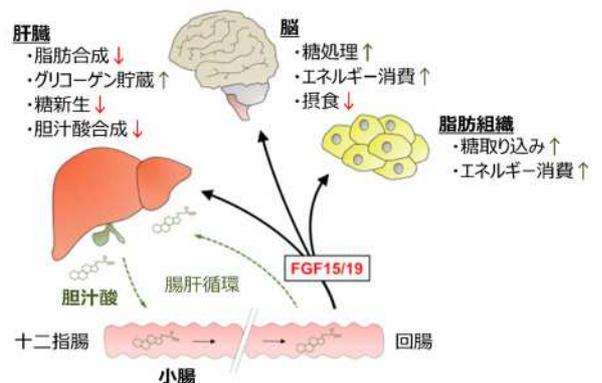


図 1 胆汁酸-Fibrosoid X receptor (FXR) -Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) 経路

食後に肝臓や胆嚢から分泌される胆汁酸が小腸において FGF 15/19 の分泌を促す。分泌された FGF15/19 は脳・肝臓・脂肪組織に作用し、血糖低下効果を発揮する*。
引用文献4より引用改変

報告してきた³。そこで胎児期の低栄養がエピゲノム変化を介して腸-肝連関に異常を起こしているのではないかと考え、本研究では小腸において作用し、全身の糖代謝調節に関与するエピゲノム調節因子を探索した。

FGF19 の発現を制御するエピゲノム制御因子を同定するため、ヒト腸管細胞株 HT-29 細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により FGF19 プロモーター領域への結合を調べた (図 2A)。その結果、アセチル化ヒストンに結合する転写調節因子である Bromodomain-containing protein 4 (Brd4) が FGF15/19 の発現変化を介した糖代謝の強力な調節因子であることを見出した。Brd4 が FGF19 のプロモーター領域上に結合し、Brd4 阻害剤である JQ-1 の添加により結合が阻害されると FGF19 の発現レベルも低下した (図 2B, C)。

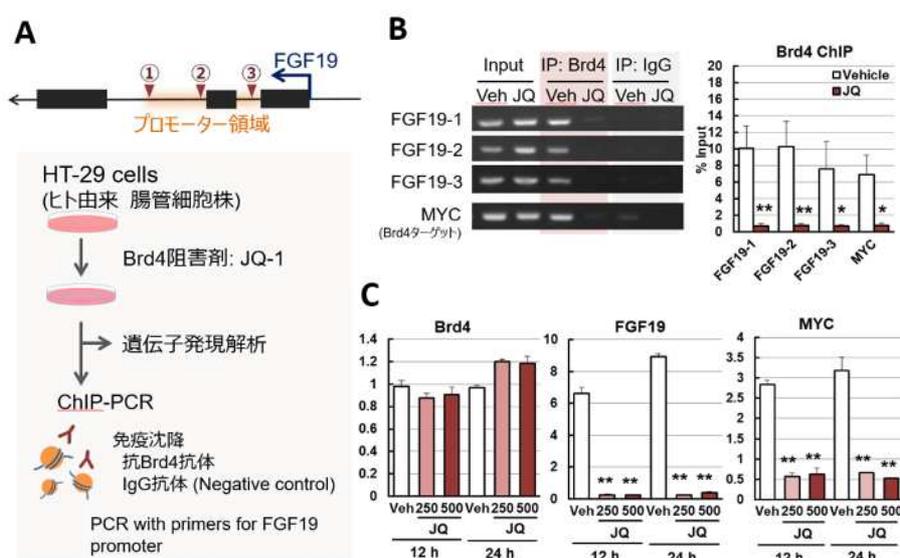


図 2 ヒト腸管細胞株 HT-29 細胞において、Brd4 は FGF19 のプロモーター領域に結合し、発現を制御する

(A) HT-29 細胞を用いたクロマチン免疫沈降。FGF19 のプロモーター領域上の 3 ヶ所にプライマーを設計し、Brd4 の結合を調べた。(B) 3 つの領域のいずれにおいても Brd4 が結合していた。Brd4 阻害剤 JQ-1 の添加により、結合は消失していた。(C) Brd4、FGF19、MYC の遺伝子発現。Brd4 の発現レベルには変化がなかったが、FGF19 の発現レベルは JQ-1 の添加により低下し、プロモーター領域への Brd4 の結合と相関していた。JQ-1 添加 250, 500 nM, 12-24h ($n = 4$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Veh)

そこで次に生体においても Brd4 が FGF15/19 の発現制御を介して糖代謝に影響しているのかを調べるため、マウスに JQ-1 を投与したところ (50mg/kg/day, ip)、高血糖や耐糖能異常を呈した (図 3A-C)。糖代謝異常が起こる機序を調べるため、インスリン感受性と膵臓からのインスリン分泌を解析した。空腹時の血中インスリン値に差はなかったが、グルコース投与後の血中インスリン値は JQ-1 投与マウスで減少した (図 3D)。JQ-1 は膵島サイズには影響を及ぼさなかったが、単離膵島からのインスリン分泌は低グルコース (2.9mmol/L) および高グルコース (20.2mmol/L) においてともに JQ-1 の添加により有意に減少した (図 3F, G)。次に、肝臓におけるグルコース代謝に対する JQ-1 の影響を調べた。JQ-1 投与マウスではグリセロール投与後の血糖上昇が亢進したことから、JQ-1 投与により糖新生が亢進していると考えられた (図 3E)。一方、グルコースクランプにより測定した肝臓におけるインスリン作用に差はなく、Akt リン酸化にも差はみられなかった。初代肝細胞においても JQ-1 の添加はインスリン刺激による Akt リン酸化に影響しなかった。これらのことから、JQ-1 はインスリンシグナ

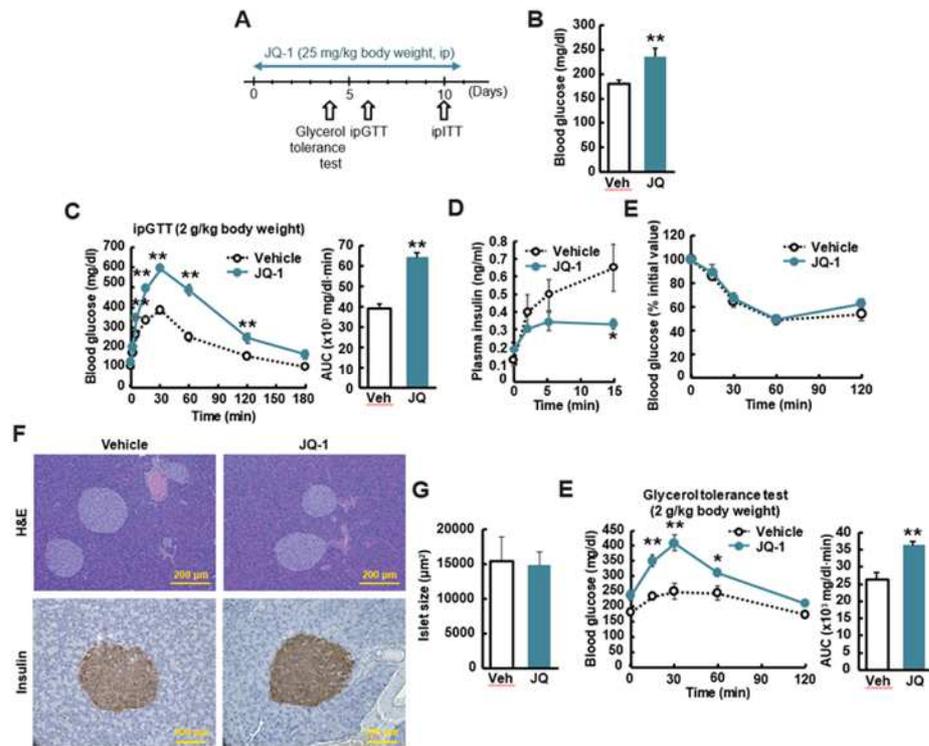


図3 マウスへのJQ-1投与により、耐糖能異常が生じる

(A, B) JQ-1 投与開始後 4 日目から高血糖が認められたことから、4 日目以降に耐糖能、インスリン感受性を評価した。(C) JQ-1 投与により糖負荷後の血糖上昇が悪化した。(D, E) JQ-1 投与群では糖負荷後の血漿インスリン値の低下を認めた。インスリン感受性には変化がなかった。(F, G) 膵島サイズは JQ-1 の投与では変化しなかった (>100 膵島/マウス)。(E) JQ-1 投与によりグリセロール負荷後の血糖上昇が亢進した。(n = 5-6, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs Veh)

ルとは独立した機序によって高血糖を引き起こしていると考えられた。さらに、JQ-1 を投与した時の小腸における FGF15 の遺伝子発現レベルを調べた。Brd4 は肝臓に比べて小腸において高発現しており (図 4A)、小腸が JQ-1 の主要なターゲットのひとつであると考えられる。しかし、JQ-1 の投与は小

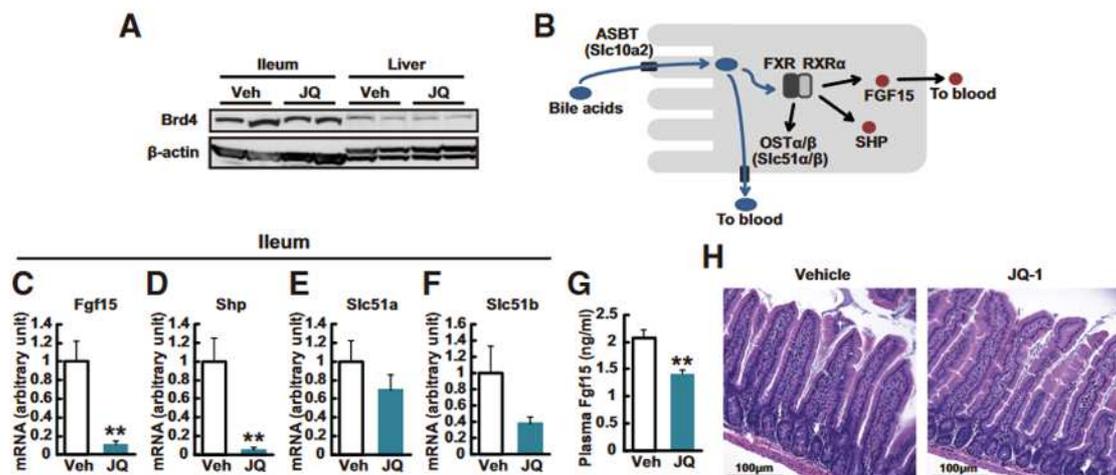


図4 JQ-1 は小腸における Fgf15 発現を減少させるが、絨毛構造は変化しない

(A) Brd4 は小腸 (ileum: 回腸) では高発現しているが、肝臓では発現が低い。JQ-1 投与は小腸、肝臓においてともに Brd4 の発現レベルには影響しない。(B) 腸管細胞における胆汁酸シグナルの模式図。(C-F) 小腸における胆汁酸シグナル伝達に関連する遺伝子のうち、Fgf15 と Sho の発現レベルのみが有意な低下を認めた。(G) 血漿中 Fgf15 値も JQ-1 の投与により低下した。(H) 小腸の柔毛構造に変化は認めなかった。(n = 5-6, ** p < 0.01 vs Veh)

腸の柔毛構造には変化を認めなかった (図 4H)。FGF15 は腸管細胞において胆汁酸をリガンドとする核内受容体 FXR により発現誘導される (図 4B)。そこで、胆汁酸/FXR 系にかかわる遺伝子の発現を調べたところ、JQ-1 投与マウスの小腸では、Fgf15 と Shp の発現レベルのみ発現低下を認めた (図 4C-F)。このとき、血中の FGF15 レベルも低下を認めた (図 4G)。

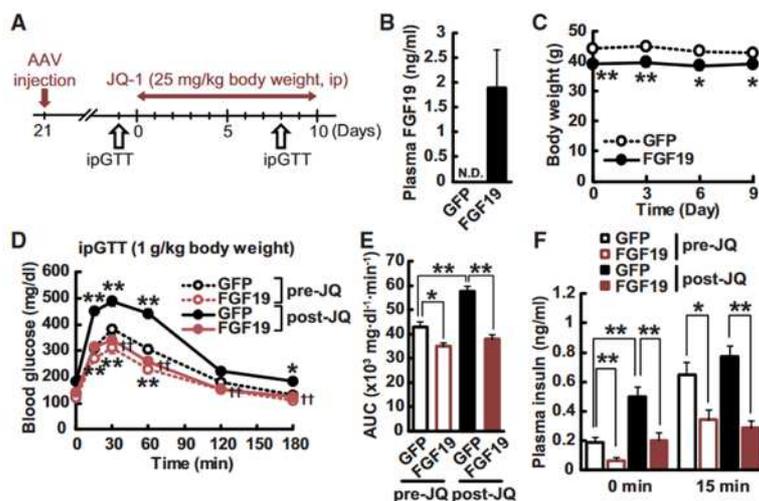


図 5 FGF19 の過剰発現により JQ-1 投与後の高血糖は改善する

(A, B) アデノ随伴ウイルスベクターによりマウスに FGF19 を遺伝子導入した。投与後 3 週間後には血漿中に FGF19 が検出された。(C) FGF19 の過剰発現により体重減少を認めたが、JQ-1 投与はコントロール群、FGF19 発現群いずれにおいても体重に影響しなかった。(D, E) コントロール群では JQ-1 投与後に耐糖能の悪化を認めたが、FGF19 発現群では JQ-1 投与後の耐糖能悪化は認められなかった。(F) FGF19 の過剰発現によりインスリン分泌の低下を認め、インスリン感受性の改善が示唆された。JQ-1 の投与は空腹時のインスリン分泌を上昇させていたが、グルコース投与後のインスリン分泌には影響しなかった。(n = 5-6, * p < 0.05, ** p < 0.01 vs GFP_pre-JQ, †† p < 0.01 vs FGF19_pre-JQ)

最後に JQ-1 投与による糖代謝異常が FGF15/19 を補充することで改善するのかを調べるため、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて FGF19 を遺伝子導入したマウスに JQ-1 (50mg/kg/day, ip) を投与し、耐糖能を評価した (図 5)。JQ-1 はコントロール群 (AAV-GFP) において、投与開始 4 日後から血糖値を上昇させたが、FGF19 発現群 (AAV-FGF19) では血糖値の変化は観察されなかった。10 日目にグルコース負荷試験を行ったところ、コントロール群においては JQ-1 投与により耐糖能異常がみられたが、FGF19 発現群では JQ-1 投与による耐糖能異常はみられなかった (図 5D, E)。以上のことから、エピゲノム制御に関わる Brd4 は小腸における FGF15/19 の新しい転写調節因子であり、FGF15/19 の発現変化を介して肝臓および全身の糖代謝調節に関与することが明らかになった。今後は胎児期の母体環境が糖尿病発症リスクを上昇させるメカニズムへの関与を検討していきたい。

引用文献

1. Roseboom T, de Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. *Early Hum Dev.* 2006;82(8):485-91.

2. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):17046-9.
3. Ma H, Sales VM, Wolf AR, Subramanian S, Matthews TJ, Chen M, et al. Attenuated Effects of Bile Acids on Glucose Metabolism and Insulin Sensitivity in a Male Mouse Model of Prenatal Undernutrition. *Endocrinology*. 2017;158(8):2441-52.
4. Jahn D, Rau M, Hermanns HM, Geier A. Mechanisms of enterohepatic fibroblast growth factor 15/19 signaling in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(6):625-35.

発表業績一覧

■論文

1. **Kozuka C**, Sales V, Osataphan S, Yuchi Y, Chimene-Weiss J, Mulla C, Isganaitis E, Desmond J, Sanechika S, Kusuyama J, Goodyear L, Shi X, Gerszten RE, Patti ME. Bromodomain inhibition reveals FGF15/19 as a target of epigenetic regulation and metabolic control. *Diabetes* 71:1023-1033, 2022.
2. Grizales AM, Patti ME, Lin AP, Beckman JA, Sahni VA, Cloutier E, Fowler KM, Dreyfuss JM, Pan H, **Kozuka C**, Lee A, Basu R, Pober DM, Gerszten RE, Goldfine AB. Metabolic Effects of Betaine: A Randomized Clinical Trial of Betaine Supplementation in Prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 103:3038-3049, 2018
3. Osataphan S, Macchi C, Singhal G, Chimene-Weiss J, Sales V, **Kozuka C**, Dreyfuss JM, Pan H, Tangcharoenpaisan Y, Morningstar J, Gerszten R, Patti ME. SGLT2 inhibition reprograms systemic metabolism via FGF21-dependent and -independent mechanisms. *JCI Insight* 4(5):e123130, 2019
4. Sheehan A, Goldfine A, Bajwa M, Wolfs D, **Kozuka C**, Piper J, Fowler K, Patti ME. Pramlintide for post-bariatric hypoglycaemia. *Diabetes Obes Metab* 24:1021-1028, 2022.

■学会発表

1. **Kozuka C**. A novel epigenetic mechanism whereby brown rice and its component, γ -oryzanol attenuates preference for dietary fat. The Japan-US Science Forum in Boston, Boston, USA, (November, 2017)
2. **Kozuka C**, Sales V, Yuchi Y, Osataphan S, Desmond J, Mulla C, Smith C, Qi J, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins play a pivotal role in glucose metabolism in mice. American Diabetes Association (ADA)

Research Symposium Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity, Boston, USA, (November, 2017)

3. **Kozuka C**, Sales V, L. Zhou, Osataphan S, Y. Yuchi, J. Chimene-Weiss, Desmond J, Mulla C, Smith C, Qi J, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins regulate glucose metabolism via gut-liver FGF15/19 pathway, Keystone eSymposia on Obesity: From Cell to Patient joint with Diabetes: Many Faces of the Disease, Online, USA, (February, 2021)
4. **Kozuka C**. Bromodomain inhibition reveals FGF15/19 as a target of epigenetic regulation and metabolic control. IMS-McGill Symposium, Montréal, Canada, (September, 2022)
5. **Kozuka C**, Sales V, Yuchi Y, Osataphan S, Desmond J, Mulla C, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins regulate glucose metabolism via bile acid-FXR-FGF15/19 pathway. 第 92 回 日本内分泌学会学術総会, 宮城, 2019 年 5 月
6. **Kozuka C**, Sales V, Yuchi Y, Osataphan S, Chimene-Weiss J, Desmond J, Mulla C, Dreyfuss J, Pan H, Patti ME. Bromodomain-containing proteins regulate FGF15/19 and glucose metabolism. 第 40 回 日本肥満学会, 東京, 2019 年 11 月
7. **小塚智沙代**. 留学はしたほうがよい? ~留学のメリット・デメリット~. 2020 年 第 93 回 日本内分泌学会学術総会 YEC 特別企画, Online, 2020
8. **小塚智沙代**. エピゲノムを標的とした新しい肥満医療を目指して, 第 41 回 日本肥満学会, 富山・Online, 2021 年 3 月
9. **小塚智沙代**, Patti ME. エピゲノム制御因子 Brd4 は小腸における FGF15/19 の発現調節を介して糖代謝を制御する, 第 32 回分子糖尿病学シンポジウム, 岐阜・Online, 2021 年 12 月