

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11758

研究課題名（和文）ヒト非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の肝遺伝子発現クラスター調節因子の検討

研究課題名（英文）Gene regulation in the liver of human non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

研究代表者

安田 和基（Yasuda, Kazuki）

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80311611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：以下NASH）の組織試料の網羅的な遺伝子発現解析から得た「遺伝子クラスター」について発現を変化させるシグナルや転写因子を、ヒト細胞株を用いて探索した。主な標的としたAKR1B15遺伝子はNrf2活性化で発現が誘導されるが、発現調節AKR1B10と比較し、同一クラスターでも発現調節機構が複雑であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは極めて頻度の高い疾患であるだけでなく、肝がんの発生源地として、また心血管病変のハイリスクとして重要であるが、病態の多くが不明で決定的な治療法のない、unmet medical needsの疾患である。本研究は、実際のヒト組織を用いて得た知見をもとに複雑なNASHの分子病態を明らかにしてゆく必要性を示し、診断・治療薬の開発への道を開く情報を提供する。

研究成果の概要（英文）：Based on our previous transcriptome study of the liver obtained from Japanese NASH (non-alcoholic steatohepatitis) subjects, we selected AKR1B15, a novel member belonging to the same family as AKR1B10. Using human hepatocyte cell line HuH7, we found the Nrf2 activation significantly increased AKR1B15 expression, and this was mediated by direct binding of Nrf2 to one ARE (Antioxidant Response Element) in the promoter region of this gene. This pathway is distinct from AKR1B10 induction, suggesting complex pathophysiology of NASH.

研究分野：生活習慣病、内分泌・代謝学

キーワード：NASH 生活習慣病 遺伝子発現調節

1. 研究開始当初の背景

肝への脂肪蓄積を特徴とする「非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: 以下 NAFLD)」のうち、約 10%は慢性炎症と肝細胞障害をとともなう「非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: 以下 NASH)」であり、一般に日本人・アジア人では白人に比べ、肥満度の割に NASH の罹患率が高いとされる。NASH が臨床的に注目される第 1 の点は、NASH の約 5-10%が放置すれば肝硬変に移行し、**肝がんの発生母地**となることであり、もう 1 つは、NASH が「**メタボリック・シンドローム**」の肝での表現型とされ、高率にインスリン抵抗性、糖尿病など代謝異常をとともない、**心血管疾患の罹患率も高い**ことである。しかし NASH の確定診断には侵襲的な肝生検が必須で、血液バイオマーカーや画像検査は補助的な位置づけであり、またごく一部を除いて、有効な薬物治療はほとんど存在しない。NASH の病態については、「肝への脂肪蓄積」から一部が「炎症」の段階へ進行するという単純な「two-step theory」から、最近ではさまざまな病態が初期から並行して関与する「**multiple parallel hits hypothesis**」が支持されつつあるが、NASH モデル動物は、ヒト NASH の臨床像とはかなりの違いがあり、ヒト肝組織を用いた NASH のオミックス研究は世界でも意外に少なく、NASH の病態の分子メカニズムはほとんど不明である。すなわち NASH は、最も頻度の高い疾患の一つでありながら、診断・治療・病態解明における典型的な「**unmet medical needs**」といえる。その主な理由は、通常の内科診療におけるエコーガイド下針生検の残余肝試料は、きわめて微量で多層的な解析が難しく、一方肝がん症例の外科治療時の肝組織は、炎症機転が終息し線維化が進んだ、いわゆる「burned-out NASH」が多いためである。

我々は平成 22 年より 27 年までの先行研究「多層的疾患オミックス解析プロジェクト」(医薬基盤研究所)にて、四谷メディカルキューブ笠間和典先生、関洋介先生たちとの共同研究にて、高品質のヒト NASH 肝組織検体を収集し、多層オミックス解析を行ってきた。その結果、unsupervised clustering 解析により、遺伝子発現パターンの類似する多くの遺伝子クラスターを得てきた。平成 28 年~30 年科学研究費補助金基盤(C)「ヒト非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の新規病態解明と画期的診断法への試み」(研究代表者:安田和基)にて、ヒト肝細胞株 HuH7、ヒト肝星細胞株 LX-2 を用いて、AKR1B10 など一部の遺伝子調節機構を解析に着手したところであった。

2. 研究の目的

NASH について、ヒト肝組織試料の網羅的な遺伝子発現プロファイル解析から得られた、病態を形成する遺伝子クラスターについて、興味ある遺伝子を抽出し、発現を調節する刺激の探索、ゲノム遺伝子上流のプロモータ活性の解析、発現調節を担う転写因子の解析、当該遺伝子によってさらに発現が調節される分子パスウェイの解析、などを行い、NASH の病態の解析から、将来の非侵襲的な病態診断への道を拓く。

3. 研究の方法

我々が先行研究から得たさまざまな機能的な遺伝子クラスターから、興味ある遺伝子を抽出し、発現を調節する刺激の探索、ゲノム遺伝子上流のプロモータ活性の解析、解析)にて、AKR1B10 を含む約 500 の遺伝子の、NASH 特異的、あるいはステージ特異的な発現変化を見出している。

(1) 遺伝子発現クラスターを調節する刺激の探索

我々が先行研究から得たさまざまな機能的な遺伝子クラスターから、興味ある遺伝子を抽出し、発現調節機構を解析する。ヒト肝実質細胞の系として HuH7 細胞を用い、NASH に関与する刺激・病態を探索する。具体的には、脂質(0.5mM パルミチン酸)、ER スト

レス(0.5mM および 1mM タブシガルギン(TG)), 炎症シグナル(50ng/mL TNF、25ng/mL IL など)、酸化ストレス(100mM NRF2 活性化剤 tBHQ など)、低酸素(塩化コバルト)、線維化誘導(10ng/mL TGF- β 1)、あるいはこれらの組み合わせにより、遺伝子の発現変化が再現されるかを検証し、クラスターの上位調節因子を同定する。具体的には、細胞に刺激を行った 24 時間後に RNA を抽出し、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法で測定した。

(2) 転写調節因子、及び転写調節領域の同定:

標的遺伝子とその刺激因子について、ゲノム上転写開始点より 5' 側の上流配列を用いたプロモータコンストラクトを用いて、刺激後 2-4 時間の時点での検討(ルシフェラーゼアッセイ)により、転写調節領域を同定する。また刺激から推定される転写因子について、siRNA を導入することで発現誘導が抑制されるか、強制発現で発現誘導が再現されるか、を検討する。上記両者の情報をもとに、転写調節ゲノム領域に存在する、転写因子結合予想配列について、転写因子の結合をクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)などで解析する。

(3) 標的遺伝子の過剰発現系をもちいた機能解析:

標的遺伝子を HuH7 細胞に過剰発現させたのち、発現が変動する遺伝子群を解析し、標的遺伝子が制御する機能的ネットワークを同定する。

(このほか、miRNA との関係、血中バイオマーカーの探索なども可能であれば予定していたが、コロナ禍他の理由で施行できなかった)

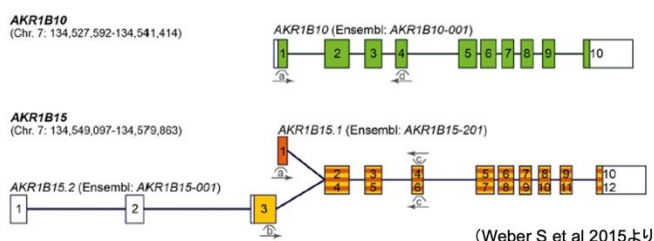
4. 研究成果

1) 標的遺伝子の抽出

得られたサブクラスター、および NASH における発現のたかい遺伝子から、興味深い遺伝子として、NASH や NASH 発がんにおける発現や病態との関係が病理学的、生化学的に注目されている *AKR1B10* (Aldo-keto reductase family 1 member B10) と同じクラスターに属し、同じ分子ファミリーに属する *AKR1B15* を取り上げ、肝細胞における発現誘導因子の探索と発現制御機構の解析を行った。われわれはすでに先行研究にて、*AKR1B10* は、HuH7 細胞と HepG2 細胞において、低酸素刺激を mimic した塩化コバルト(CoCl_2) 刺激を行うと、*AKR1B10* 発現量が大きく増加すること、 CoCl_2 刺激の応答領域はヒト *AKR1B10* 遺伝子転写開始点上流 1kb までのプロモーター内に存在すること、一方これらに発現誘導には HIF1A、HIF2A は関与していないこと、などを示している。

AKR1B15 は、2011 年に新規の AKR family 遺伝子として報告され、ヒトでは *AKR1B10* と 91% 相同性があり、かつ同じ染色体上に近接して存在するため、機能的な関連が示唆されるが、これまで発現調節や機能についてはほとんど報告がなかった。また *AKR1B15* のヒト以外の種での存在も明らかでない。*AKR1B15* には、転写開始点の異なる 2 つのアイソフォーム(*AKR1B15.1* および *AKR1B15.2*) が存在することが知られている(図 1)。

図1: AKR1B15の2つのisoform



いずれも、脂肪組織、骨格筋、胸腺、甲状腺、生殖組織(卵巣、胎盤、前立腺、精巣)で高発現しているとされるが、機能や調節機構の違いは明らかでない。

2) 発現調節刺激の探索

HuH7 細胞に対して、1 時間の刺激ののちに RNA を回収し、*AKR1B15.1*、*AKR1B15.2* それぞれについて発現量を検討した結果は、以下のようになった。

ア AKR1B15.1、AKR1B15.2 共通して発現変化を認めたもの：

Thapsigargin : いずれも上昇
CoCl₂(低酸素刺激を想定) いずれも上昇

イ AKR1B15.1、AKR1B15.2 共通して発現変化を認めたもの

TGF : AKR1B15.1 上昇、AKR1B15.2 不変

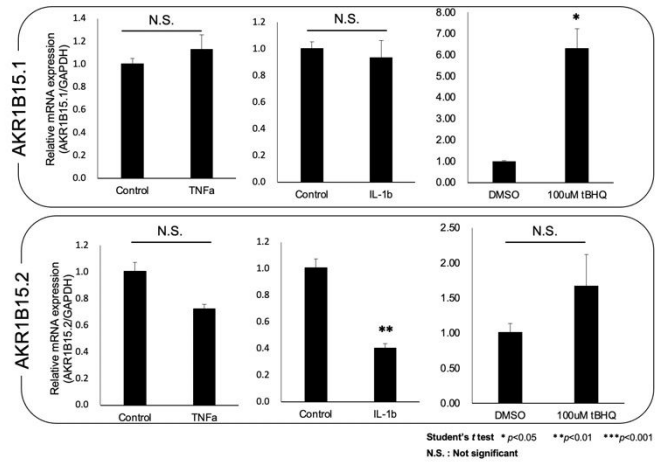
IL-1 : AKR1B15.1 不変、AKR1B15.2 低下

tBHQ : AKR1B15.1 上昇、AKR1B15.2 不変 (図2)

ウ AKR1B15.1、AKR1B15.2 ともに発現変化を認めなかったもの

Palmitic acid、TNF

図2: AKR1B15の発現量変化と各種刺激との関連

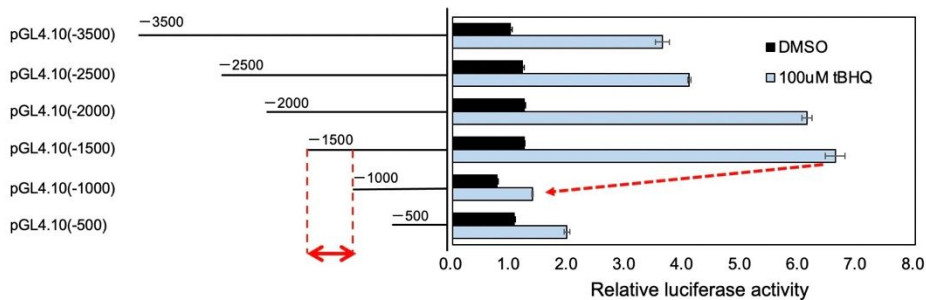


3) AKR1B15.1の遺伝子発現調節領域の探索

上記のうち、我々はHuH7細胞において、NRF2活性化剤とされるtBHQ刺激によりAKR1B15.1の発現が約6倍上昇することに注目した。AKR1B15.1の転写開始点から上流のゲノム配列を、様々な長さでレポーターコンストラクトに結合させて、tBHQ刺激による転写活性変化を検討した。その結果、転写開始点上流1.5kbから1kbまでの間の領域がこの作用を仲介することが示された(図3)。

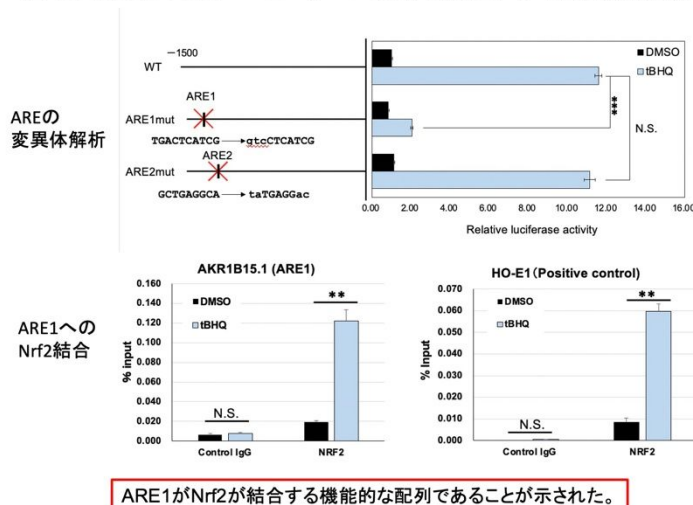
次にこの領域で、Nrf2が結合するとされるARE(Antioxidant Response Element)を、in silico解析により探索したところ2箇所見つけた。それぞれをARE1 ARE2と便宜的に名付けて、それぞれに変異体を導入したコンストラクトを用いたプロモータ活性の解析を行った。その結果、ARE1に変異を導入した時のみ、tBHQによる転写活性上昇が消失した(図4)。以上より、tBHQ刺激によるAKR1B15.1の発現上昇については、ARE1が機能的な配列であることが想定された。

図3: AKR1B15.1プロモーター中のNRF2応答領域の探索



- ・ -1500~-1000の間にNRF2応答領域があると予測した。
- ・ここには2つのARE(antioxidant response element)が存在

図4: AKR1B15.1プロモーターにおけるNrf2による発現調節領域

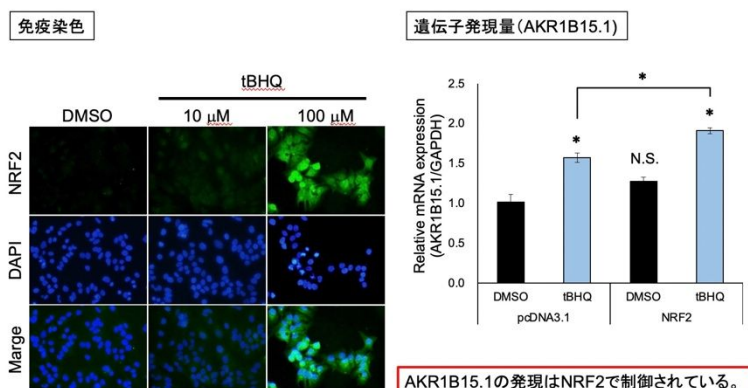


ARE1がNrf2が結合する機能的な配列であることが示された。

4) AKR1B15.1の遺伝子発現調節に関わる候補転写因子Nrf2

AKR1B15.1の遺伝子発現調節に関わる候補転写因子として、Nrf2が考えられたので、HuH7細胞でNrf2の強制発現を行なったところ、AKR1B15.1の発現は確かに上昇した(図5)。一方Nrf2に対するsiRNAを導入してNrf2の発現をあらかじめ抑制しておくと、tBHQによるAKR1B15.1の発現上昇は完全に抑制された。

図5: NRF2強制発現によるAKR1B15.1発現への影響



AKR1B15.1の発現はNRF2で制御されている。

Student's t test * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001
N.S.: Not significant

先の実験で機能的と想定されたARE1と、Nrf2との結合を、Nrf2に対する抗体を用いたChIPアッセイにより検討したところ、直接の結合が示された。

以上より、AKR1B10とAKR1B15は、NASH肝の解析で同じ遺伝子クラスターに存在し、機能的な類似性も予想されるにも関わらず、少なくともin vitroではかならずしも調節機構が完全に同一ではないことが明らかになった。

5) AKR1B10、AKR1B15によって発現が調節される分子の解析、

AKR1B10はNASH発がんとの関連も示唆されている。AKR1B10あるいはAKR1B15の全長cDNA配列を用いて、これらそれぞれを恒常的に過剰発現させるHuH7細胞株を作成し、誘導される遺伝子群を検討した。まだ予備的な結果であるが、細胞増殖に関わる遺伝子や代謝に関わる遺伝子群には大きな変化はないこと、いずれの場合もコラーゲン遺伝子が発現誘導されること、阻害剤を用いた実験などから、この誘導にはTGFシグナル以外の調節機構が存在すること、が想定された。すなわち、NASHの発がん母地としての線維化誘導に新たな経路を介して寄与している可能性が考えられた。

以上の実験は、研究協力者である舟橋伸昭氏(現、東京工業大学)によるところが非常に大きい。ここに感謝の意を表します。

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 0件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Kuramoto J, Arai E, Fujimoto M, Tian Y, Yamada Y, Yotani T, Makiuchi S, Tsuda N, Ojima H, Fukai M, Seki Y, Kasama K, Funahashi N, Udagawa H, Nammo T, Yasuda K, Taketomi A, Kanto T, Kanai Y. | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Quantification of DNA methylation for carcinogenic risk estimation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Clin Epigenetics | 6. 最初と最後の頁 168 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-022-01379-4 | 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 - |

〔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 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 南茂隆生, 安田和基 |
| 2. 発表標題 ヒトNASH肝で高発現するAKR1B15の発現は転写因子NRF2によって正に制御される |
| 3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 南茂隆生, 舟橋伸昭, 宇田川陽秀, 植木浩二郎, 安田和基 |
| 2. 発表標題 自然発症糖尿病モデルマウスにおいて環境因子が肝臓エピゲノム・遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的検討 |
| 3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 |
| 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 |
|-------|----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 舟橋 伸昭 (Funahashi Nobuaki) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |