

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09310

研究課題名（和文）血管内皮細胞からARDSの病態を解明する-ヒストン修飾酵素SETDB2の意義-

研究課題名（英文）Investigation of ARDS molecular mechanism through vascular endothelial cells - Histon methyltransferase protein SETDB2 -

研究代表者

園部 奨太（SONOBE, SHOTA）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90771808

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）：ARDSは致死的な経過をたどる重症疾患であり、現代においてもなお、その分子メカニズムは未解明である。我々はARDS重症化メカニズムに血管内皮細胞が関わっており、その血管内皮細胞でヒストンメチル化蛋白SETDB2が発現していることに着目した。血管内皮細胞特異的にSETDB2が発現しないマウスではARDSが重症化することを明らかとし、そのメカニズムとして、SETDB2がARDS肺における血管内皮細胞のアポトーシスに関与していることを解明した。またARDS患者の血清においてもSETDB2が発現していること、そしてSETDB2の上昇度とARDSの重症度が相関していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARDSはCOVID-19を経て、広く周知された。その重症度は患者ごとにさまざまであり、重症化するメカニズムは未だにわかっていない。この研究は、ARDSの重症化にエピジェネティクス（遺伝情報の伝達メカニズム。遺伝子配列は変えずに、遺伝情報を変化させること。）が関わっていることに着目した点で新規性の高い研究である。エピジェネティクスという概念が炎症疾患に関わっていることを明らかとした点は学術的に意義があると考えられる。またARDS重症化メカニズムのひとつとして、ヒストンメチル化蛋白SETDB2が関わっていることを通じて社会のARDSへの認知がさらに進むと予想され、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：ARDS is a severe disease that can lead to death, and its molecular mechanisms remain unclear even now. We focused on the involvement of vascular endothelial cells in the mechanism of ARDS aggravation, and the expression of the histone methyltransferase SETDB2 in vascular endothelial cells. We demonstrated that the severity of ARDS increases in mice lacking SETDB2 specifically in vascular endothelial cells, and elucidated the mechanism by which this occurs: SETDB2 is involved in the apoptosis of vascular endothelial cells in ARDS lungs. We also confirmed that SETDB2 was elevated in the ARDS patients serum, and found that the degree of SETDB2 elevation correlated with the severity of ARDS.

研究分野：敗血症

キーワード：ARDS SETDB2 ヒストンメチル化

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促進症候群 (**ARDS**) は予後不良な症候群であり、その分子メカニズムはいまだ不明である。本報告者は、臨床の現場に身を置きながら **ARDS** の重症化メカニズムに常に関心を抱いてきた。また近年、急性炎症性疾患に関わるメカニズムとして、遺伝子配列には直接関与しない遺伝システム (エピジェネティクス) が注目されている。(Kimball As, et al. *Immunity* 2019;51:258-271.) 報告者は **ARDS** とエピジェネティクスの関係を、ヒストン修飾酵素である **SETDB2** を通じて明らかとすべく **2017-2019** 年度の若手研究助成を受け、**ARDS** マウスモデルにおいて、転写抑制に働く **SETDB2** がマクロファージと血管内皮細胞に発現上昇すること、そしてマクロファージに発現する **SETDB2** が炎症性サイトカインの過剰産生を抑制し、**ARDS** の病態悪化を抑制していることに着目した。続いて **2020-2023** 年度の基盤研究(C)を受け、血管内皮細胞における **SETDB2** の **ARDS** における役割・機能を明らかとすることを目的とし研究を開始した。

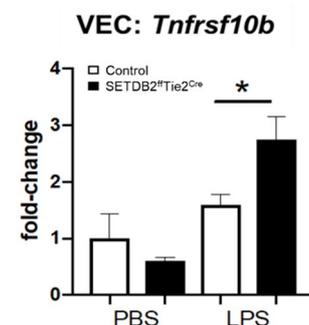


図1 LPS投与後のTnfrsf10bの発現
* VEC : Vascular Endothelial Cell

2. 研究の目的

本研究では、**ARDS** 重症化メカニズムにおけるヒストンメチル化酵素 **SETDB2** の意義を「血管内皮細胞から病態を解明する」ことを目的とした。具体的には、ヒストンメチル化酵素 **SETDB2** を血管内皮細胞特異的に欠損させたマウス (**Setdb2^{Tie2}Cre** マウス) の肺実質を用いて炎症性サイトカイン・ケモカインの発現変化を明らかとし、肺胞洗浄液における免疫担当細胞 (主には好中球・マクロファージ) の量的差異の確認、**ARDS** 肺での肺胞内蛋白濃度の違い、肺炎像の進展の違い、をコントロールマウスと **Setdb2^{Tie2}Cre** マウスで比較検討することで、**SETDB2** の血管内皮細胞への寄与度を解明することを目的とした。

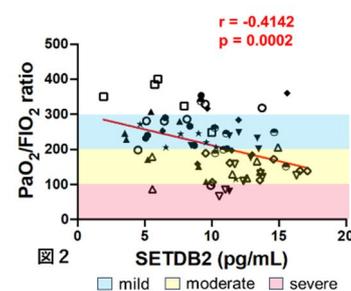


図2

奈良県立医科大学医の倫理審査委員会：研究番号2052

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

Cre-loxP システムを用いて血管内皮細胞特異的に **Setdb2** を欠損させたマウス (**Setdb2^{Tie2}Cre** マウス) の気管内にグラム陰性桿菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (**LPS**) を投与することで **ARDS** を発症させた。比較対象のコントロールマウスとして **C57BL/6** および **Cre** 発現のない **Setdb2^{fl/fl}** マウスを用いた。また **ARDS** の重症度評価は、早期 **ARDS** (発症6時間) と晚期 **ARDS** (発症72時間) で評価項目を設定した。

(2) 試薬など

麻酔はペントバルビタールを腹腔内投与することにより行った。**LPS** は大腸菌 **O55:B5** 由来の **LPS** (**Sigma-Aldrich** 社製 **Lot No.057 M4013**) を用いて、気管内に **2.5mg/kg** 投与した。

(3) 定量的PCR

各マウスから摘出した肺をホモジナイズし、**Nucleospin RNA kit**(**Takara** 社製)を用いて **RNA** を抽出した。逆転写酵素 **Superscript** (**Invitrogen** 社製)を用いて、相補的 **DNA** を作製した。遺伝子発現は **Taqman probe** (**Thermo Fisher Scientific** 社)を用い、**Real-time PCR**(**StepOnePlus**, **Thermo Fisher Scientific** 社)により測定した。

(4) 肺胞洗浄液の解析

麻酔後安楽死させたマウスに対して **PBS** を用いて気管支肺胞洗浄 (**BAL**) を行った。回収した肺胞洗浄液 (**BALF**) を遠心し、血球成分と液性成分に分離した。血球成分比率はギムザ染色後、顕微鏡下で各細胞集団の細胞数を測定し、計測した。

(5) 組織学的解析

摘出した組織 (肺) をホルマリン固定し、**HE** (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を行った。またパラフィン切片を用いて、定法に従って免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1)各種炎症性サイトカイン・ケモカインに関する検討:

本研究では **LPS** の気管内投与により、肺実質において各種炎症性サイトカインやケモカインの発現が野生型マウスと **Setdb2^{fl} Tie2^{Cre}** マウスで有意差が認められるかを検討した。時間的経過からは、早期 **ARDS** では炎症性サイトカイン **IL-6**, **TNF** の発現が **Setdb2** 欠損マウスで上昇する傾向があったが有意差は認められなかった。晩期においてその傾向も認められなくなった。このことから、**ARDS** 増悪に **Setdb2** がサイトカインを経由して関与していることは否定的であることが示唆された。

(2)ARDS モデルマウスにおける肺胞内アルブミン濃度の検討:

ARDS では肺胞内へ血漿成分が漏出し肺水腫となる。**ARDS** 悪化に **SETDB2** が寄与しているとすれば、この肺胞内の血漿成分、主にはアルブミン濃度が変化するのではないかと着想し、**ARDS** マウスにおける **BALF** 内のアルブミン濃度を測定した。その結果、コントロールマウスと比較して **Setdb2^{fl} Tie2^{Cre}** マウスでは高濃度のアルブミン濃度が検出された。これは **Setdb2^{fl} Tie2^{Cre}** マウスでの **ARDS** 肺ではその肺胞内により多くの血漿成分が漏出したことを示唆しており、**ARDS** 重症化が示唆された。

(3)ARDS モデルマウスにおける肺実質の組織変化の検討:

LPS 刺激により、気管支および肺実質に炎症が惹起されていた。気管支壁の炎症状態、血管内皮の炎症状態、肺実質への炎症性細胞浸潤で分けて炎症状態を定量化 (**Histology score**) し評価した。その結果、コントロールマウスと比較し、**Setdb2^{fl} Tie2^{Cre}** マウスでは **Histology score** が増加していた。(2)の肺胞内アルブミン濃度の上昇も併せて考えると、組織への炎症が悪化した原因のひとつとして血管内皮細胞において **SETDB2** が関与していることが考えられた。

(4)血管内皮細胞の細胞死と SETDB2:

肺胞内へのアルブミン漏出がコントロールマウスと比較して **Setdb2^{fl} Tie2^{Cre}** マウスで顕著に増加したメカニズムについて検討したところ、**Setdb2** を選択的にノックダウンしたマウスでは血管内皮細胞のアポトーシスが増加していた。このことから **Setdb2** がアポトーシスに関与していると考え、関連遺伝子を探索したところ3つの遺伝子の発現が上昇していた。その中で、**TNFRSF10B** は **ARDS** 発症後に特に発現上昇が認められており、責任遺伝子であると判断した。(図1)

(5)ARDS 患者での SETDB2 の発現

マウスにおいて、**SETDB2** が **ARDS** 重症化メカニズムに関与していることが明らかとなったため、実際の **ARDS** 患者血清において **SETDB2** の発現を確認した。すると健常者に対して、**ARDS** 患者では大幅にその発現が上昇していることを確認した。そして血清 **SETDB2** 値と **ARDS** 重症化指標のひとつである肺酸化指標 (**PaO₂/FiO₂ ratio: P/F 比**) は負の相関になることを確認し(図2)、研究成果を国際雑誌である **Shock** に投稿し掲載となった。(Sonobe S, et al. **Shock**. 2023;60:137-145)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sonobe Shota, Kitabatake Masahiro, Hara Atsushi, Konda Makiko, Ouji-Sageshima Noriko, Terada-Ikeda Chiyoko, Furukawa Ryutarō, Imakita Natsuko, Oda Akihisa, Takeda Maiko, Takamura Shiki, Inoue Satoki, Kunkel Steven L., Kawaguchi Masahiko, Ito Toshihiro	4. 巻 60
2. 論文標題 THE CRITICAL ROLE OF THE HISTONE MODIFICATION ENZYME SETDB2 IN THE PATHOGENESIS OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 137 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000002145	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 Kitabatake Masahiro, Ouji-Sageshima Noriko, Sonobe Shota, Furukawa Ryutarō, Konda Makiko, Hara Atsushi, Aoki Hiroyasu, Suzuki Yuki, Imakita Natsuko, Nakano Akiyo, Fujita Yukio, Shichino Shigeyuki, Nakano Ryuichi, Ueha Satoshi, Kasahara Kei, Muro Shigeo, Yano Hisakazu, Matsushima Kouji, Ito Toshihiro	4. 巻 76
2. 論文標題 Transition of Antibody Titers after SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in Japanese Healthcare Workers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 72 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2022.041	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 Konda Makiko, Kitabatake Masahiro, Ouji-Sageshima Noriko, Tonomura Rei, Furukawa Ryutarō, Sonobe Shota, Terada-Ikeda Chiyoko, Takeda Maiko, Kawaguchi Masahiko, Ito Toshihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 4 Regulates Pulmonary Vascular Hyperpermeability through Destruction of Glycocalyx in Acute Respiratory Distress Syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16230 ~ 16230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242216230	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 Fukushima Hidetada, Nishioka Yuichi, Kasahara Kei, Asai Hideki, Sonobe Shota, Imamura Tomoaki, Muro Shigeo, Nishio Kenji	4. 巻 101
2. 論文標題 Sensitivity and specificity analyses of COVID-19 screening protocol for emergency medical services: A STARD-compliant population-based retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e30902 ~ e30902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000030902	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 Oda Akihisa, Furukawa Shoko, Kitabatake Masahiro, Ouji-sageshima Noriko, Sonobe Shota, Horiuchi Kaoru, Nakajima Yuto, Ogiwara Kenichi, Goitsuka Ryo, Shima Midori, Ito Toshihiro, Nogami Keiji	4. 巻 231
2. 論文標題 The spleen is the major site for the development and expansion of inhibitor producing-cells in hemophilia A mice upon FVIII infusion developing high-titer inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 144 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2023.03.003	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shota Sonobe
2. 発表標題 Histone modification enzyme SET domain bifurcated 2 (Setdb2) contributes to the pathogenesisloss in vascular endothelial cells leads ofto exacerbation of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in murine model.
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021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	北畠 正大 (Kitabatake Masahiro) (60457588)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	
研究 分 担 者	小田 朗永 (Oda Akihisa) (80547703)	奈良県立医科大学・医学部・特任助教 (24601)	

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
---------	---------