

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22502

研究課題名(和文) エピトランスクリプトーム解析による生活習慣病のトランスポーター発現変動機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of regulation of drug transporter expression in lifestyle-related diseases by epitranscriptomics

研究代表者

家入 一郎 (Ieiri, Ichiro)

九州大学・大学病院・大学院担当教授

研究者番号：60253473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝癌由来細胞(HepG2)を用いて、グルコース濃度の変動とN6-methyladenosine(m6A)修飾を介した遺伝子発現変動との関連性について評価を行った。高濃度グルコース条件下において脱メチル化酵素であるFat mass and obesity-associated(FTO)の発現量が有意に低下することが明らかとなった。FTOの発現低下は、薬物トランスポーターSLC22A上のm6A頻度が上昇を引き起こし、SLC22Aの発現量は上昇した。このことから、m6Aは高血糖時の薬物トランスポーター発現変動機構に重要な役割を果たすことが、初めて明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、高血糖がRNAメチル化修飾機構を介して薬物トランスポーターの発現変動を引き起こしていることが示唆された。発現変動する薬物トランスポーターを特定したことから、糖尿病時の薬物治療への薬物動態学的な評価を行うことで適切な薬物治療への応用が期待できる。脱メチル化酵素であるFTOの発現低下が示されたことから、当該機構は薬物トランスポーターに留まらず幅広い遺伝子の発現制御に関与している可能性があり、応用が期待できる。FTOの発現低下がmiRNAにより引き起こされることも明らかとなったことから、本miRNAを新たな糖尿病のバイオマーカーとした研究を進めることで、病態解明への展開も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The effect of glucose concentration on drug transporter gene expression via N6-methyladenosine (m6A) modification was evaluated using human hepatoma-derived cells (HepG2). Fat mass and obesity-associated (FTO) expression was significantly decreased under high glucose concentration conditions. The results of microRNA (miRNA) analysis suggested that the decreased expression of FTO was caused by miRNA-mediated repression of translation. Comprehensive methylation analysis revealed that m6A frequency on the drug transporter SLC22A increased under high glucose concentration conditions, resulting in increased expression of SLC22A. These results indicate that m6A plays an important role in the mechanism of variation of drug transporter expression in hyperglycemia.

研究分野：薬物動態学

キーワード：薬物トランスポーター RNAメチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は環境要因や遺伝的要因から引き起こされる代謝性疾患であり、本邦における糖尿病患者と予備軍は合わせて 2,000 万人にも上る。2 型糖尿病発症の主要なリスク要因である過食は、膵臓細胞からの過剰なインスリン分泌を促すことでインスリン抵抗性を誘発し、食後の血糖値の増大に対して分泌されるインスリンの作用が減弱することで、慢性的な高血糖状態の原因となる。また 2 型糖尿病の進展は、脂質異常症や高血圧、がん等の様々な合併症を誘発するため、糖尿病患者の服用薬は多岐にわたる。過去の報告において、薬物の生体内輸送に關与する薬物トランスポーターの発現量が糖尿病発症により変動することが指摘され、薬物トランスポーターの発現量・活性の違いは薬物の体内動態に影響を与えることが認められた。従って、糖尿病発症に起因する薬物トランスポーターの発現量・活性の変化は、薬物の薬効の低下や副作用を誘発する恐れがあるため、糖尿病発症時の薬物トランスポーター発現変動機構を解明することは適切な薬物治療を行う上で重要であると考えられる。

これまでに遺伝子の発現を制御する機構として一塩基多型 (SNPs) が知られており、SNPs は基質薬物の体内動態や薬効発現に影響を与える因子として盛んに研究されてきた。さらに、遺伝子の塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御機構としてエピジェネティクスがこれまでに注目されている。代表的なエピジェネティクスとしては DNA メチル化やヒストンアセチル化が挙げられ、これらは遺伝子発現の個人差に寄与し得ることが示唆されている。さらに、エピジェネティクスと 2 型糖尿病の關連を示した論文もここ数年で多数上がっており、高脂肪食摂取や肥満などの環境要因の変化は DNA メチル化やヒストンアセチル化状態を変動させることで、遺伝子発現制御に寄与することが示された。したがって、2 型糖尿病とエピジェネティクスの關係性を明らかにすることで、糖尿病発症時の遺伝子発現調節機構に関する新たな知見が得られると想定される。

一方で近年、転写後調節機構として新たに RNA 配列中の一部の塩基に化学修飾が施されるエピトランスクリプトームが注目を集めている。そのうち、特定のアデノシン残基がメチル化される N6-methyladenosine (m6A) は肝臓、小腸、骨格筋細胞など生体内に豊富に存在する内部 RNA 修飾の一種であり、m6A 修飾は messenger RNA (mRNA) の安定性や翻訳効率、スプライシング効率、RNA 局在を変化させるなど、多岐の機能を有することが示されている。これまでに m6A 修飾と疾患の關係が報告されており、例えば m6A 修飾脱メチル化酵素である Fat mass and obesity-associated protein (FTO) 遺伝子上の SNPs は FTO 発現を増加させることで、肥満関連遺伝子の発現量増加を促し、肥満を誘発することが示唆された。また、2 型糖尿病患者は健康人と比較して肝臓内の FTO やメチル化酵素である Methyltransferase like 3 (METTL3) 発現量が変動することが報告されている。m6A 修飾酵素の発現変動によって、その修飾状態は動的に制御されることから、2 型糖尿病患者における遺伝子発現変動機構に m6A 修飾は重要な影響を与えている可能性が考えられる。しかし、これまでに糖尿病発症によって引き起こされる慢性的な高血糖状態等の生体内環境の変化が m6A 修飾に及ぼす影響については十分に明らかとなっていない。一般的に、2 型糖尿病患者ではインスリン抵抗性が誘発されることで、生体内のグルコース代謝能が低下し、慢性的な高血糖状態が持続する。さらに、グルコースなどの糖類は門脈を通過して肝臓に輸送されるため、糖尿病患者の肝臓は糖に高濃度に曝露されていると考えられる。また、肝臓は薬物代謝の主要な臓器であり、数多くの薬物トランスポーターの発現が確認されており、薬物の体内動態を把握する上で、肝臓内の遺伝子発現機構を明確に把握することは重要であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト肝臓由来細胞株 HepG2 細胞を用いて、グルコース曝露が m6A 修飾状態に及ぼす影響を評価し、m6A 修飾を介した薬物トランスポーター発現調節機構の解明を目的として研究を行った。まず、グルコース曝露における m6A 修飾酵素の発現量の定量を行うことで、高血糖状態と m6A 修飾の關係性を評価した。さらに、グルコース曝露により m6A 修飾状態が変動する遺伝子の同定を行い、遺伝子発現に m6A 修飾状態の変化が与える影響について評価を行った。

3. 研究の方法

3-1 細胞培養

RIKEN Cell Bank から購入したヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞を使用した。5 mM グルコース培地は、DMEM, no Glucose と Ham's F-12 Nutrient Mixture (10 mM Glucose) を 1:1 の比率で混合することにより調整した。17.5 mM グルコース培地は既製の DMEM/F-12 を使用した。35 mM グルコース培地は DMEM/F-12 に Glucose Solution を添加することで調整した。HepG2 細胞は 10% FBS 含有 5 mM 培地にて 37 °C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

3-2 dot blot assay

mRNA の二次構造を変性させたサンプル 2 µL を Biodyne™ B Precur Nylon Membranes 上に滴下し、その後 UV イルミネーターを用いて紫外線 (302 nm 波長) を 1 分間照射することで

mRNA-膜のクロスリンクを行った。Dot blot 法の loading control として膜を 0.02% methylene blue にて染色した。一次抗体として、m6A 修飾検出用に anti-m6A antibody を使用した。二次抗体として、Anti-rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep を用いた。二次抗体反応終了後、Amersham™ ECL Select™ Western Blotting Analysis System を用い、プロトコルに従い、m6A 修飾を検出した。

3-3 グルコース曝露条件下における m6A 修飾酵素 mRNA およびタンパク質発現量の定量

HepG2 細胞を播種から 72 時間後に各濃度のグルコース培地に培地交換し、24 時間培養した。細胞から得た cDNA に対し、FTO と β -actin の mRNA 発現量を測定した。Ct 法を用いて相対発現量を算出した。各グルコース濃度にて曝露後、24 時間後の HepG2 細胞からタンパク質を抽出し、FTO および β -actin を検出した。

3-4 FTO タンパク質の安定性に対するグルコース曝露の影響評価

HepG2 細胞を播種から 71 時間後に、DMSO にとかした シクロヘキシミド を 50 μ g/mL にて曝露し、CHX を曝露後 1 時間後に、各濃度のグルコース培地に培地交換し、24 時間培養した。HepG2 細胞からタンパク質を抽出し、FTO および β -actin を検出した。

3-5 FTO-3' UTR 配列を介した遺伝子発現制御に対するグルコース曝露の影響評価

各濃度のグルコース曝露条件下における FTO mRNA 3' UTR 配列を介した発現制御機構を解明するために、FTO mRNA 3' UTR 配列を組み込んだ reporter vector (FTO 3' UTR 1-2552) を作製した。また FTO 3' UTR 配列の塩基を部分的、または段階的に欠損させた deletion vectors (FTO 3' UTR 1-589, 565-1100, 1051-1600, 1581-2135, 1731-2135, 1856-2135, 1993-2135, 2081-2552) は部位特異的変異導入法を用いて作製した。reporter vector として pGL3 promoter vector を用いた。

3-6 グルコース曝露条件下における FTO タンパク質発現量減少に関与する miRNA の探索

HepG2 細胞を播種から 72 時間後に各濃度のグルコース培地に培地交換し、24 時間培養した。miRNeasy Mini Kit を用いて、添付のプロトコルに従い miRNA の抽出を行った。逆転写したサンプルに対し、TaqMan MicroRNA Assay Kit を用いて、miRNA の定量を行った。相対発現量の算出には Ct 法を用いた。

3-7 SLC22A 遺伝子発現に与えるグルコース曝露および FTO の影響評価

グルコース曝露または FTO ノックダウン後の HepG2 細胞から RNA ならびに蛋白質を抽出した。SLC22A mRNA ならびに蛋白質発現量の定量は、3-3 と同様に行った。

3-8 SLC22A-3' UTR 配列を介した遺伝子発現制御に対するグルコース曝露の影響評価

各濃度のグルコース曝露条件下における SLC22A mRNA 3' UTR 配列を介した発現制御機構を解明するために、SLC22A mRNA 3' UTR 配列を組み込んだ reporter vector を作製した。reporter vector として pGL3 promoter vector を用いた。さらに目的配列の増幅には、cDNA を鋳型として、SLC22A mRNA 3' UTR を増幅させるプライマーを設計し PCR 法により増幅させた。グルコースが SLC22A 遺伝子に転写活性に与える影響を評価するために、SLC22A 遺伝子の promoter 配列を組み込んだ reporter vector を作製した。reporter vector として pGL4.10 basic vector を用いた。

4. 研究成果

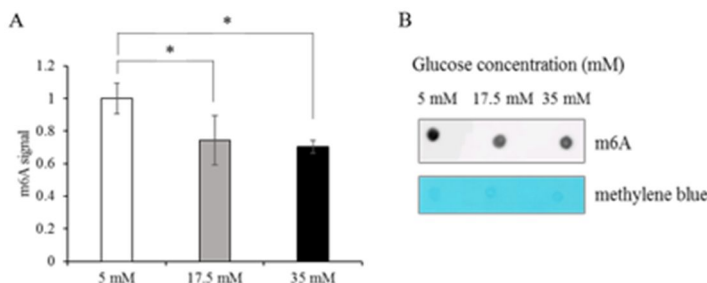
4-1 グルコース曝露条件下における mRNA 中の m6A 修飾状態の評価

既報において、HepG2 細胞を使用した多くの論文では、低濃度のグルコースとして 5.5 mM グルコース培地を、高濃度として 33 mM グルコース培地を用いて検討が行われている 37-39。そこで本研究では、低濃度のグルコース培地として 5 mM、高濃度のグルコース培地として 17.5、35 mM グルコース濃度の培地を用いて HepG2 細胞を培養し、グルコース濃度の変化が遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。

m6A dot-blot assay は mRNA 全体に含まれる m6A 修飾状態を定量することのできる手法である。そこで、グルコース濃度の変化が HepG2 細胞内に存在する m6A 修飾状態に与える影響を m6A dot-blot assay により評価した。その結果、高濃度のグルコース曝露条件下では m6A 修飾頻度の有意な減少が認められた (Fig. 1)。m6A 修飾状態の変動は mRNA の安定性や翻訳効率を変化させることから、グルコース曝露により HepG2 細胞内 m6A 修飾状態の変化によって遺伝子発現が制御されている可能性が考えられる。

Figure. 1 Effects of various concentrations of glucose on m6A levels in HepG2 cells.

HepG2 cells were cultured in 5, 17.5, 35 mM of glucose media for 24 hr. (A, B) m6A signal was measured by m6A dot-blot assay. m6A signal was normalized to methylene blue stain. Results were expressed as fold increase in HepG2 cells with 5 mM glucose. Each data represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. *P < 0.05: statistically analyzed using Dunnett's test.



4-2 グルコース曝露条件下における m6A 修飾酵素 mRNA およびタンパク質発現量の定量

高濃度のグルコース曝露は HepG2 細胞内の m6A 修飾状態に影響を与えることが明らかとなった。m6A 修飾状態は修飾酵素の発現変動によって、その修飾状態が動的に制御されるため 40、高濃度のグルコース曝露により m6A 修飾酵素の発現が変動している可能性が考えられる。そこで、HepG2 細胞を各濃度のグルコース培地にて 24 時間培養し、m6A 修飾酵素の mRNA およびタンパク質発現量の定量を行った。

その結果、低濃度のグルコース曝露群と比較して、高濃度のグルコース曝露群における m6A 修飾酵素の mRNA 発現量に有意な変化は見られなかった (Fig. 2A)。一方で、脱メチル化酵素である FTO タンパク質発現量が高濃度のグルコース曝露群において有意に減少した (Fig. 2B, C)。FTO mRNA 発現には影響を及ぼさず、タンパク質発現量のみが減少したことから、高濃度グルコース曝露下において、転写後調節機構を介した FTO タンパク質発現量の減少が引き起こされている可能性が示唆された。

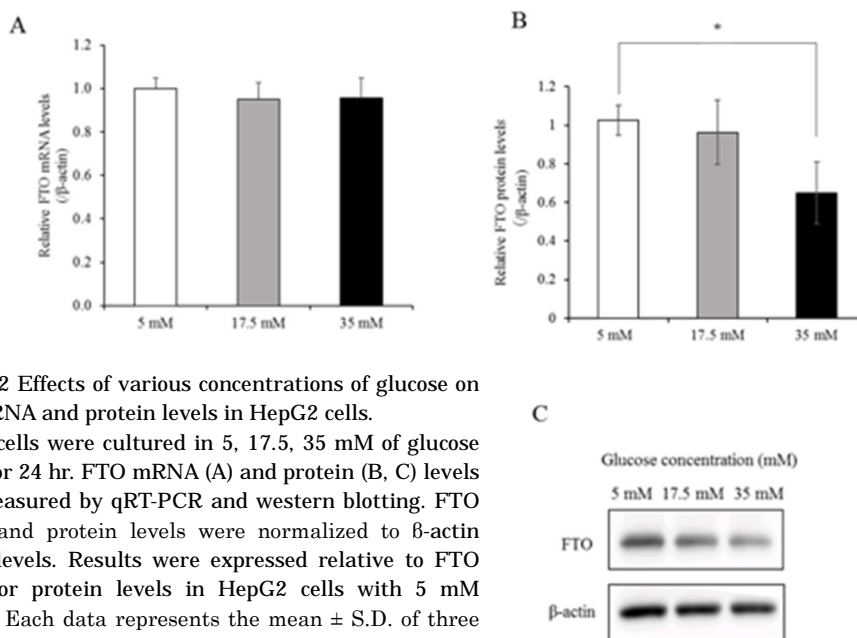


Figure. 2 Effects of various concentrations of glucose on FTO mRNA and protein levels in HepG2 cells.

HepG2 cells were cultured in 5, 17.5, 35 mM of glucose media for 24 hr. FTO mRNA (A) and protein (B, C) levels were measured by qRT-PCR and western blotting. FTO mRNA and protein levels were normalized to β -actin mRNA levels. Results were expressed relative to FTO mRNA or protein levels in HepG2 cells with 5 mM glucose. Each data represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. *P < 0.05; statistically analyzed using Dunnett's test.

4-3 FTO タンパク質の安定性に対するグルコース曝露の影響評価

グルコース曝露による FTO タンパク質発現の低下は転写後調節機構を介することが示唆されたため、FTO の翻訳抑制またはタンパク質分解促進が引き起こされている可能性が考えられる。そこで、これらの機構の関与を明らかにするために、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (Cycloheximide, CHX) を 50 μ g/mM にて HepG2 細胞に曝露し、その 1 時間後に各濃度のグルコース培地にて細胞を曝露した。グルコース曝露から 24 時間後に FTO タンパク質発現量を定量した。

その結果、CHX 非曝露条件下では低濃度のグルコース曝露群と比較して、高濃度のグルコース曝露群における FTO タンパク質発現量の減少が認められた。一方で、CHX 曝露により mRNA の翻訳を抑制した状態では、FTO タンパク質発現に有意な変化は見られなくなった (Fig. 3A, B)。以上のことから、高濃度のグルコース曝露条件下における FTO タンパク質発現量の減少は、タンパク質生成後の分解促進ではなく、翻訳過程への抑制が関与している可能性が示唆された。そこで、翻訳抑制を介してタンパク質の発現を制御することが知られる microRNA (miRNA) に着目して、以降の検討を行った。

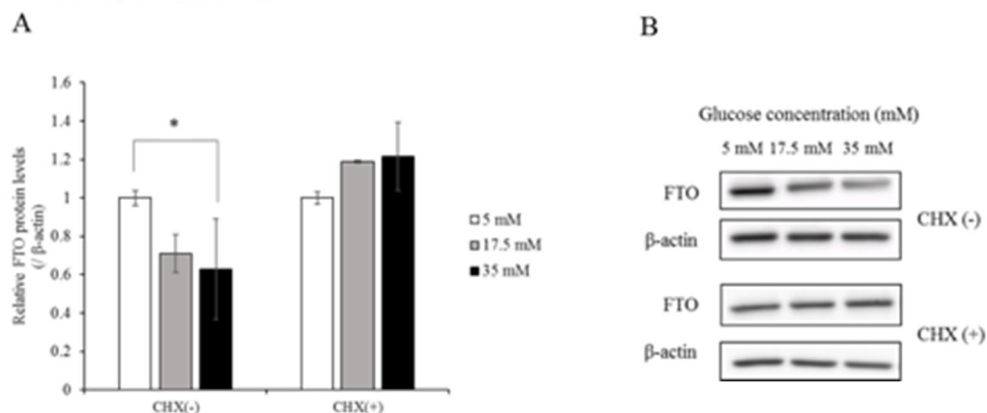


Figure. 3 Effects of CHX on FTO protein levels in various concentrations of glucose-treated HepG2 cells. HepG2 cells were cultured in 5, 17.5, 35 mM of glucose media and treated with CHX (50 µg/mL) for 24 hr. (A, B) FTO protein levels were measured by western blotting and normalized with β-actin levels. Results were expressed relative to FTO protein levels in HepG2 cells with the 5 mM glucose. Each data represents the mean ± S.D. of three independent experiments. *P < 0.05; statistically analyzed using Dunnett's test.

4-4 グルコース曝露条件下における m6A 修飾状態の解析による標的 mRNA の探索

これまでの検討で、高濃度のグルコース曝露により、脱メチル化酵素である FTO タンパク質発現量が減少することが明らかとなった。そのため、同遺伝子の標的 mRNA 上の m6A 修飾状態が高濃度のグルコース曝露により変動する可能性が考えられる。そこで、グルコース曝露 24 時間後の細胞を回収し、m6A 修飾を特異的に認識する抗体で免疫沈降を行い、次世代シーケンス (Methylated RNA immunoprecipitation sequencing, MeRIP-seq) により解析することで、m6A 修飾状態が変化するトランスポーター遺伝子の同定を行った。その結果、高濃度のグルコース曝露時に Solute Carrier Family 22 (遺伝子名: SLC22A) 上の m6A 修飾頻度の増加が認められた。

4-5 SLC22A 遺伝子発現に与えるグルコース曝露および FTO ノックダウンの影響評価

m6A 修飾状態の変化は mRNA の安定性や翻訳効率に影響を与えることが報告されている。そこで、各濃度のグルコース曝露条件下における SLC22A mRNA およびタンパク質発現量の定量を行った。その結果、低濃度グルコース曝露群と比較して、高濃度グルコース曝露群において SLC22A mRNA 及びタンパク質発現量が有意に増加することが明らかとなった。

さらに、FTO ノックダウン条件下における SLC22A mRNA 発現量の定量を行うことで、FTO が SLC22A 遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。その結果、Negative control siRNA 導入群と比較して、FTO siRNA 導入群では SLC22A mRNA 発現量の有意な増加が認められた。本研究より、SLC22A は FTO による発現制御を受け、グルコース曝露によって脱メチル化酵素である FTO タンパク質の発現低下が誘発されることから、高濃度のグルコース曝露条件下では FTO により SLC22A mRNA 上の m6A 修飾状態の変化が誘発されることで SLC22A 発現が増加する可能性が示唆された。

4-6 SLC22A -3' UTR 配列を介した遺伝子発現制御に対するグルコース曝露の影響評価

SLC22A-3' UTR 上の m6A 修飾状態が高濃度のグルコース曝露によって変動することが示唆されたため、SLC22A-3' UTR 配列を介した SLC22A 発現制御に対するグルコース曝露の影響を評価した。HepG2 細胞に SLC22A-3' UTR 配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを導入し、グルコース曝露後 24 時間後に、ルシフェラーゼアッセイを行った。

その結果、高濃度のグルコース曝露群においてルシフェラーゼ活性の増加が認められた。このことから、高濃度のグルコース曝露により SLC22A-3' UTR 配列を介した SLC22A 発現制御が引き起こされている可能性が示唆された。

4-7 まとめ

本研究によって、糖尿病発症に伴う高血糖状態は FTO タンパク質の発現変動を促し、SLC22A 遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。今後は、同トランスポーターの基質や薬物の輸送活性に m6A 修飾状態の変動が与える影響を評価するために、更なる検討が必要である。また、FTO は幅広い選択性を有するため、本研究で示された知見に基づき、他の薬物トランスポーターや代謝酵素の発現についても m6A 修飾との関連性を評価することができれば、薬物の体内動態がより正確に予測可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0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 香川 竜希, 清田 将裕, 小野 未央里, 廣田 豪, 家入 一郎
2. 発表標題 RNA メチル化解析による糖尿病発症時の トランスポーター発現変動メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	廣田 豪 (Hirota Takeshi) (80423573)	九州大学・薬学研究院・准教授 (17102)	

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