

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09207

研究課題名(和文) 肝臓におけるvillinの転写制御機構に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of transcriptional regulation of villin in liver

研究代表者

尾関 宗孝(Ozeki, Munetaka)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80549618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン結合タンパク質ビリンのプロモーター上流約60bpにTATA Box/CAR G Box配列が存在し、ビリンの転写に重要であることが示された。そこで本配列に結合する転写因子TBPとSRFについてリトコール酸刺激に対する反応を調べたところ、どちらも転写活性の低下が確認された。さらにSRFノックダウンによりビリン発現量は低下し、TBPノックダウンでは有意に上昇した。以上より、HepG2細胞においてリトコール酸によりTBPおよびSRFの転写活性が低下することにより、ビリン発現が抑制されるものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、リトコール酸刺激下で転写因子SRFおよびTBPの転写活性が低下することが新たに明らかとなった。SRFは細胞形態の維持に必要な多くの遺伝子の発現を司り、TBPは基礎転写に重要な転写因子として知られている。胆汁鬱滞下でこれらの転写因子がリトコール酸の影響を受ける可能性が示唆されたことで、胆汁鬱滞性肝疾患における遺伝子発現調節を理解するのに役立つとともに、新規の治療法の開発につながる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the transcriptional regulation of villin in HepG2 human hepatocarcinoma cells, Luciferase reporter assay was carried out using villin promoter fragments. Transcription factors SRF and TBP transcribed villin via TATA Box/CAR G Box locates around -60 bp on villin promoter. These transcriptional factors reduced their transcriptional activity under lithocholic acid stimulation in HepG2 cells. Villin mRNA expression was decreased by SRF knockdown using siRNA, and increased by TBP knockdown. These result suggest that villin transcriptional regulation by SRF and TBP are prevented by lithocholic acid under cholestasis.

研究分野：医歯薬学/社会医学/法医学

キーワード：肝臓 ビリン リトコール酸

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、死因究明における解剖時の肝臓の観察は、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。胆汁鬱滞とは、胆汁の分泌または排泄障害により、胆汁成分が肝細胞から血中に逆流し停滞している病態であり、多くの肝疾患において見られる。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く、アルコールや薬物、ホルモン、機械的閉塞、胆汁酸輸送経路の異常、ウイルス感染、自己免疫応答等種々の原因によって引き起こされ、長期にわたる胆汁鬱滞の結果、肝細胞は変性消失し結合織が増生し肝硬変となる。胆道閉鎖症や原発性硬化性胆管炎は先天性の胆汁鬱滞を引き起こし、中でも原発性胆汁性肝硬変は難病に指定され、未だにその原因や根本的な治療方法が開発されていない。今日においては、肝移植がほぼ唯一の選択肢となっている。一方、胆汁鬱滞は肝移植後、慢性拒絶となった場合にも引き起こされる。慢性拒絶反応では内臓肥厚による閉塞性動脈病変、門脈域末梢の細胆管の消失、強い胆汁の鬱滞が認められ、その根本的な治療には再移植が必要となるため早期発見・早期治療が不可欠であるが、いずれの病態変化も早期には認められないことからその診断は困難である。従って、胆汁鬱滞早期病態の理解は、死因究明における生前時の生活習慣の推測のみならず、難病の早期発見・治療、肝移植後の拒絶反応のモニタリングにも応用することができる。

微細胆管は肝胆道系で最も細い管構造である。その表面には胆汁酸輸送に関わるタンパク質が存在し、肝実質細胞は微細胆管へ胆汁酸を直接排出する。通常、管の端はタイトジャンクションやデスモゾームにより結ばれており、胆汁は漏れ出さない。胆汁鬱滞下では胆管内圧が上がり拡張し、さらに圧が上昇すれば胆汁は胆管から逆流して血管内に入り門脈圧亢進を引き起こす。胆汁鬱滞による肝細胞障害から肝繊維化への移行の過程において、微細胆管は胆管系で最も脆弱な構造であることから、早期に障害を受けやすい組織構造の一つであると考えられる。以上のことから、「胆汁鬱滞下における肝障害において、病態早期に微細胆管に障害がおき、形態変化として観察されるのではないか？」と考えた。本仮説を検証するにあたって、薬剤投与により胆汁鬱滞を誘発したマウスにおいて従来より知られている病理学的所見が認められるより早期の段階でも微細胆管の形態異常が観察されることを明らかにした。[1]

胆汁鬱滞下では二次胆汁酸の一つリトコール酸の肝細胞毒性により肝実質細胞に障害が惹起される。リトコール酸のもつ肝細胞毒性はその強い疎水性に起因することが報告されているが、その詳細な作用は明らかになっていない。リトコール酸の肝細胞毒性を分子病態学的に明らかにすることで、多くの胆汁鬱滞性肝疾患の早期発見や新たな治療法の開発に貢献できるものと考えた。胆汁鬱滞モデルとしてヒト肝癌細胞株HepG2をリトコール酸で刺激し、その時の細胞応答を観察した。蛍光染色や電子顕微鏡による観察において、リトコール酸刺激した細胞の微細胆管内は障害を受けた微絨毛片や脂肪滴等と思われる種々の物質で満たされていた。また、微細胆管表面の剥離、新たな微絨毛の形成が見られたものもあった。細胞接着面においては、糸状突起や膜状突起が消失し、アクチンの絨毛様構造が観察された。この時、アクチン結合タンパク質であるピリンの発現が胆汁酸からシグナルを受ける核レセプターを介して低下することが示唆された。また、ピリン発現低下により細胞増殖が抑制された。以上より、胆汁鬱滞下において、リトコール酸が核レセプターを介してアクチン制御系タンパク質に作用することでアクチン細胞骨格の再構成を誘発するとともに細胞増殖を抑制した結果、肝実質細胞の形態異常として観察されることが考えられた。

<引用文献>

Miyao M, Ozeki M, Abiru H, Manabe S, Kotani H, Tsuruyama T, Tamaki K. Bile canalicular abnormalities in the early phase of a mouse model of sclerosing cholangitis. *Dig Liver Dis.* 45(3) 216-25. (2013)

2 . 研究の目的

肝細胞においてリトコール酸による遺伝子の発現調節機構を明らかにすることは、胆汁鬱滞下の病態を詳細に理解し、胆汁鬱滞下における肝細胞障害の診断・治療につながるものと期待される。そこで、本研究ではこれまでにリトコール酸による発現抑制が観察されたビリンの転写制御について詳細に明らかにすることを目的とする。リトコール酸の肝細胞毒性について種々の研究が行われているものの、分子生物学的観点からの研究は認められず、シグナル伝達の一端を担う分子として捉えることで、新たな一面が垣間見られることが期待される。また、近年リトコール酸が腸内細菌の産物として乳幼児の肝実質細胞の分化促進に関わることが報告された。リトコール酸は核レセプターPXRの生体内リガンドとして知られており、PXRを介した下流遺伝子の調節と関連した細胞毒性機構について調べることは、単なる病態解明のみならず、リトコール酸の天然由来生理活性物質としての新規な生体内での役割を明らかにすることにも繋がっていくと期待される。これまでの研究においてもビリンの発現に核レセプターの関与が示唆されたが、転写開始点から2kbpの範囲においてプロモーターの配列解析を行なったところ、核レセプターの結合配列は見出せなかった。このことはビリンの転写制御については核レセプター以外の転写因子により調節されていることを示唆するものであり、同プロモーター部位においてビリンの転写機構とそのリトコール酸に対する応答を調べることを、本研究の目的とした。

3 . 研究の方法

ビリン転写制御に関してはマウス腸管組織での研究がもっとも進んでおり、現在ではこれらの知見をもとに小腸特異的トランスジェニックマウス作成に際し、ビリンプロモーターが用いられている。一方で、ヒト肝臓における転写制御に関してはほとんど知られておらず、本申請者がこれまでに明らかにしてきた核レセプターとの関わりについても、全くわかっていない。そこで、本申請研究ではヒト肝癌細胞株HepG2を研究モデルとして用い、肝細胞におけるビリンの基本的な転写機構を調べるためにプロモーター領域約2kbpについて、転写活性とそれに対するリトコール酸の影響について以下の実験手法を組み合わせることにより検討した。

(1) 細胞培養

ヒト肝癌細胞株HepG2を胆汁酸や核レセプター存在下で24時間またはsiRNAオリゴをトランスフェクション後5日間培養し、各種アッセイに用いる試料を調整した。

(2) 遺伝子発現定量

諸条件により培養した細胞よりRNAを調整し、これを元にcDNAを合成した。標的となる遺伝子のプライマーを用いて、リアルタイムPCRによりmRNAの発現定量を行った。

(3) 転写活性測定

デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイおよびゲルシフトアッセイにより、転写活性を測定した。レポーターベクターは、HepG2細胞全ゲノム画分からピリンプロモーター配列をPCRにより増幅し、レポーターベクターにクローニングした他、転写因子SRFやTBPの応答配列からなる最小プロモーターを有した市販のレポーターベクターを使用した。

4. 研究成果

研究開始に際し、Alexander、HepG2、HuH-7の三つのヒト由来肝癌細胞株のピリン発現量を調べたところ、HepG2がもっとも高く、HuH7が中等でありAlexanderではごくわずかであった。この結果を元に、本研究には研究材料としてHepG2細胞が適していると判断し、以下の研究に用いた。

ヒト肝癌細胞HepG2のゲノムDNAからピリンの第一エクソンからプロモーター部分上流約2kbpまでを含むフラグメントをPCRにて増幅し、サブクローニング後DNAシーケンス解析により配列を確認した。本フラグメントより適宜必要な部分を増幅し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイのためのベクター構築を行なった。予備実験により、プロモーター開始点付近はピリン発現に必須であることが示唆されたため、プロモーター開始点を含む種々の長さのピリンプロモーター部分を挿入したベクターを構築し、HepG2細胞を用いてレポーターアッセイを行った。HepG2細胞においてピリンのmRNA発現低下を引き起こすリトコール酸に対するルシフェラーゼ活性の応答を見ることで、リトコール酸応答部分の探索を行った。その結果、-100bp以内にリトコール酸刺激に応答して転写活性を抑制するプロモーター部位が存在することが推察された。本プロモーター部位は、リトコール酸のみならずデオキシコール酸やケノデオキシコール酸に対しても同程度に抑制し、ウルソデオキシコール酸に対しても弱いながら有意に抑制することが示唆された。一方、コール酸に対しては応答が見られなかった。定量PCRによりピリンのmRNA発現量を調べたところ、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸では約40%の発現抑制が認められたのに対し、リトコール酸では約10%まで抑制されていた。このことから、本プロモーター部位は種々の胆汁酸刺激に応答して転写を抑制したものの、リトコール酸に対しては選択的に転写抑制する仕組みが別に存在することが示唆された。

この100bpの塩基配列を詳細に解析したところ、-60bp付近にTATA Box様配列およびCArG Box配列の存在が認められた。(図参照)そこで遺伝子の転写開始に必要なTATA BoxやCArG Boxを含む最小プロモーターを有する市販のルシフェラーゼレポーターアッセ

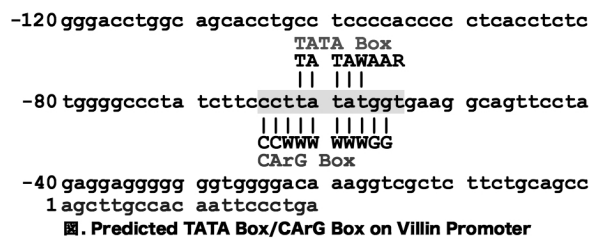


図4. Predicted TATA Box/CArG Box on Villin Promoter

イベクターを用いてリトコール酸への応答を観察したところ、どちらもリトコール酸による転写活性の強い抑制が観察された。このとき、TBPやSRFといったそれぞれの応答配列に結合する転写因子の発現量に変化は認められなかった。TBPとSRFがピリン発現調節にどのように関わっているのか調べるために、これら転写因子をsiRNAによりノックダウンし、そのときのピリン発現を観察した。SRFノックダウンではピリンの発現は有意に低下した一方、TBPノックダウンでは有意に上昇した。この結果から、ピリン発現にはSRFが重要な役割を果たしており、同一部位にTBPが競合的に結合することで、ピリン発現を抑制している可能性が示唆された。

これらのことから、ヒト肝がん細胞HepG2において、ピリン転写調節にはSRFやTBPといった転写因子が関与しており、これらはリトコール酸刺激に応答して転写活性が低下し、ピリンの発現が

抑制されると推察された。予備実験において調べた三種の肝癌細胞株の中でHepG2が最も高いピリンの発現を示したが、SRFおよびTBPの発現量も最も高かった。これまでにピリンがSRFの標的遺伝子の一つであることがプロモーター塩基配列から予測され報告されていたものの、実際にピリン転写にSRFが関わっていることを確認したのは、本研究が初めてである。[2] また、SRFやTBPといった転写因子がリトコール酸刺激による影響を受けることを示したのも、本研究における新規な発見である。一方でこれらの転写因子がリトコール酸に対しどのように応答しているのかその詳細は不明のままであり、SRFとTBPのピリン発現における競合的調節機構についても今後の課題である。

<引用文献>

Miano JM, Long X, Fujiwara K. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(1) C70-81. 2007

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Ozeki M, Aini W, Miyagawa-Hayashino A, Tamaki K. Prevention of Cell Growth by Suppression of Villin Expression in Lithocholic Acid-Stimulated HepG2 Cells. *J Histochem Cytochem.* 67(2) 129-141. doi: 10.1369/0022155418804507. 2019 査読有

[学会発表] (計 3 件)

尾関宗孝、玉木敬二、リトコール酸によるvillinの発現抑制作用に関する研究、第24回肝細胞研究会、2017

Munetaka Ozeki、Leila Jemai、Hirozo Minami、Hitoshi Abiru、Keiji Tamaki、Suppression of villin expression and cell growth arrest by lithocholic acid in HepG2 human hepatocarcinoma cells、24th Congress of the International Academy of Legal Medicine/ 第102次日本法医学会学術集会 合同開催、2018

尾関宗孝、玉木敬二、ヒト肝癌細胞株HepG2におけるリトコール酸によるピリン発現抑制に関する研究、第91回日本生化学会大会、2018

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。