

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15762

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎におけるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文)Study of epigenetic regulation in nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

近田 裕美(CHIKADA, Hiromi)

東海大学・医学部・特別研究員

研究者番号：60712776

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 肝臓特異的B cell lymphoma6 (Bcl6)欠損マウスを用いた解析から、Bcl6が非アルコール性脂肪性肝炎発症に関与することを見出している。本研究ではその分子メカニズムを解明するために、Bcl6のエピジェネティックな活性に着目して解析を進める。293T細胞を用いてBcl6相互作用因子群を精製した結果、BCoRなどのBcl6の既知相互作用因子とともに、Zinc fingerを有する転写因子などの多数の新規相互作用分子の候補を同定した。今後は肝臓でのBcl6相互作用因子群を同定するとともに、Bcl6のエピジェネティックな活性の評価およびNASH病態との関連性を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは、脂質代謝の破綻に起因するメタボリックシンドロームの肝臓での表現型と考えられる。NASH患者の増加が予想される一方で、未だ根本的な治療法はない。本研究ではBcl6の分子機能としてエピジェネティックな活性に注目して、NASH発症との関連性を検証することにより、NASHの適切な治療標的を見出すことができると考えた。また、学術的にも肝臓のBcl6の分子機能については不明な点が多く、新規の知見を得ることができると期待した。

研究成果の概要(英文): We previously found that B cell lymphoma 6 (Bcl6) was involved in Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) progression by the analysis of liver specific Bcl6 knockout mice. In this study, we tried to analyze the Bcl6 function through the epigenetic regulation to elucidate the NASH progression mechanism. We performed the biochemical purification to identify Bcl6 interactants using Bcl6-overexpressed 293T cells. BCoR and p53, which were already known to interact with Bcl6 and the new factors including zinc finger transcription factors were identified as Bcl6 interactants. We began to identify the hepatic Bcl6 interactants and confirm the relation between the epigenetic activity and NASH progression.

研究分野：肝臓生物学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎NASH エピジェネティック制御 Bcl6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) NASH 治療法の確立が必要である

肥満などを原因として肝臓への過剰な脂肪蓄積が生じる脂肪肝は、酸化ストレスやサイトカインの異常な作用により、その一部で慢性炎症を発症する。この病態は非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis, NASH) と呼ばれ、肝硬変や肝ガンといった重篤な肝疾患へと進行する。NASH を制御する分子機構はいまだ不明な点が多く、根本的な治療法の開発には至っていない。NASH 発症メカニズムの解明により、適切な治療標的を見出すことができると期待される。

(2) Bcl6 は NASH 発症に関与する

我々は、肝機能を制御する転写因子群の解析を通して、転写因子 B cell lymphoma 6 (Bcl6) が肝臓の薬物代謝酵素遺伝子群の発現制御に関与することを見出した (Chikada et al., 2018)。一方で、Bcl6 は肝臓の脂質代謝に関与することが報告されている (LaPensee et al., 2014, Sommars et al., 2019)。しかしながら、Bcl6 が脂質代謝の破綻に起因する NASH 病態に関与するかは不明であった。そこで我々は、肝臓特異的 Bcl6 欠損マウス (Bcl6-LKO mice) を用いて実験的に誘導した NASH の病態変化を解析した。病態モデルとして、Choline-deficient, L-amino-acid-defined, high-fat diet (CDAHFD) の給餌による NASH 誘導系を用いた。この結果、野生型マウスに比べて、Bcl6-LKO mice では NASH による様々な病態が抑制されており、Bcl6 は NASH の発症や進展に関与することが示唆された (Chikada et al., in press)。

(3) NASH 発症にはエピジェネティックな変化を伴う

NASH モデルマウスを用いた解析から、ヒストンアセチル化 (Conti et al., 2014) やヒストンメチル化 (Fan et al., 2017) といったヒストン状態のエピゲノム変化が NASH 発症に関与することが示唆されている。このことから、NASH 発症におけるエピジェネティックな変化を解析することは、NASH 発症メカニズムの解明に必須の課題である。

(4) NASH における Bcl6 のエピジェネティックな分子機能を解析する

Bcl6 は遺伝子上流の特定の DNA 配列に結合するとともに (Cheng et al., 1996)、BCoR 等のコリプレッサー複合体構成因子群をリクルートすることでエピゲノム変化を制御することが示唆されている (Hyunh et al., 1998)。肝臓での Bcl6 下流の分子機能はほとんど不明であり、Bcl6 のエピジェネティックな遺伝子制御機構と NASH 発症の分子メカニズムの関連について解析した。

2. 研究の目的

(1) CDAHFD 給餌による NASH 誘導系にて、野生型と肝臓特異的 Bcl6 欠損マウスのヒストン修飾状態を評価し、Bcl6 により制御されるヒストン修飾を見出す。また、Bcl6 相互作用因子群の生化学的精製・同定により、Bcl6 と相互作用するエピジェネティック制御因子や転写制御因子を同定する。これらの検討により、Bcl6 のエピジェネティックな分子機能と NASH 発症との関連性を検証する。

(2) NASH 発症に関与する Bcl6 のエピジェネティックな機能を制御できる低分子化合物のスクリーニングを行い、NASH 病態への影響を検証することで、NASH 治療法の確立へ役立てる。

3. 研究の方法

Bcl6 のエピジェネティックな分子機能を明らかにするために、NASH 発症に関与する Bcl6 複合体の機能解析を行う。このため、Bcl6 相互作用因子群を生化学的に精製・同定することとした。Bcl6 を一過的に過剰発現させた 293T 細胞より、Bcl6 相互作用因子群を生化学的に精製・同定し、その相互作用を免疫沈降法により確認した。

4. 研究成果

(1) 293T 細胞における FLAG-hBcl6 過剰発現の確認および FLAG 精製系の構築

293T 細胞に FLAG-hBcl6 を一過的に過剰発現させ、核タンパク質を抽出した。この核タンパク質中に、FLAG-hBcl6 の過剰発現をウェスタンブロットングにて確認した。

Bcl6 相互作用因子群を精製するための条件検討として、過剰発現 FLAG-hBcl6 293T 細胞からの核抽出液と抗 FLAG® M2 抗体アフィニティーゲルを 4℃ で一晩インキュベートした後、FLAG ペプチドによる Bcl6 相互作用因子群の溶出を実施した。ウェスタンブロットングにより、FLAG-hBcl6 の溶出の確認および既知相互作用因子 BCoR と Bcl6 の相互作用を確認した。

以上の結果より、FLAG-hBcl6 過剰発現 293T 細胞を用いた Bcl6 結合タンパク質精製系を構築できたと判断した。

(2) 過剰発現 FLAG-hBcl6 293T 細胞からの Bcl6 相互作用因子群の精製および同定

(1)で構築した精製系を用いて、Bcl6 相互作用因子群を精製し、質量分析測定およびデータベース検索により同定した(図 1)。BCoR や p53 など既に Bcl6 と相互作用することが報告されている因子を同定できた。さらに、Zinc finger を有する転写因子などの多数の因子群が Bcl6 の新規相互作用分子の候補として同定された。Zinc finger を有する転写因子の他には、ヒストン修飾に関連のある因子群やインスリンシグナル、miRNA プロセッシングに関わる因子が含まれており、Bcl6 との関連性や NASH 病態との関連性について検証を進める。

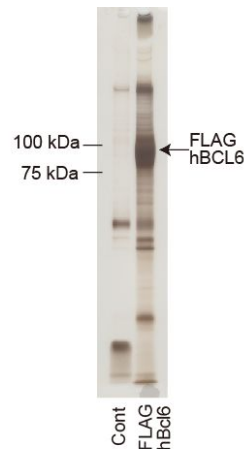


図 1 過剰発現 FLAG-hBcl6 293T 細胞の核抽出液を用いた FLAG 精製の結果

(3) 免疫沈降法による 293T 細胞における相互作用の確認

(2)で同定した Bcl6 相互作用因子の候補の中で、Factor A ~ C について、293T 細胞を用いた免疫沈降法により、相互作用を確認した(図 2)。その結果、細胞内でこれらのタンパク質と Bcl6 が相互作用していることを確認した。以上の結果から、293T 細胞において、Bcl6 の新規相互作用因子として、Factor A ~ C を同定した。

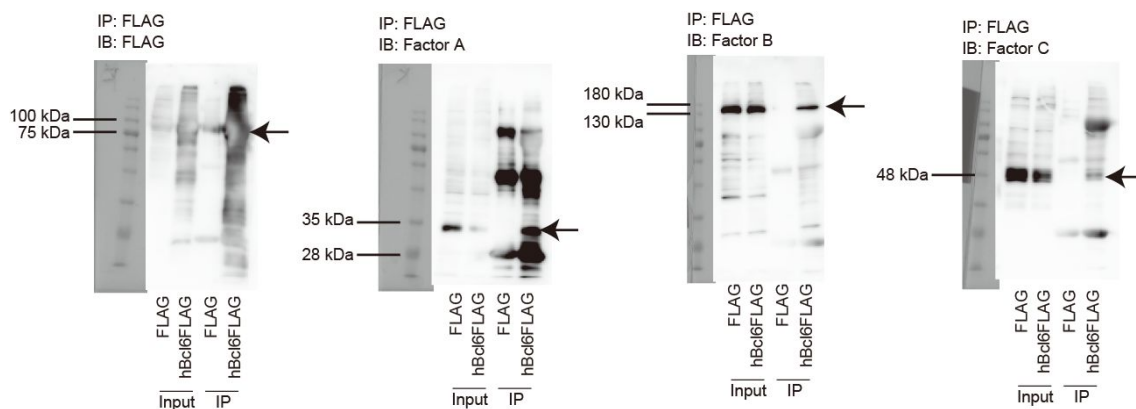


図 2 293T 細胞において免疫沈降法により Bcl6 との相互作用を確認した

今後は、293T 細胞で見出した Bcl6 相互作用因子群が、肝臓または肝臓系細胞においても Bcl6 と相互作用するのかを検証する。さらに肝臓または肝臓系細胞を用いた Bcl6 結合タンパク質精製系を構築する。これまでに肝臓系細胞として、肝がん細胞株 HepG2 細胞を用いて条件検討を実施してきたが、肝臓由来の細胞であり肝機能の再現等に問題がある。そこで、アデノ随伴ウイルスによる生体肝臓の FLAG-hBcl6 過剰発現系を構築した。これを用いて生体肝臓からの Bcl6 結合タンパク質精製系を構築する。これにより、より肝臓に特徴的な Bcl6 相互作用因子群を同定できると考える。これらの Bcl6 相互作用因子群と Bcl6 の分子機能の関連性について、エピジェネティックな活性に注目して解析を進める。

さらに CDAHFD 給餌による NASH 誘導条件下にて、野生型と肝臓特異的 Bcl6 欠損マウスの間でヒストン修飾状態を比較し、Bcl6 が制御するヒストン修飾の位置や種類を明らかにする。これにより、Bcl6 のエピジェネティックな分子機能が NASH 発症に関与するかを検証することができる。さらに、Bcl6 相互作用因子群と NASH 発症との関連性を検証した後、Bcl6 相互作用因子群の機能を制御するような低分子化合物をスクリーニングすることで、NASH 治療薬の開発にも役立てることができると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近田裕美、井田絹代、稲垣豊、紙谷聡英
2. 発表標題 転写因子Bc16は肝臓の薬物代謝酵素遺伝子群の性差発現を制御する
3. 学会等名 第12回日本性差医学・医療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----