

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07200

研究課題名(和文)核内受容体による薬物応答をモデルとしたエピゲノムセンサーの評価系確立と探索

研究課題名(英文)Development of epigenome sensor model mediated by nuclear receptor pathway

研究代表者

幅野 渉 (Habano, Wataru)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50332979

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)：化学物質の曝露を受けた細胞では、核内受容体を介して薬物代謝酵素の発現が誘導され解毒が促進される。例えば核内受容体AhRは転写因子としてCYP1遺伝子のXRE配列に結合する。我々は、ヒト肝臓がん細胞において、-ナフトフラボン(NF)曝露によるCYP1B1遺伝子発現の誘導が、DNA脱メチル化で増強されることを見出した。AhR抗体を用いたクロマチン免疫沈降産物を対象にDNAメチル化解析を行った結果、AhRは非メチル化状態のXRE配列と選択的に結合することが明らかになった。AhRを介した応答性が標的配列のメチル化状態により制御される可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは生体外のストレスを感知して様々な反応をする。ヒト肝臓がん細胞に曝露したNFは環境汚染物質であり、我々は核内受容体を介したストレス応答モデルを想定し、AhRのエピゲノムセンサーとしての役割を探索した。本研究で用いた新しい手法は、従来のレポーターアッセイやゲルシフトアッセイとは異なり、NF曝露により活性化されたAhRと標的XRE配列との結合を自然なクロマチンの状態で評価できることが最大の特長である。本研究の成果は、他の転写因子が関わるストレス応答においても、DNAメチル化による応答性制御の評価に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Exposure to xenobiotic compounds induces drug metabolizing enzymes through activation of nuclear receptor and promotes detoxification. For example, the ligand-activated nuclear receptor AhR, as a transcription factor, binds to XRE sequences in the regulatory region of the CYP1 gene. We found that DNA demethylation enhances the CYP1B1 gene expression induced by treatment with -naphthoflavone (NF). Chromatin immunoprecipitation using anti-AhR antibody revealed that AhR preferentially bound to XRE sequences without methylation. These results suggested that stress response mediated by AhR is regulated by DNA methylation status of target XRE sequences.

研究分野：薬物動態学

キーワード：核内受容体 エピゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトは生体内外のストレスを感知して様々な反応をする。例えば、ダイオキシン類や  $\beta$ -ナフトフラボン (NF) などの曝露を受けた細胞では、核内受容体である AhR (aryl hydrocarbon receptor) を介してシトクロム P450 (CYP) 1 代謝酵素の発現が誘導され、解毒反応が促進される。我々は、NF 曝露による *CYP1B1* 遺伝子発現量の誘導が、5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) の前処理による脱メチル化でさらに増強されることを明らかにしてきた。これらの結果は、核内受容体を介したストレス応答に DNA メチル化が関与する可能性を強く示唆したが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

AhR が転写因子として結合する *CYP1B1* 遺伝子の各 XRE (xenobiotic responsive element) は CACGC で構成され、DNA メチル化の標的となる CpG 配列が含まれる。我々は、AhR が XRE 配列のメチル化状態を感知して標的遺伝子の発現応答性を制御する「エピゲノムセンサー」の役割を果たす可能性を推測した。本研究では、AhR が非メチル化状態の XRE 配列と選択的に結合し、*CYP1B1* 遺伝子の発現を誘導することを検証するため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) と DNA メチル化解析を組み合わせた新しい手法の開発を試みた (図 1)。

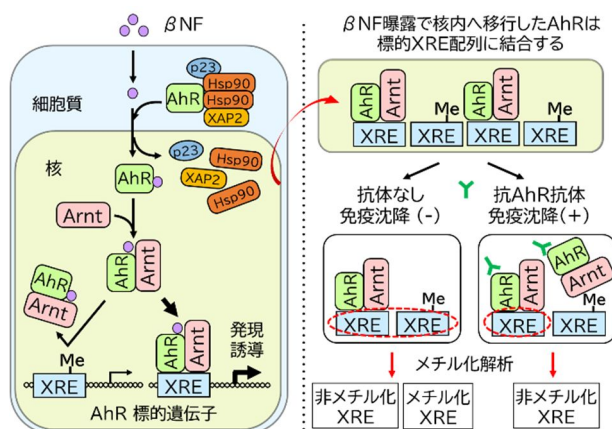


図 1. クロマチン免疫沈降と DNA メチル化解析を用いたエピゲノムセンサーの評価手法

### 3. 研究の方法

#### (1) *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性及び DNA 脱メチル化の影響

ヒト肝臓がん細胞株 HepG2 および HuH7 を対象に、溶媒コントロール (PBS または DMSO)  $10 \mu\text{M}$  NF (4 h)  $0.5 \mu\text{M}$  DAC (72 h)  $0.5 \mu\text{M}$  DAC (72 h) +  $10 \mu\text{M}$  NF (4 h) のいずれかの薬物処理を行った。各細胞より RNA を回収・精製し、逆転写反応の後、SYBR Green を用いた定量的 PCR を行い、検量線法により *CYP1B1*、*AHR*、*ARNT* (AhR nuclear translocator)、*ACTB* の遺伝子発現量を測定した。各遺伝子の発現量を *ACTB* 発現量により補正し、PBS 処理群に対する発現量比を算出した。

#### (2) DNA メチル化により *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性が制御される XRE 配列の探索

HepG2 および HuH7 細胞よりゲノム DNA を抽出・精製し、sodium bisulfite 処理後に、*CYP1B1* 遺伝子転写調節領域の 8 箇所の XRE (XRE1 ~ 8) 配列における DNA メチル化状態を調べた。DNA メチル化はサンガー法による direct sequencing または制限酵素 (HpyCH4IV) による切断パターンにより評価し、メチル化のレベルを完全非メチル化 ~ 完全メチル化の間で 4 段階で判定した。

#### (3) AhR が結合した XRE 配列におけるメチル化状態の解析

NF を処理した HepG2 および HuH7 細胞を対象に、抗 AhR 抗体を用いて cleavage under target & release using nuclease (CUT&RUN) 法によるクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。AhR と結合した DNA を回収し、sodium bisulfite 処理後に *CYP1B1* 遺伝子 XRE2/3 領域の増幅を行い、(2)と同様に DNA メチル化状態を解析した。

この XRE2/3 領域の増幅産物については別途、大腸菌を用いてサブクローニングを行い、コピー毎の DNA メチル化状態を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性に及ぼす DNA 脱メチル化の影響

NF 単独処理では両細胞において *CYP1B1* 遺伝子発現量の増加傾向が認められた(図 2A, 2B)。DAC との併用により遺伝子発現量の更なる増加が認められたのは HepG2 細胞のみであった。DAC 単独処理では *CYP1B1* 遺伝子発現の増強が検出されないこと、いずれの処理でも *AHR* や *ARNT* の遺伝子発現量に顕著な変化が認められない (data not shown) ことから、この増強は AhR 経路上で起こる脱メチル化が寄与することが推測された。

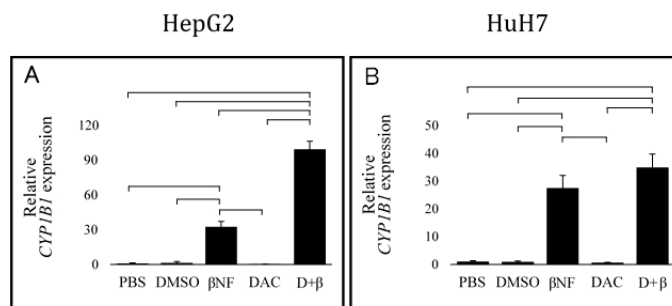


図 2. *CYP1B1* 遺伝子発現量の変化

##### (2) DNA メチル化により *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の応答性が制御される XRE 配列の探索

HepG2 および HuH7 細胞における *CYP1B1* 遺伝子上流 8 箇所の XRE 配列のメチル化状態の結果を図 3 に示す。薬物未処理下の両細胞間でメチル化状態の違いが検出されたのは XRE1、XRE2、および XRE3 であった。これらのメチル化状態の差異が、DAC と NF の併用時の *CYP1B1* 遺伝子発現誘導の強弱に寄与する可能性が推測された。

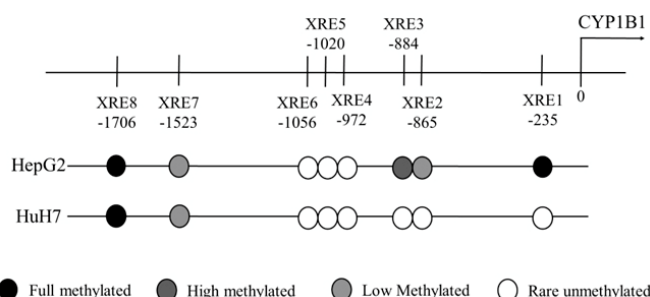


図 3. *CYP1B1* 遺伝子 8 箇所の XRE 配列の DNA メチル化状態

##### (3) AhR が結合した XRE 配列におけるメチル化状態の解析

抗 AhR 抗体を用いた ChIP では、両細胞において AhR と結合する XRE2/XRE3 領域の DNA が回収された。ただし、XRE2 と XRE3 は近接して配置するため(図 5A) どちら(あるいは両方)の XRE が結合に寄与したのかは判別できなかった。これらの AhR-XRE2/XRE3 複合体 (IP(+)) および免疫沈降前の全 DNA (IP(-)) を対象に、XRE2/XRE3 配列のメチル化状態を制限酵素による切断の有無で調べ比較した。その結果、HepG2 細胞では沈降前の IP(-) の XRE2/XRE3 では部分メチル化(バンド U および M)が検出されたのに対し、沈降後の AhR と結合した XRE2/XRE3 ではメチル化は検出されなかった(バンド U のみ)(図 4A、NF)。これより、NF で活性化された AhR は非メチル化状態の XRE2/XRE3 に選択的に結合することが示唆された。

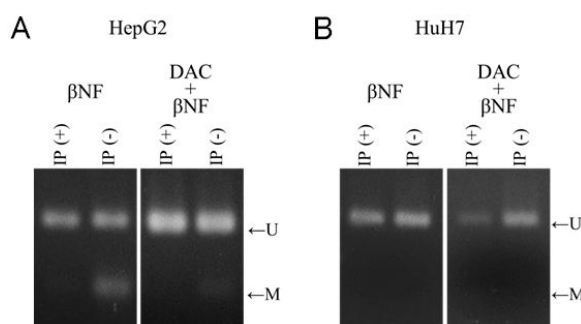


図 4. 制限酵素切断による *CYP1B1* XRE2/XRE3 配列のメチル化状態の解析

次に、上記の沈降後 (IP(+)) と沈降前 (IP(-)) の XRE2/XRE3 領域の DNA を対象に大腸菌でサ

ブクローニングを行い、コピー毎に塩基配列を決定した（図 5B、5C）。その結果、HepG2 細胞では沈降後の AhR と結合した XRE2 および XRE3 においてはメチル化が検出されず、図 4 の結果と一致した

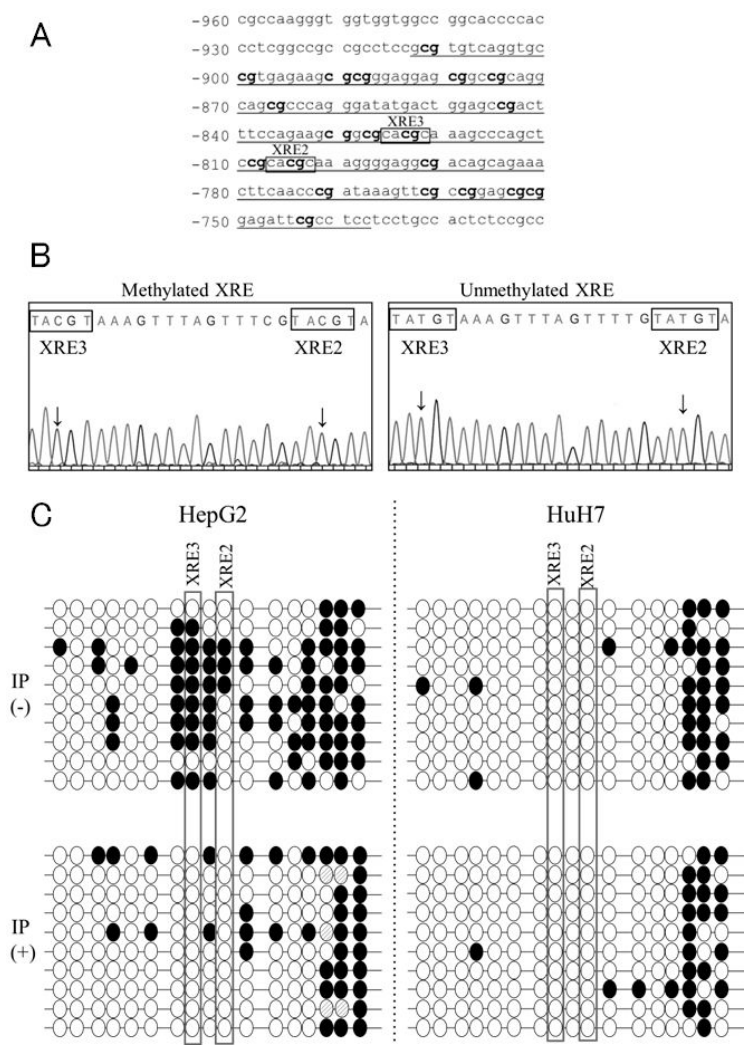


図 5. コピー毎の CYP1B1 XRE2/XRE3 配列のメチル化状態の解析

NF 曝露による *CYP1B1* 遺伝子発現の誘導が DNA 脱メチル化により増強されたのは HepG2 細胞のみであった。AhR が非メチル化状態の XRE と選択的に結合することが証明されたことにより、この発現誘導の増強は、*CYP1B1* 遺伝子 XRE2/XRE3 配列の脱メチル化による AhR への結合の促進が原因であった可能性が強く示唆された。

クロマチン免疫沈降と DNA メチル化解析を組み合わせた手法は、人工的なコンストラクトを解析するレポーターアッセイやゲルシフトアッセイとは異なり、自然なクロマチンの条件下で AhR と結合する XRE のメチル化状態を評価できる。本研究成果は AhR のような「エピゲノムセンサー」の評価法として今後の応用が期待される。

本研究成果は以下の論文にまとめ発表した。

Miura T, Onodera R, Terashima J, Ozawa S, Habano W. -naphthoflavone-induced upregulation of CYP1B1 expression is mediated by the preferential binding of aryl hydrocarbon receptor to unmethylated xenobiotic responsive elements. *Exp Ther Med*. 2021 Dec;22(6):1410. doi: 10.3892/etm.2021.10846.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Jimma Yoko, Jimma Keiko, Yachi Maako, Hakata Shuko, Habano Wataru, Ozawa Shogo, Terashima Jun	4. 巻 37
2. 論文標題 Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Cell Proliferation Enhanced by Benzo[a]pyrene in Human Lung Cancer 3D Spheroids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 367 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07357907.2019.1655760	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 -
1. 著者名 Sugai Tamotsu, Uesugi Noriyuki, Habano Wataru, Sugimoto Ryo, Eizuka Makoto, Fujita Yasuko, Osakabe Mitsumasa, Toya Yosuke, Suzuki Hiromu, Matsumoto Takayuki	4. 巻 477
2. 論文標題 The clinicopathological and molecular features of sporadic gastric foveolar type neoplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 835 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02846-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugimoto Ryo, Habano Wataru, Yanagawa Naoki, Akasaka Risaburo, Toya Yosuke, Sasaki Akira, Matsumoto Takayuki, Sugai Tamotsu	4. 巻 24
2. 論文標題 Molecular alterations in gastric cancer and the surrounding intestinal metaplastic mucosa: an analysis of isolated glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 382 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-020-01130-z	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 -
1. 著者名 Ozawa Shogo, Miura Toshitaka, Terashima Jun, Habano Wataru, Ishida Seiichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Recent Progress in Prediction Systems for Drug-induced Liver Injury Using In vitro Cell Culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism Letters	6. 最初と最後の頁 25 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1872312814666201202112610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa Shogo, Miura Toshitaka, Terashima Jun, Habano Wataru	4. 巻 4
2. 論文標題 Cellular irinotecan resistance in colorectal cancer and overcoming irinotecan refractoriness through various combination trials including DNA methyltransferase inhibitors: a review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 946-964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20517/cdr.2021.82	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugai Tamotsu, Osakabe Mitsumasa, Habano Wataru, Tanaka Yoshihito, Eizuka Makoto, Sugimoto Ryo, Yanagawa Naoki, Matsumoto Takayuki, Suzuki Hiromu	4. 巻 71
2. 論文標題 A genome wide analysis of the molecular alterations occurring in the adenomatous and carcinomatous components of the same tumor based on the adenoma?carcinoma sequence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 582 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Toshitaka, Onodera Ryo, Terashima Jun, Ozawa Shogo, Habano Wataru	4. 巻 22
2. 論文標題 -naphthoflavone-induced upregulation of CYP1B1 expression is mediated by the preferential binding of aryl hydrocarbon receptor to unmethylated xenobiotic responsive elements	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2021.10846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Habano Wataru, Miura Toshitaka, Terashima Jun, Ozawa Shogo	4. 巻 470
2. 論文標題 Aryl hydrocarbon receptor as a DNA methylation reader in the stress response pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 153154 ~ 153154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2022.153154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------