

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05719

研究課題名(和文) 肝臓培養細胞HepG2の概日リズムを抑制しているエピジェネティックな制御機構解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of circadian rhythm in HepG2 cells

研究代表者

富田 辰之介 (TOMITA, Tatsunosuke)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60415718

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)：HepG2細胞の時計遺伝子の発現リズム回復メカニズムについて、azaC処理の影響を検討した。DNAマイクロアレイとqPCRを用いて、時計遺伝子の発現変化を調べたが、処理期間に依存した有意な発現変化は見られなかった。また、Bmal1とPer2のプロモータ領域のメチル化解析でも有意な変化は見られず、メチル化による直接の影響は示唆されなかった。一方、リズム調節に関与すると報告があるDNA topoisomeraseは有意な発現上昇が認められ、重要な役割が示唆された。今後は、HepG2でのazaC処理による時計遺伝子リズム回復のメカニズムについてさらなる解析を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体内時計のリズムを示さないHepG2の細胞においても、DNAメチル化解除試薬である5-azaCを長期間低濃度で曝露することにより、リズムの発現が回復することが分かった。このことは、元来HepG2に備わっていたリズム発振機構が、培養方法を工夫することによって、発現することを示した結果である。時計遺伝子のリズムは様々な遺伝子の発現を調節しており、これまで言われていたHepG2の肝臓らしい機能の欠損をリズムの回復を通じて、回復できるかの検討を進める糸口となる成果である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of azaC treatment on the recovery mechanism of clock gene expression rhythm in HepG2 cells. Using DNA microarray and qPCR, we examined the expression changes of clock genes, but no significant expression changes dependent on the treatment period were observed. Additionally, methylation analysis of the promoter regions of Bmal1 and Per2 did not show significant changes, suggesting no direct impact of methylation. On the other hand, a DNA topoisomerase, which has been reported to be involved in rhythm regulation, showed a significant increase in expression. This suggests its important role. Further analysis will be conducted to elucidate the mechanism of clock gene rhythm recovery in HepG2 cells through azaC treatment.

研究分野：分子生物学

キーワード：時計遺伝子 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む多くの生物では、からだ中のあらゆる細胞において、時計遺伝子は凡そ 24 時間周期で増減させるリズム的な発現をしている。哺乳類の時計遺伝子は 4 つの遺伝子、*Bmal1*、*Clock*、*Per*、*Cry* で構成された転写因子であり、これらの遺伝子が転写翻訳のフィードバックループを構成することによって、*Bmal1*、*Per*、*Cry* に顕著な 24 時間のリズムを作ることが知られている。この転写因子のリズム的な発現によって多くの遺伝子の発現に日周リズムを与え、外界の 24 時間周期に生体が適応する為の重要な役割を担っている。

HepG2 はヒト肝臓がん由来の培養細胞株として 1975 年に確立されており、これまでに様々な研究に使用され、*in vitro* の系でヒト肝臓のモデル細胞とされる。臓器のモデルとして培養細胞を用いる検討は、近年推奨されている動物実験回避のためには必須の技術であるが、その為にも生理的機能が元の肝臓組織に近い細胞の使用が求められる。一方で、この細胞株は、確かに肝臓由来であるものの、アルブミンやグリコゲンの生合成能、薬物代謝酵素類の発現が大きく低下していて、モデルとして様々な研究に利用されてきたにもかかわらず、「肝臓らしさ」が失われていることが指摘されている。更に、この細胞には、本来肝臓組織で顕著に見られる時計遺伝子の発現リズムがほとんど見られないことが報告されている。

動物実験などの結果から、肝臓らしい機能であるアルブミンやグリコゲン生合成、薬物代謝酵素の発現に時計遺伝子の発現リズムは関与していると報告されており、時計遺伝子の発現リズムを正常に戻すことが出来れば、この細胞はより生理的な肝臓細胞に近づけられるのではないかと考えられた。

一方で様々な疾患ではこの時計遺伝子の発現リズムに異常を来している事もよく知られており、特にがんなどの疾患では、プロモータ領域の DNA のメチル化など、エピジェネティックな制御によっても時計遺伝子の発現は大きく影響を受けることが報告されており、この点に注目したアプローチを取ることも可能であろうと考えられた。

2. 研究の目的

今回の研究における一番大きな目的は、HepG2 で時計遺伝子のリズムが発現しないのは、そもそも発現させるポテンシャルが残っているのか？という問いを含め、何が原因かを明らかにすることであった。以前行った研究で、白血病患者由来の血球セルラインである RPMI8402 においては、時計遺伝子 *BMAL1* のプロモータ領域の CpG アイランドが高度にメチル化されるというエピジェネティックな制御で *BMAL1* の発現が抑制され、その結果時計遺伝子の発現がみられなくなっていたことを既に報告したこともあり、また、HepG2 はがん細胞由来でありエピジェネティックな変化が起きていることが期待できることから、その原因の一つは時計遺伝子のエピジェネティックな制御の異常に起因するのではないかと考えた。

また時計遺伝子は様々な遺伝子の転写因子として機能していることから、時計遺伝子のリズムが回復することによって、HepG2 が機能的にどれだけ正常肝臓細胞に近づくことが出来るかを知ることを目的とした。

これらの検討によって、体内時計のリズム回復を起点とした HepG2 の肝臓としての生理機能回復が実現できれば、本細胞が肝臓らしい細胞として動物実験の代替モデルとなり、様々な検討に用いることが期待できると考えた。

3. 研究の方法

HepG2 に人工染色体を導入した細胞に、*Bmal1* プロモータとレポータとしてルシフェラーゼを繋げた配列をこの人工染色体に導入した細胞を用いた(以下、この細胞を *Bmal1*-MIMAC HepG2 とする)。この細胞に様々な濃度で、DNA メチル化解除試薬である 5-azacitidine (5-azaC)を負荷した。これらの薬剤については、更に低濃度で 4 週間以上の長期間に渡る負荷実験を行った。これら負荷した後の細胞について、リアルタイムレポータアッセイを行い、*Bmal1* プロモータにドライブされて発現するルシフェラーゼからの発光量を経時的に記録して、*Bmal1* のリズムの回復を検討した。またリアルタイムレポータアッセイでリズムの回復が見られた細胞については、更にマイクロアレイ解析や、それを踏まえた遺伝子の発現を定量できる qPCR などの分子生物学的な解析を行い、どの遺伝子が時計遺伝子のリズム発現抑制に寄与しているのかについて検討を行った。

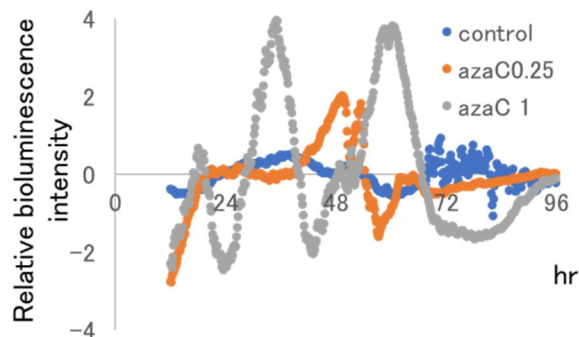
4. 研究成果

(1)*Bmal1*-MIMAC HepG2 でのリズム発現条件検討

まず、*Bmal1*-MIMAC HepG2 について、Dexamethasone で 2 時間刺激して細胞の時計遺伝子の発現位相を揃えた後に、*Bmal1* のリズムをリアルタイムレポータアッセイでモニターした。その結果、レポータの発現量は十分に高いものの、*Bmal1* にみられる顕著な 24 時間のリズムは観察できなかった。

次に DNA メチル化解除試薬の 5-azaC を最終濃度 2.5 μM となるように負荷し、同様にリズムが観測できるかどうかの検討を行ったところ、リズムが観測できなかった。以前の報告で、RPMI8402 は同様の濃度の 5-azaC を用いて、速やかにリズムが回復したことから、HepG2 と RPMI8402 のリズム抑制機構は大きく異なることが示唆された。一方で、同じ報告でメチル化解除は遺伝子ごとに解除速度が異なることを報告しており、負荷条件を替えての検討を行う事とした。負荷濃度を 0.25 および 1 μM にして、長

期間曝露しながら培養を行った。その結果、曝露から4週間後の細胞で、右図に示すように、濃度依存的にリズムパターンが回復する結果が再現的に得られ、長期的かつ低濃度の 5-azaC 曝露で、時計遺伝子のリズム発振を抑制している因子が徐々に解除され、その結果、リズムが発振するようになったと考えられた。5-azaC はメチル化の解除の試薬で、この試薬を負荷することによって、メチル化解除された遺伝子の発現は上昇すると想定されることから、HepG2 では時計遺伝子のリズムを刻む生理機能が失われているのではなく、寧ろ時計遺伝子のリズム発振に必要な遺伝子が普段からプロモータのメチル化で抑制されていて、それを 5-azaC で解除することにより、リズムが発現するというメカニズムがあることが示唆された。



(2) マイクロアレイによる 5-azaC 処理による遺伝子発現変動の網羅的な解析

この 5-azaC 処理で遺伝子の発現量にどのような変化が起きているかを俯瞰するために、マイクロアレイ解析を行った。4週間 5-azaC 処理した *Bmal1*-MIMAC HepG2、およびコントロールとして 5-azaC 処理をしていない *Bmal1*-MIMAC HepG2 から RNA を抽出し、サンプルとして供した結果、時計遺伝子や関連する核内受容体遺伝子など、時計遺伝子のリズム発振に直接関与していると報告される遺伝子に、発現の有意な上昇や低下は見られなかった。また、時計遺伝子の発現に直接関連があると報告されている転写因子についても有意な上昇をしている遺伝子は見つからなかった。

(3) 時計遺伝子、その関連遺伝子の 5-azaC 処理による qPCR を用いた mRNA の発現量変化解析

時計遺伝子の発現については、*BMAL1*, *PER2*, *CRY1*, *CRY2* および *BMAL1* のリズム的な発現に寄与している *RORα*, *NR1D1* について、それぞれ real-time quantitative PCR を用いて、発現量をコントロールと 4週間 5-azaC 曝露群で定量比較した。その結果、いずれの遺伝子も発現が抑制されているわけではなく十分に発現しており、かつアレイで示唆されたように、発現の有意な変化を示す遺伝子は見つからなかった。

また、*BMAL1* のプロモータ部位の CpG アイランドのメチル化の様子についても、meth PCR 法を用いて検討した。その結果、プロモータ部位の CpG アイランドのメチル化の程度は、時計遺伝子のリズム発振が見られる、ヒト正常皮膚培養細胞株の HaCaT と比べてもその度合いは高くなく、少なくとも *BMAL1* の上流部位に関しては CpG アイランドのメチル化を受けているものではないことが示された。これは *BMAL1* の mRNA 発現量が低下はしていない事と矛盾しないと考えられる。これらのことから、5-azaC の影響は時計遺伝子そのもののメチル化解除によるものではなく、他の遺伝子のメチル化解除の影響を受けてリズムが回復したものと推定された。

時計遺伝子の転写制御には、時計遺伝子のフィードバックループ以外にもいくつか因子があることがわかっている。その中で、今回は DNA のトポロジーを変えるトポイソメラーゼ(TOP)に着目した。このタンパク質特異的な阻害剤は時計遺伝子の発現リズムに変化を与えることが知られており、メカニズムの詳細は不明ながらも、時計遺伝子の発現に寄与していると考えられる。また、TOP については、マイクロアレイの解析からも、5-azaC 処理で有意に発現が上昇していることが認められた遺伝子である。この遺伝子については、発現を Real-time qPCR で確認したところ、5-azaC 処理で有意に発現が上昇していることを確かめられた。

これらのことから、5-azaC 処理による *Bmal1*-MIMAC HepG2 のリズム回復は Top を介したメカニズムが考えられた。補助金執行期間までにはここまでしか明らかにできなかったが、現在、この遺伝子のプロモータ解析などを行い、CpG アイランドのメチル化の程度など解析を行っているところである。また、このように 5-azaC で処理した細胞がどれだけ正常肝臓細胞に近づいているかについても解析を行いたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomita Tatsunosuke, Wadhwa Renu, Kaul Sunil C., Kurita Ryoji, Kojima Naoshi, Onishi Yoshiaki	4. 巻 84
2. 論文標題 Withanolide Derivative 2,3-Dihydro-3 -methoxy Withaferin-A Modulates the Circadian Clock via Interaction with RAR-Related Orphan Receptor (RORa)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1882 ~ 1888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c01276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishihara Ryo, Niwa Kazuki, Tomita Tatsunosuke, Kurita Ryoji	4. 巻 31
2. 論文標題 Coelenterazine Analogue with Human Serum Albumin-Specific Bioluminescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 2679 ~ 2684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishihara Ryo, Niwa Kazuki, Tomita Tatsunosuke, Kurita Ryoji	4. 巻 -
2. 論文標題 Design of Coelenterazine Analogue to Reveal Bioluminescent Reaction of Human Serum Albumin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IntechOpen	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.97232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------