

令和元年6月27日現在

機関番号：82686

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19631

研究課題名(和文)環境因子に応じたエピジェネティクスによる炎症制御機構の意義

研究課題名(英文)Epigenetic regulation of inflammatory response by environmental stress.

研究代表者

蜂屋 瑠見 (HACHIYA, Rumi)

東京都立小児総合医療センター(臨床研究部)・なし・医員

研究者番号：50365318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マクロファージ(M<sub>1</sub>)においてリポ多糖による急性炎症を抑制する因子として、H3K9メチル化酵素Setdb1を同定した。本研究の目的は、肥満の慢性炎症で重要な環境因子に応じてSetdb1が果たす役割をin vitroの系で検討することである。Setdb1ノックダウンM<sub>1</sub>細胞株を用いたin vitro系で様々な刺激を検討し、飽和脂肪酸による炎症においてM<sub>1</sub>のSetdb1が炎症抑制因子として機能していることを明らかにした。炎症抑制の機序を明らかにするため、マイクロアレイ解析を行い、in silicoにて飽和脂肪酸刺激に反応する遺伝子群のうち、Setdb1によって制御される分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、Setdb1という我々自身が独自に同定した分子を解析の手掛かりとすることにより、いまだに知見の少ないマクロファージの炎症におけるエピジェネティック制御機構の一端にアプローチできた。また、社会的には、メタボリックシンドロームの治療法として、肥満脂肪組織の炎症を主たる標的とするものは未だ開発されていないが、炎症性サイトカイン発現を抑制するエピジェネティック分子であるSetdb1は、治療標的としての可能性が期待でき、本研究の成果はその基礎的知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that SET domain, bifurcated 1 (Setdb1) in macrophages potently suppresses Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated expression of proinflammatory cytokines which is stimulated by lipopolysaccharide. In this study our aim was to clarify the role of Setdb1 in inflammation by environmental stress which is related to obese adipose tissue inflammation. We made Setdb1 knock-down macrophage cell line and demonstrated that Setdb1 suppresses inflammation by saturated fatty acid. Moreover, we identified the factor which is regulated by Setdb1 by in silico analysis.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：マクロファージ エピジェネティクス サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの基盤病態として、肥満脂肪組織における慢性炎症が想定されているが、慢性炎症を主たる標的とする治療法は未だ開発されていない。一方、エピジェネティクスは、環境と遺伝の相互作用による病態に寄与するが、エピジェネティクスによる炎症転写制御機構に関する知見は少なく、我々は新たな視点として、肥満脂肪組織炎症において重要なマクロファージのエピジェネティクス因子による炎症転写制御に注目した。

まず、炎症転写制御において最も知見の多い実験系である、リポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) 刺激で Toll 様受容体 4 (TLR4) を介する急性炎症の系で検討を行った。マクロファージの炎症転写制御において重要なエピジェネティクス因子をスクリーニングし、H3K9 メチル化酵素 Setdb1 を同定した。マクロファージ特異的 Setdb1 ノックアウトマウスを用いて、マクロファージの Setdb1 が *in vitro/in vivo* 両面で炎症を抑制すること、および、H3K9 メチル化酵素活性を介した炎症抑制の機序を明らかにした (Hachiya R et al. Sci. Rep. 2016)。

上記の急性炎症の系における研究成果から、マクロファージの Setdb1 が環境因子に応じて炎症応答を適切な範囲に制御している可能性が示唆され、肥満脂肪組織における慢性炎症にも Setdb1 が関与しうると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、肥満脂肪組織における慢性炎症の病態解明につながる基礎的知見を得るために、肥満において重要な環境因子刺激に応じて、マクロファージの Setdb1 が炎症制御機構の中で果たす役割を、*in vitro* の系で検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Setdb1 ノックダウンマクロファージ作成

野生型および Setdb1 をノックダウンしたマクロファージを作成し、LPS による刺激を行い、これまで明らかにした Setdb1 の炎症抑制作用を確認できる実験系であることを確認した。

### (2) 肥満において重要な環境因子刺激による炎症での Setdb1 の役割の検討

(1)で作成した解析系に対して、肥満に関係する環境因子刺激を行い、刺激下での炎症制御における Setdb1 の意義についての検討を行った。

### (3) 飽和脂肪酸刺激による炎症において、Setdb1 によって制御される分子の同定

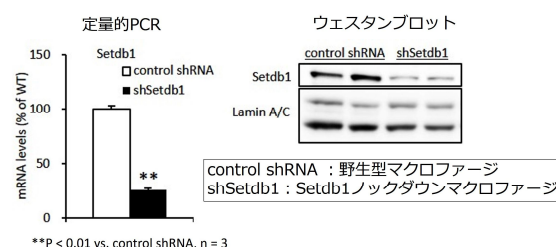
(2)の結果から、とくに Setdb1 が飽和脂肪酸による炎症を抑制することに着目した。Setdb1 が飽和脂肪酸による炎症を抑制する機序の詳細を明らかにするため、マイクロアレイ解析を行い、*in silico* にて飽和脂肪酸刺激に反応する遺伝子群についての解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Setdb1 ノックダウンマクロファージ作成

作成した細胞のノックダウン効率は、野生型に比し、Setdb1 ノックダウンでは、Setdb1 遺伝子発現が 26%、すなわち 74%

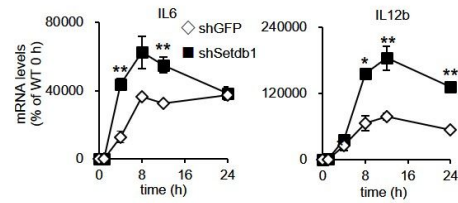
【図1】野生型およびSetdb1マクロファージ細胞株(J774.1)のノックダウン効率



のノックダウン効率であった(図1)。

また、この細胞が、これまでに明らかにした Setdb1 の炎症抑制作用を確認できる実験系であることを LPS 刺激で確認した。すなわち、定量的 PCR により、Setdb1 ノックダウンによって、IL6、IL12b などの LPS による炎症性サイトカイン発現誘導が増強されることを確認した(図2)。

【図2】 LPS刺激による炎症性サイトカイン発現



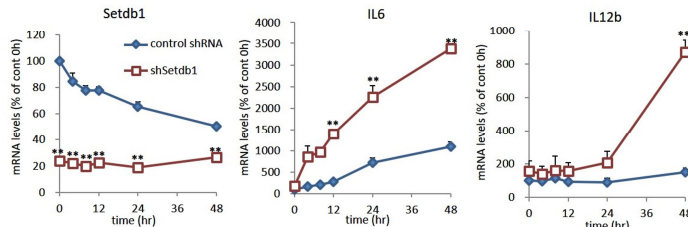
(2) 肥満において重要な環境因子刺激による炎症での Setdb1 の役割の検討

まず、低グルコースおよび高グルコース濃度下での炎症制御における Setdb1 の意義についての検討を行った。これは、肥満糖尿病モデルマウスの血管平滑筋細胞において、Suv39h1( Setdb1 とは別のヒストン H3K9 メチル化酵素)の発現が低下し、*in vitro* で培養後も炎症性サイトカインの発現が持続するという既報(Proc. Natl Acad. Sci. USA. 105:9047-9052, 2008)を参考にして解析したものである。野生型マクロファージでは高グルコースによって主要な炎症性サイトカインである IL6 の発現が上昇するが、Setdb1 欠損マクロファージでは高グルコースによる IL6 上昇が認められなかった。

次に、LPS と同様に TLR4 を介して作用し、肥満脂肪組織において慢性炎症を惹起する飽和脂肪酸に注目した。野生型マクロファージでは飽和脂肪酸であるパルミチン酸刺激により、Setdb1 の発現が経時的に減少し、それに伴って IL6、IL12b の発現が経時的に上昇した。一方、Setdb1 をノックダウンしたマクロファージでは IL6、IL12b の発現上昇がより顕著に認められた(図3)。培養上清の ELISA においても、Setdb1 KD でパルミチン酸添加時の IL6 分泌量が野生型に比し有意に上昇していた(図4)。以上から、飽和脂肪酸による脂肪組織の慢性炎症制御においても Setdb1 が炎症抑制因子として機能している可能性が示唆された。

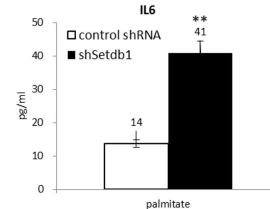
【図3】 パルミチン酸刺激による炎症性サイトカイン発現

パルミチン酸 200 μM 刺激 (\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.01 vs. control shRNA, n = 3)



【図4】 パルミチン酸刺激による炎症性サイトカイン分泌

パルミチン酸 200 μM 刺激 (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control shRNA, n = 3)



(3) 飽和脂肪酸刺激による炎症において、Setdb1 によって制御される分子の同定

より表現型が明瞭であった飽和脂肪酸による炎症について、Setdb1 が炎症を抑制する機序の詳細を明らかにするため、マイクロアレイ解析を行い、*in silico* にて飽和脂肪酸刺激に反応する遺伝子群のうち、Setdb1 によって制御される分子を同定した。今後、同定した分子の生物学的意義を *in vitro* に戻して解析していきたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. R. Hachiya ,T. Shiihashi , I. Shirakawa , Y. Iwasaki , Y. Matsumura , Y. Oishi , Y. Nakayama , Y. Miyamoto , I. Manabe , K. Ochi , M. Tanaka , N. Goda , J. Sakai , Y. Ogawa. The H3K9 methyltransferase Setdb1 regulates TLR4-mediated inflammatory responses in macrophages. **Scientific Reports** (査読有) 6:28845, 2016

〔学会発表〕(計3件)

1. 蜂屋瑠見、白川伊吹、菅波孝祥、長谷川行洋、小川佳宏:「飽和脂肪酸による炎症におけるマクロファージ H3K9 メチル化酵素 Setdb1 の意義」:第 92 回日本内分泌学会学術集会、2019
2. 蜂屋瑠見、白川伊吹、菅波孝祥、長谷川行洋、小川佳宏:「飽和脂肪酸による炎症におけるマクロファージ H3K9 メチル化酵素 Setdb1 の意義」:第 52 回日本小児内分泌学会学術集会、2018
3. 蜂屋瑠見、白川伊吹、菅波孝祥、小川佳宏:「マクロファージの新規炎症抑制因子ヒストンメチル化酵素 Setdb1」: 第 37 回日本肥満学会、2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

<和文総説>

1. 蜂屋瑠見, 田中都, 菅波孝祥, 小川佳宏. 【食と炎症・免疫】飢餓環境. 炎症と免疫(査読無) 25(1):47, 2017
2. 蜂屋瑠見, 菅波孝祥, 小川佳宏. 慢性炎症性疾患の新たな展開. 【慢性炎症の病的意義】代謝ストレスと慢性炎症. 最新医学(査読無) 71 (11)suppl:2277, 2016

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 小川 佳宏

ローマ字氏名: OGAWA, Yoshihiro

研究協力者氏名: 菅波 孝祥

ローマ字氏名: SUGANAMI, Takayoshi

研究協力者氏名: 白川 伊吹

ローマ字氏名: SHIRAKAWA, Ibuki

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。