

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11713

研究課題名（和文）ニトロ化ストレスによるエピジェネティック制御とNASH病態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of epigenetic control and NASH pathogenesis by nitrosative stress.

研究代表者

鈴木 敬一郎（Suzuki, Keiichiro）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70221322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態には、酸化ストレスの関与が指摘されている。本課題では、肝炎で増加するペルオキシ亜硝酸イオン(ONOO-)によるエピジェネティック制御を解析し、肝炎との関連について検討した。その結果、ONOO-はDNA修飾酵素の発現などにより、DNAのメチル化を促進した。これにより、糖転移酵素の発現が抑制され、HGF受容体の糖鎖構造が変化し、HGFシグナルが低下した。HGFシグナルの低下はインスリン抵抗性や脂肪肝の発症などNASH病態に関与していることから、活性窒素種はエピジェネティック制御によりNASHを悪化させ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

エピジェネティックな調節因子を治療の標的とするアプローチは、肝がんの有望な治療法として注目されている。非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は患者数が増加しているが、その発症機序などは明らかになっていない。本課題では活性窒素種によるエピジェネティックな作用を解析し、糖鎖構造が改変されHGFシグナル伝達が抑制されるなどの新知見を得た。HGFはNASHでの肝細胞保護作用があり治療に有効とされているが、本研究課題の結果から、活性窒素種の産生を抑制することでタンパク質機能が保護され、より治療効果を促進させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) involves the involvement of oxidative stress. In this study, we analyzed the epigenetic regulation by peroxynitrite (ONOO-) increased in hepatitis and examined its association with hepatitis. As a result, ONOO- promoted DNA methylation by affecting the expression of DNA-modifying enzymes. Consequently, the expression of glycosyltransferase was suppressed, leading to alterations in the glycan structure of the HGF receptor and a decrease in HGF signaling. Since the decrease in HGF signaling is implicated in the pathogenesis of NASH, such as insulin resistance and fatty liver development, reactive nitrogen species were suggested to exacerbate NASH through epigenetic regulation.

研究分野：病態生化学

キーワード：ニトロ化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルス性肝炎やアルコール性肝炎は発症機序の解析が進み、患者に対する治療が進んでいる状況であるが、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は患者数の増加にもかかわらず発症機序や病態に不明な点が多いため、病態の理解が急務となっている。NASH で増加する一酸化窒素 (NO) やペルオキシ亜硝酸イオン (ONOO⁻) などの酸化ストレスが、NASH の病態やがん化に関与しているといわれているが、その機序としてはタンパク質のニトロ化や酸化傷害が報告されているのみであり、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。

(2) 肝炎などで障害が生じたときの細胞修復において、肝細胞増殖因子 (HGF) が重要な役割を担っている。HGF は受容体である c-Met に結合し、シグナルを伝達して肝細胞の増殖と再生に機能したり、また肝臓の線維化の進行を抑制する効果があるなど、肝細胞の保護に働く因子である。c-Met には N 型糖鎖が付加しており、HGF のシグナル伝達に関与していることが報告された。この N 型糖鎖に含まれているフコースがシグナルに関与していることが示唆されており、HGF の機能に重要であると考えられた。また、これまでに申請者は、肝炎モデル動物で糖鎖構造が変化し、がん化に関与していることを見出すなど、糖鎖が肝炎の進展などに関与している可能性を報告してきたが、その詳細な機序は明らかになっていなかった。

(3) 予備実験において申請者は、肝炎で増加する ONOO⁻ により糖転移酵素である 1,6 フコシルトランスフェラーゼ 8 (FUT8) の活性が低下することを見出していた。FUT8 はフコースを糖鎖に付加する酵素であり、c-Met の糖鎖にもフコースが含まれている。したがって、FUT8 の機能低下は HGF シグナルに影響し、肝機能の憎悪につながると考えた。FUT8 の機能が低下する原因として、ONOO⁻ により DNA メチル化転移酵素やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) などの発現や機能が変化し、その結果としてエピジェネティックな制御が変化している可能性を示唆するデータを得ていた。

2. 研究の目的

本課題では、ONOO⁻ によるエピジェネティックな変化を解析し、FUT8 の発現および HGF シグナルの変化による肝炎との関連を解析することである。これは、従来報告されてきた ONOO⁻ によるタンパク質の酸化修飾だけでなく、エピジェネティックな作用を持つことによる影響の解析となる。DNA のメチル化は細胞分裂でも維持されることから、エピジェネティックな変化は遺伝子発現を長期に渡って抑制することが考えられ、NASH のがん化にも深く関与している可能性が考えられる。

3. 研究の方法

(1) 材料

解析にはヒト肝がん細胞である HepG2 を用いた。また、ONOO⁻ の投与は SIN1 (Dijindo) を用いた。

(2) HGF 刺激による受容体 c-Met のリン酸化の解析

SIN1 で処理した HepG2 にリコンビナント HGF を作用させたのち、細胞を可溶化してウエスタンブロッティングにより c-Met のリン酸化を検出して評価した。

(3) FUT8 の活性および発現の変化の解析

HepG2 を SIN1 にて処理したのち、細胞を可溶化して FUT8 活性を HPLC にて測定した。基質には 2-アミノピリジンで蛍光標識した 2 本鎖糖鎖を用いた。FUT8 のタンパク質発現は特異抗体を用いたウエスタンブロッティングにより評価した。mRNA の発現は TaqMan プローブを用いてリアルタイム PCR により評価した。

(4) レクチンプロット

HepG2 から c-Met を特異抗体により免疫沈降して精製し、フコースを認識するレクチンである AAL を用いてレクチンプロットして糖鎖構造を評価した。

(5) FUT8DNA のメチル化と DNMT1 のニトロ化

HepG2 の DNA をバイサルファイト化により処理し、メチル化を評価した。また、HepG2 を SIN1 で刺激し、DNMT1 を免疫沈降で精製した後、ニトロチロシンの抗体を用いてニトロ化をウエスタンブロッティングにより評価した。

(6) 遺伝子発現解析

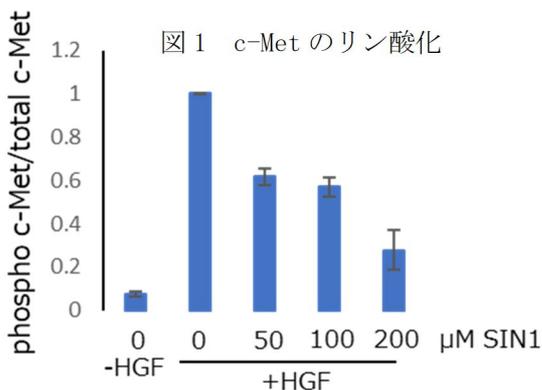
HepG2 より得た RNA から cDNA を合成し、DNA Array plate を用いたリアルタイム PCR により遺伝子の発現変化を評価した。

(7) 酸化ストレスモデルマウス肝臓の RNA のエピジェネティック変化

SOD1 を欠失したマウスの肝臓より RNA を抽出し、EpiQuik m6A RNA Methylation Quantification Kit を用いて RNA のメチル化を評価した。

4 . 研究成果

(1) HGF 刺激による受容体 c-Met のリン酸化の解析

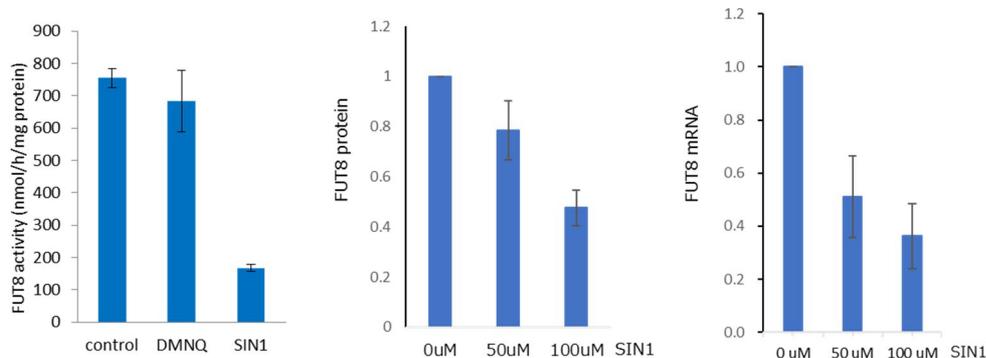


SIN1 で処理した HepG2 を洗浄後、リコンビナント HGF を反応させた。反応させた細胞を可溶化し、リン酸化 c-Met を認識する抗体でウエスタンブロットした。

その結果、無処理の細胞ではリン酸化された c-Met が検出されたが、SIN1 により、リン酸化は低下した(図 1)。このことから、ONOO⁻ の作用により HGF によるシグナルが阻害されていることが示唆された。HGF のシグナル伝達において、糖鎖が関与していることが報告され、また申請者のこれまでの研究で得られた活性酸素が糖鎖構造を変化させるという知見から、このシグナル伝達の阻害効果は、ONOO⁻ により c-Met の糖鎖構造に変化が生じた可能性が考えられた。

(2) FUT8 の活性および発現の変化の解析

図 2 FUT8 のタンパク質発現、酵素活性、mRNA 発現



c-Met のシグナル伝達にフコースが関与しているとの報告から、フコースの変化に着目した。HepG2 を SIN1 にて処理したのち、蛍光標識した糖鎖を用いた HPLC 解析による FUT8 活性の測定、ウエスタンブロッティングによる FUT8 タンパク質の発現、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR による FUT8mRNA の発現の解析を行った。

その結果、酵素活性およびタンパク質発現が SIN1 により低下していた(図 2)。当初は FUT8 のタンパク質がニトロ化などの修飾による障害を受ける可能性を考えていたが、ニトロ化もニトロ化も変化がなかったため、FUT8 酵素活性の低下は転写レベルでの抑制を受けていることが考えられた。そこで mRNA の発現を測定したところ、mRNA の低下が認められたことから、ONOO⁻ は転写を抑制して FUT8 を阻害することが示唆された。

また、FUT8 の酵素活性は、スーパーオキシドを産生する DMNQ の刺激では変化が認められなかったことから、FUT8 の発現変化は ONOO⁻ に特異性があることが示唆された。

(3) レクチンプロット

ONOO⁻により FUT8 の発現が抑制されることが認められたため、c-Met の糖鎖に含まれるフコースが低下していることが考えられた。c-Met の糖鎖のフコースを解析するため、ONOO⁻で刺激した HepG2 を可溶化し、c-Met の抗体で免疫沈降した試料を SDS 電気泳動し、フコースを認識するレクチンである AAL を用いてレクチンプロットを行った。

図3 c-Met のレクチンプロット

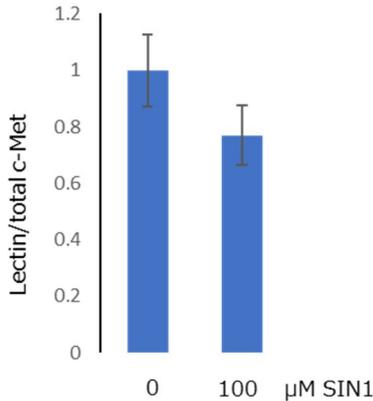
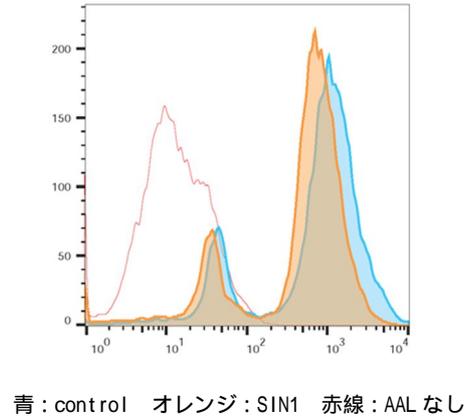


図4 HepG2 細胞表面への AAL レクチンの結合性



その結果、SIN1 処理によりレクチンの反応性が低下したことから、c-Met の糖鎖に含まれるフコースが減少していることが示唆された (図3)。c-Met には 11 か所の N 型糖鎖の付加可能部位が存在しているため、今回の検討ではどの糖鎖が最も影響しているかを確認することはできなかったが、c-Met の サブユニットとベータサブユニットから構成される SEMA ドメインに含まれる糖鎖がシグナルを正に、SEMA ドメイン以外の糖鎖が負に制御するとの報告があることから、NO によるフコースの低下は SEMA ドメイン以外の 5 か所の糖鎖に生じている可能性が考えられた。

ONOO⁻により FUT8 の発現が低下していたことより、c-Met 以外のフコースの影響をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、HepG2 細胞の表面に存在する糖鎖への AAL レクチンの結合性の低下が認められた (図4)。このことから、ONOO⁻によるフコースの影響は、特定のタンパクだけでなく細胞全体に影響を及ぼすことが示唆された。フコースは HGF シグナル以外にも多くのタンパク質機能に関与しているため、さらなる解析が必要であることが考えられた。

(4) DNMT1 のニトロ化と FUT8DNA のメチル化

図5 FUT8DNA のメチル化

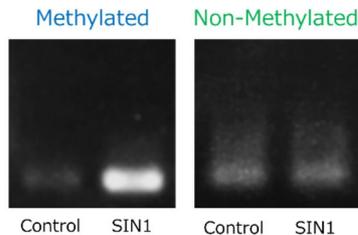
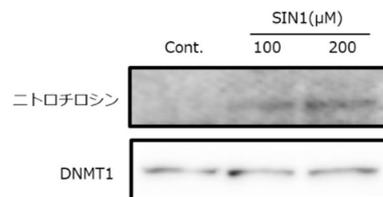


図6 DNMT1 のニトロ化



ONOO⁻により FUT8 の発現抑制がエピジェネティックなものであるかを検討するため、FUT8DNA のメチル化解析を行った。その結果、メチル化の増加が認められたことから、転写の抑制が生じていることが示唆された (図5)。さらに、DNA のメチル化を触媒する酵素である DNMT1 は SIN1 によりニトロ化されていた (図6)。このことから、ONOO⁻は DNA メチル化転移酵素を修飾することにより DNA のメチル化に影響を及ぼしていることが示唆され、その結果として FUT8 の発現が抑制されたと考えられた。

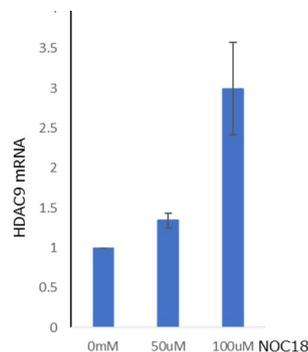
(5) 遺伝子発現解析

HepG2 より得た RNA から cDNA を合成し、Taqman Array plate を用いたリアルタイム PCR により遺伝子の発現変化を評価した。

表1 DNA アレイによる遺伝子発現解析

SIN1	100 μ M	200 μ M
CHD4	1.10	1.27
DNMT3A	0.95	0.72
HDAC2	0.87	1.77
HDAC3	1.26	1.11
HDAC4	1.34	3.20
HDAC5	1.13	1.69
HDAC6	1.16	0.72
HDAC9	4.12	5.42
MBD2	1.11	0.59
MECP2	1.06	2.27
RBBP7	0.76	2.21
SAP30	0.09	0.64
SIN3A	0.92	1.17

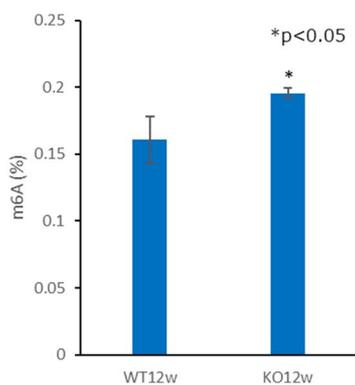
図7 HDAC9 の mRNA の発現



実験開始前の予備実験では、DNMT の発現の変化によりエピジェネティックな変化が生じていると考えていたが、解析を進めたところ、DNMT よりも発現が亢進している分子が見つかった(表1)。ヒストンの脱アセチル化を触媒する HDAC は、ONOO⁻により発現誘導を受け、中でも HDAC9 の発現が顕著であった。HDAC9 はヒストンのアセチル化状態を制御することによって遺伝子発現を調節している酵素である。ヒストンのリジンはアセチル化を受けるとクロマチン構造が緊密化し、遺伝子の転写が抑制される。また、肝炎や脂肪性肝疾患 (NAFLD) にも関与していることが報告されていることから、ONOO⁻による HDAC9 の発現促進は、肝疾患に対してエピジェネティックな影響を与えている可能性が考えられた。さらに、HDAC9 の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析すると、SIN1 の濃度依存的に発現の増加が認められた(図7)。

(6) 酸化ストレスモデルマウス肝臓の RNA のエピジェネティック変化

図8 RNA のメチル化解析



ONOO⁻により HDAC の発現促進を介した DNA のエピジェネティックな影響が認められたが、考えていたよりも多くの種類の因子が影響を受けていたことから、DNA だけでなく RNA も同様の影響を受け、翻訳に影響している可能性が想定された。そこで RNA のエピジェネティック制御の解析を酸化ストレスモデルマウスである SOD1 ノックアウトマウスで検討した。

RNA はメチル化などによる制御を受けており、中でも N6-メチルアデノシン (m6A) は最も多く認められる修飾である。これにより、細胞の分化や脂肪の生成、翻訳、分解など、多くの生命現象が影響を受ける。したがって、FUT8 などのタンパク質発現にも関与している可能性が考えられた。

SOD1 を欠失したマウスの肝臓より RNA を抽出し、RNA のメチル化を検討したところ、m6A の増加が認められた(図

8)。今回の解析では m6A の生成にかかわる分子の同定まではできなかったが、RNA のメチル化が酸化ストレスにより生体内で増加していることが認められたことから、活性酸素は DNA のみならず RNA にも作用して代謝を制御している可能性が示唆された。

(6) まとめ

NO や活性酸素は、反応性が非常に高いため特異性が低く、寿命が短いなど解析が困難な分子種である。しかし、活性酸素の産生増加は多くの疾患の憎悪因子として関与しており、また老化や寿命にも影響を及ぼしている。特に肝炎では非常に多くの活性酸素が産生され、細胞死やがん化などに関与していることが報告されているが、具体的にどの分子がどのような機序で機能不全に陥るのかは明らかでなかった。今回の検討では、ONOO⁻により DNA メチル化酵素や HDAC などの発現や機能が変化し、糖転移酵素の発現が減少することにより HGF シグナルが減弱することがわかった。このことにより、活性酸素が肝炎の憎悪に関与する具体的なメカニズムの一端を明らかにすることができたと考えられる。今後は DNA と RNA のエピジェネティック解析を進めることにより、肝炎から肝がんへの進展機序を明らかにし、予防法の開発につなげたい。

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 1件）

1. 発表者名 江口裕伸、鈴木敬一郎 他4名
2. 発表標題 Effects of peroxynitrite on the fucosylation and phosphorylation of c-Met in HepG2 cells
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江口裕伸、鈴木敬一郎 他5名
2. 発表標題 HepG2細胞におけるc-Metのフコシル化およびリン酸化に対するNOの影響
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023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	江口 裕伸 (Eguchi Hironobu) (60351798)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	
研究分担者	崎山 晴彦 (Sakiyama Haruhiko) (30508958)	千里金蘭大学・生活科学部・准教授 (34439)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤原 範子 (Fujiwara Noriko) (10368532)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	吉原 大作 (Yoshihara Daisaku) (00567266)	兵庫医科大学・薬学部・助教 (34519)	

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