

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10684

研究課題名（和文）リトコール酸によるビリン発現抑制におけるSRFの役割に関する研究

研究課題名（英文）Role of SRF on prevention of villin expression by lithocolic acid.

研究代表者

尾関 宗孝（Ozeki, Munetaka）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：80549618

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）：本研究では胆汁鬱滞下におけるビリンの発現調節機構を明らかにする目的で、ビリンプロモーター上にあるCARG Boxに着目し、転写因子SRF/MRTFs複合体によるビリン転写におけるリトコール酸の影響について検討した。SRFはビリンプロモーター上のCARG Box配列に結合し、ビリン転写調節を行うものの、リトコール酸刺激によるビリン発現低下には関与しないことが示唆された。一方、MRTFA/Bは通常ビリン発現に抑制的であり、リトコール酸刺激下ではビリン発現を促進することが示唆された。しかし、それらの影響は限定的であり、かつSRFとは別の経路によることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆汁鬱滞は多くの肝疾患で見られる症状であり、その分子メカニズムの一旦が解明されることは、多くの肝疾患の早期発見・治療法の開発に繋がるものと期待される。SRFを主とする複合体による転写機構に関してはすでに多くの研究がある一方で、未だその全容は解明されていないのが現状である。本研究で示唆されたMRTFがSRF以外の経路で作用することを示す結果は、他の最新の研究により得られた知見を支持すると同時に、新たな遺伝子調節機構の解明にも繋がるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：SRF transcriptional factor bound to CARG Box on villin promoter and regulated villin transcription in normal HepG2 human hepatocarcinoma cells. However, SRF showed no significant effect on villin mRNA expression in lithocolic acid (LCA) stimulated-HepG2 cells. MRTFs, cofactors of SRF transcriptional complex, negatively regulated villin expression in normal HepG2 cells, but positively in LCA-HepG2 cells. MRTFB located in cytoplasm in normal HepG2 cells, but translocated into nucleus in LCA-HepG2 cells. These data suggests that MRTFs regulated villin expression without SRF in LCA-HepG2 cells.

研究分野：法医学

キーワード：肝臓 胆汁鬱滞 リトコール酸 ビリン SRF

1. 研究開始当初の背景

肝臓は栄養代謝や薬物代謝の中心となる臓器であることから、肝臓の組織像は生前の生活習慣や食生活を如実に表し、飲酒や薬物使用の影響も受けやすい臓器である。そのため、解剖時における肝臓の観察は死因特定のみならず、生前の生活を推測する上で重要な知見をもたらすものと考えられる。胆汁鬱滞は多くの肝疾患において見られる病態である。先天的な因子により引き起こされる場合もあるが、生活習慣が起因となることも多い。胆汁鬱滞を分子病理学的に深く理解することは、肝臓の機能や多くの肝疾患の早期発見・治療にも重要である。胆汁鬱滞性肝疾患の中でも難病指定されている原発性硬化性胆管炎は、臓器移植が唯一の選択となることもあるが、胆汁鬱滞は生体肝移植後の拒絶反応でも見られる。本申請者が所属する京都大学は、生体肝移植例が世界でもっとも多い機関であり、本申請者はこれまでに病理医と連携して肝移植後の慢性拒絶の病態解明に関する研究にも携わってきた。以上のような背景を元に、胆汁鬱滞において肝細胞毒性を示す胆汁酸であるリトコール酸がアクチン結合タンパク質ビリンの発現を抑制すること、ビリン発現抑制が細胞の増殖低下を引き起こすこと、リトコール酸刺激によるビリン転写抑制にはプロモーターに存在するCArG Box配列が重要であることなどを明らかにしてきた。ビリン発現抑制の詳細な機序を調べることにより、胆汁鬱滞下での肝細胞毒性の理解に繋がるのみならず、シグナルの上流に位置する転写因子に着目することで、細胞内の分子病態学的変化を網羅的に把握し、将来の診断や治療に貢献できるものと考えた。

2. 研究の目的

肝臓は栄養代謝の中心となる臓器であると同時に解毒の役割も担っている。そのため肝臓組織像は生活習慣と密接に関わっており、食事、酒やタバコといった嗜好品、薬物の影響を反映していると考えられ、死因究明の観点からは生前の生活習慣を示唆する臓器とも言える。肝臓で分泌される胆汁は腸内での消化吸収に必要な消化液であるが、胆汁流出または生成に障害を来した状態である胆汁鬱滞は、直接あるいは間接的に死因に影響することも多い。また、飲酒や薬物といった生活習慣に起因することも多く、軽度なものから重篤なものまで様々な肝疾患において見られる病態の一つである。長期にわたる胆汁鬱滞は肝繊維化を引き起こし、肝硬変や肝癌といった重篤な病態へと進行する。このような背景から、法医病理において胆汁鬱滞に着目することは、生前の生活習慣を推測し死因究明の一助となる手がかりを得る上で有効な手段となると考えた。以上を踏まえ、本申請者は胆汁鬱滞性肝疾患の病態解明に取り組んでいる。マウスを材料として薬剤誘発性の胆汁鬱滞を引き起こし、特に早期の形態学的変化を観察したところ、胆管増生や繊維化といった従来知られている形態変化が起こる前に、肝微細胆管に形態異常が起こることを明らかにした。次に形態変化の分子メカニズムを明らかにする目的で胆汁鬱滞モデルとして二次元培養において微細胆管を形成することが知られているヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞を用い、胆汁鬱滞における肝細胞毒性の原因物質として知られる二次胆汁酸であるリトコール酸で刺激した時の影響を観察したところ、アクチン結合タンパク質の一つビリンの発現低下が認められ、ビリンの発現抑制が HepG2 細胞の増殖抑制を引き起こすことが明らかとなった。リトコール酸によるビリン発現抑制の転写機構の解明する目的で、ビリンプロモーターに着目すると、の上流約 60bp に位置する CArG Box と呼ばれる配列があることが示唆され

た。CArG Box には細胞骨格の構築に重要な役割を果たす転写因子 SRF が結合することが知られており、リトコール酸により SRF を介してビリンの転写抑制が行われていることが推察された。そこで、本申請研究ではリトコール酸による SRF を介したビリン発現抑制機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト肝癌細胞 HepG2 を培養し、胆汁鬱滞において強い毒性を示す胆汁酸であるリトコール酸で刺激することにより、胆汁鬱滞モデルとした。ビリンプロモーター上で CArG Box 配列を含む転写開始点より上流 100 bp の範囲を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイベクターを構築し、ビリンプロモーターの転写活性を測定した。また、CArG Box からなる最小単位のプロモーターを持つ市販のレポーターアッセイベクターを用いて、SRF の転写活性を測定した。その際、siRNA を用いた遺伝子ノックダウンにより、SRF およびその複合体を形成する補因子である MRTFA/B の発現を低下させ、これら因子のビリン転写における影響を観察した。また、ノックダウン時のビリン mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定し、プロモーター解析の結果と合わせて SRF 複合体によるビリン転写制御機構について検討した。

4. 研究成果

ヒト肝癌細胞株 HepG2 よりゲノム DNA を調製し、PCR により CArG Box 配列を含む転写開始点より上流 100bp の範囲を増幅してビリンプロモーター断片とした。この DNA 断片を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイベクターを作成し、プロモーター活性の実験に供した。ビリン mRNA 発現量は種々の胆汁酸刺激に応答して有意に減少し、特にリトコール酸により強い発現抑制が観察された。ビリンプロモーター転写活性についても同様の結果が得られ、ビリンプロモーター活性は CArG Box の欠失によりほぼ消失した。このとき、リトコール酸刺激により SRF およびその補因子である MRTFA/B の発現量に有意な変化は認められなかった。リトコール酸刺激下においては MRTFB の細胞内局在に変化が見られ、細胞質から核内へ移行していることを見出した。以上のことから、ビリンはプロモーター上の CArG Box を介して SRF により転写制御されており、リトコール酸刺激下においては複合体を形成する MRTFB の作用が鍵となり発現抑制を受けることが示唆された。

siRNA を用いて SRF 発現をノックダウンすると、ビリン mRNA 発現は有意に低下したが、リトコール酸刺激下においては SRF ノックダウンによるビリン mRNA 発現量に変化は認められなかった。一方で MRTFA/B ノックダウンによりビリン mRNA 発現量はリトコール酸刺激の有無にかかわらず有意に変化し、リトコール酸非刺激下では抑制的に、リトコール酸刺激下では促進的に働くことが示唆された。しかしながらこれらの結果に対し、SRF 転写活性やビリンプロモーター転写活性における SRF および MRTF ノックダウンの影響とは一致しない結果も見られた。

本研究ではビリンプロモーターのうち CArG Box に着目したことで全体の制御機構のうち一部を切り取った形で結果が示されされていること、SRF 転写機構には他の因子も関与していることが知られておりそれらについては検討していないこと、MRTF と相互作用する SRF 以外の因子も明らかになりつつあるが未だ全容が明らかになっていないことと等の理由が考えられたが、今後の検討課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾関宗孝、南博蔵、藤本駿太郎、真鍋翔、小谷泰一、玉木敬二
2. 発表標題 リトコール酸による肝細胞増殖抑制に関する研究
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾関宗孝、玉木敬二
2. 発表標題 リトコール酸刺激に対するPTK7の役割に関する研究
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------