

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591324

研究課題名(和文)膵島の炎症におけるメチル化酵素 Set7/9 の役割

研究課題名(英文)The role of methyltransferase, Set7/9 in islet inflammation

研究代表者

荻原 健 (OGIHARA, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60399772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：糖尿病発症には膵細胞機能不全が関与しており、その誘因に炎症がある。細胞腫瘍株にて解析した結果、メチル化酵素Set7/9のノックダウンに伴い、炎症性サイトカイン応答性のNOS2遺伝子発現が低下した。Nos2発現上昇には同遺伝子領域内ヒストン蛋白のメチル化上昇の関与が示唆された。Nos2がコードするiNOSが産生するNOは膵細胞死を誘導するが、サイトカイン誘導性のアポトーシス増加は、Set7/9ノックダウンに伴い抑制された。Set7/9ノックアウトマウスから単離した膵島においても、サイトカイン応答性のNos2発現が抑制された。本研究にて、Set7/9による膵島炎症の新たな調節機構を見出した。

研究成果の概要(英文)：Set7/9 is an enzyme that methylates lysine 4 on histone 3 (H3K4) to maintain euchromatin architecture. While Set7/9 contributes to the transactivation of beta cell specific genes, Set7/9 also reportedly binds NF- κ B, thus regulating inflammatory genes in non-beta cells. Given that inflammation is a component of beta cell dysfunction in diabetes, the aim of this study was to elucidate the role of Set7/9 on proinflammatory cytokine signaling in beta cells. To induce inflammation, mouse insulinoma cells were treated with a cocktail of pro-inflammatory cytokines. Cytokine treatment induced the expression of iNOS, which was attenuated by the Set7/9 knockdown. Set7/9 knockdown attenuated cytokine-induced methylation of H3K4 in the nos2 promoter. Furthermore, cytokine-induced nos2 expression was reduced in isolated islets from set7/9 knockout mice compared to wild type mice. Our findings suggest that Set7/9 contributes to islet nos2 transcription through activating histone modifications.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：Set9 NF- κ B メチル化 膵細胞 炎症

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は、糖代謝異常に伴う血糖値の上昇を特徴とする疾患であり、その発症には、血糖低下作用を担うインスリンを分泌する膵β細胞の機能不全が重要な役割を占めている。1型糖尿病は、自己免疫異常を主因とする膵島炎により膵β細胞が破壊され、インスリン分泌量が絶対的に不足する。2型糖尿病では、膵β細胞におけるインスリン抵抗性に対する代償機構の破綻に伴い、インスリン分泌量が相対的に不足することによって血糖値が上昇する。糖尿病患者のオートプシーの検討では、2型糖尿病患者の膵島量は、健常者と比較して約50%程度であることが知られている。従って、1型あるいは2型にかかわらず、膵β細胞の絶対量を増加させることが、糖尿病の治療戦略となる。

ただし、現時点では膵β細胞量の増加を主目的とした治療は、膵臓/膵島移植に限定されている。将来は、全能性を有するiPS細胞から、膵β細胞への分化誘導法が確立され、膵β細胞が供給されることが期待される。しかしながら、同じように全能性を有するES細胞の研究では、治療に有効なブドウ糖応答性インスリン分泌能を有する膵β細胞は未だ得られていない。また、奇形腫合併のリスクもあり、臨床応用までの道のりは確立されていない。すなわち、糖尿病患者自身の膵β細胞量を保護し、インスリン分泌能を可能な限り維持する方法を確立することが、臨床上也重要である。

炎症は、膵β細胞障害に至る重要なメカニズムの一つである。自己免疫性疾患である1型糖尿病に炎症が関与することは自明の理だが、近年、2型糖尿病における膵β細胞障害に炎症が積極的な役割を果たしていることが明らかとなっている。糖尿病患者に認める糖毒性、脂肪毒性、酸化ストレスおよび炎症性アディポカインの上昇は、それぞれ単独でもしくは複合的に膵β細胞に作用し、炎症を惹起する。事実、糖尿病患者の膵島には、健常者と比較してマクロファージの浸潤が増加していることが報告されている (Richardson SJ, et al.: Diabetologia 2009)。

(2) Set7/9は、メチル化活性を有するSetドメインを持つ酵素である。ヒストン3蛋白の4番目のリジン残基(H3K4)をメチル化することで、ヘテロクロマチン(Close)からユークロマチン(Open)への移行を促し、標的遺伝子の転写活性を促進する。また、Set7/9は非ヒストン蛋白(P53・TAF10・RBなど)をメチル化することが報告されており、標的蛋白の機能や安定性を制御することで多彩な作用を発揮することが明らかとなっている。そして、Set7/9は膵島に豊富に発現しており、H3K4のメチル化を通じて、インスリンやGLUT2の遺伝子発現を促進すること、Set7/9ノックダウンに伴い、単離膵島からのブドウ糖応答性インスリン分泌が障害されること

を我々は報告している。

2. 研究の目的

近年、非β細胞を用いた研究において、Set7/9が炎症を制御する転写因子NF-κBと結合し、その下流遺伝子の発現を調節するとの報告が、複数の研究機関から寄せられた。ただし、その機構は報告により以下のように異なっている。(a) Set7/9が、NF-κBの標的遺伝子に誘導され、H3K4のメチル化を介して、遺伝子発現を活性化する。(b) NF-κBの構成成分であるp62をメチル化し、NF-κB自身の転写活性を上昇させる。(c) Set7/9によるp62のメチル化が、ユビキチン化を誘導し、p62が分解されることによりNF-κB標的遺伝子の発現が逆に低下する。

これまでに、膵細胞においてSet7/9と炎症との関連性を検証した報告はない。我々は、Set7/9が膵β細胞においてNF-κBと結合し、膵島の炎症に関与するとの仮説を立て、その検証を行った。

3. 研究の方法

(1)膵β細胞腫瘍株における検討

マウス膵β細胞の腫瘍株であるβTC3細胞あるいはMIN6細胞において、RNA干渉を用いてSet7/9をノックダウンした後に、サイトカインミックス(IL-1β、TNF-α、INF-γ)で刺激し、膵島炎を再現した。前述の細胞からmRNAあるいは蛋白を抽出した。mRNA発現量を定量的RT-PCR法を用いて評価し、蛋白発現量はウエスタブロット法で評価した。

βTC3細胞を標識ラベルしたAnnexin Vを用いて染色し、サイトカイン刺激にて誘導されるアポトーシス細胞量をフローサイトメトリーで評価した。

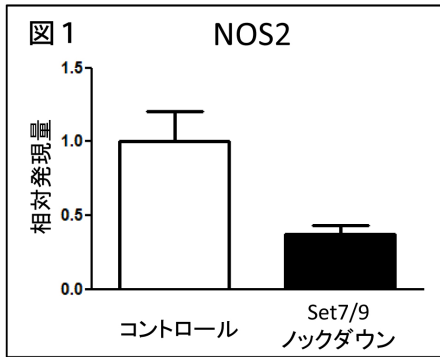
βTC3細胞を用いて、NF-κB標的遺伝子のプロモーター領域におけるH3K4のメチル化をChromatin Immunoprecipitation (ChIP)アッセイにて評価した。

(2)Set7/9ノックアウトマウスにおける検討

Set7/9ノックアウトマウスあるいはコントロールマウスから膵島を単離し、サイトカインミックス(IL-1β、TNF-α、INF-γ)で刺激した。膵島からmRNAを採取し、NF-κB標的遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法を用いて解析した。

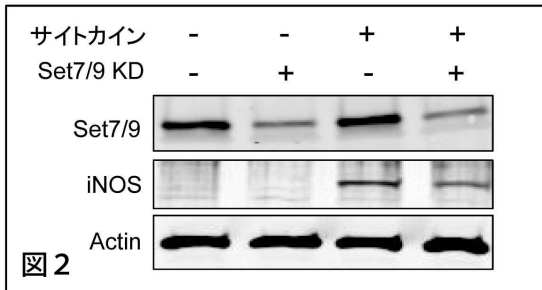
4. 研究成果

(1) βTC3細胞にサイトカイン刺激を加えた結果、既報のとおりNF-κBの下流遺伝子であるNOS2、TNF-α、SOD2の遺伝子発現が増加した。Set7/9をノックダウンした結果、非ノックダウン群と比較してサイトカイン応答性NOS2発現増加が抑制された(図1)。



ただし、TNF- α 、SOD2 に関しては Set7/9 をノックダウンしても、サイトカイン応答性の発現に変化を認めなかった。別のマウス脾 β 細胞腫瘍株である MIN6 細胞を用いて、再現性を検討した。Set7/9 ノックダウンに伴いサイトカイン応答性 NOS2 発現増加が抑制されたが、TNF- α 、SOD2 のサイトカイン応答性発現は影響を受けなかった。

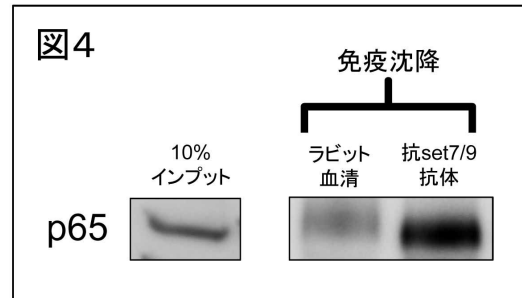
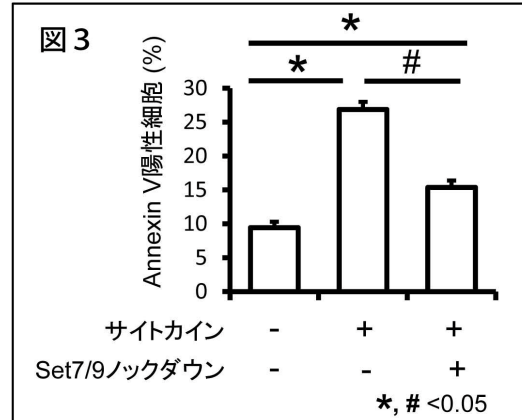
NOS2 は、NO を産生する酵素 iNOS をコードする遺伝子である。ウエスタンブロット法で蛋白発現量を解析したところ、サイトカイン刺激により iNOS が発現し、Set7/9 のノックダウンに伴いその発現が减弱した(図2)。



(2) iNOS が産生する NO は酸化ストレスである活性酸素の発生源となる。脾 β 細胞において活性酸素はミトコンドリアの機能低下、ATP 量の低下などを介して、ブドウ糖応答性インスリン分泌を抑制し、あるいはアポトーシスを誘導することが知られている。Annexin V は、アポトーシスを起こした細胞膜表面に結合する。アポトーシスを検出するため、サイトカイン刺激有無の β TC3 細胞を標識ラベルした Annexin V で染色し、フローサイトメトリーにて Annexin V 陽性細胞量を評価した。その結果、サイトカイン刺激に伴いアポトーシス細胞の割合が増加し、その応答性増加は Set7/9 ノックダウンに伴い抑制された(図3)。

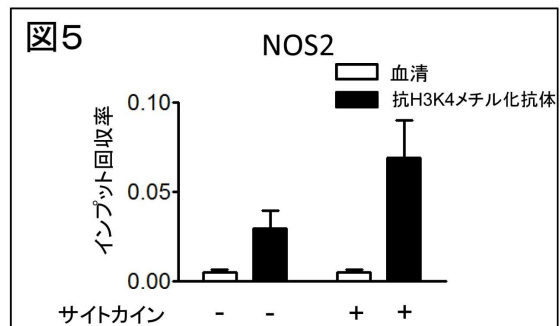
(3) 既報では、非 β 細胞において Set7/9 が p62 と複合体を形成することが報告されている。同様の検討を行うために、 β TC3 細胞から採取した蛋白を、抗 Set7/9 抗体で免疫沈降した後に、ウエスタンブロット法で解析した。その結果、p62 が抗 Set7/9 抗体にて共沈された。すなわち、脾 β 細胞においても Set7/9 は NF- κ B と複合体を形成することが示唆さ

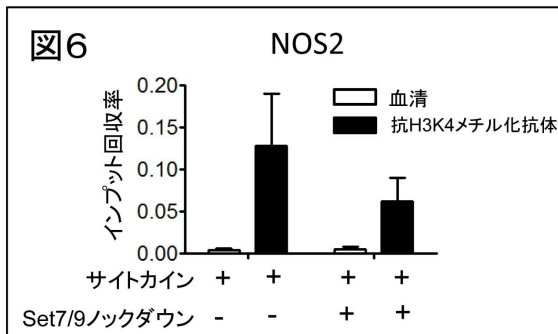
れた(図4)。



(4) Set7/9 による NOS2 遺伝子発現調節機構として、既報から(a) Set7/9 が p65 をメチル化し、NF- κ B の転写活性化能を上昇させる可能性と、(b) Set7/9 が標的遺伝子に誘導され、同領域の H3K4 メチル化を介して、ユークロマチンを促し、転写活性を上昇させる可能性が上げられる。前者の可能性を検討するために、 β TC3 細胞から回収した蛋白を抗 p65 抗体にて免疫沈降し、抗汎メチル化リジン抗体を用いて解析した。しかしながら、同手法では、p65 のメチル化は検出できなかった。ただし、免疫沈降法による検出は、感度が不十分である可能性も否定できず、脾 β 細胞における p65 のメチル化の有無の検証には、マスマスペクトル解析による更なる検証が必要であると考えられた。

続いて(b)の可能性を検討するために、抗メチル化 H3K4 抗体を用いて ChIP アッセイを施行した。その結果、NOS2 遺伝子のプロモーター領域における H3K4 のメチル化が、サイトカイン刺激に伴い増加し(図5)、次いで Set7/9 のノックダウンに伴い、そのメチル化が抑制された(図6)。





更に、TNF- α 、SOD2 のプロモーター領域についても、ChIP アッセイにて解析した。SOD2 プロモーター領域の H3K4 は、サイトカイン刺激前からメチル化されており、サイトカイン応答性の増加は示さなかった。TNF- α プロモーター領域は、サイトカイン応答性に H3K 4 メチル化が増加した。ただし、Set7/9 をノックダウンしても、TNF- α および SOD2 のプロモーター領域における H3K4 メチル化は減弱せず、前述の定量的 RT-PCR の結果に矛盾しない結果となった。

(5) NOS2 プロモーター領域の H3K4 メチル化が、Set7/9 ノックダウンに伴い低下したことから、Set7/9 が NOS2 プロモーター領域へ誘導されるとの仮説を立て、検証を行った。Flag で標識した Set7/9 を発現するプラスミドあるいはコントロールプラスミドを β TC3 細胞に遺伝子導入し、サイトカイン刺激後に細胞を採取し、抗 Flag 抗体を用いて ChIP アッセイを施行した。その結果、Set7/9 が NOS2 プロモーター領域に結合することが示された。すなわち、Set7/9 は、NOS2 遺伝子のクロマチン構造制御を介して、遺伝子発現を活性化している可能性が示唆された。

(6) 腫瘍株である β TC3 細胞の解析で得た知見を、マウスで検証するために、Set7/9 ノックアウトマウスを用いた実験を施行した。Set7/9 ノックアウトマウスあるいはコントロールマウスから膵島を単離し、サイトカインミックスの有無で遺伝子発現量を比較した。既報のとおりサイトカイン刺激無では、NOS2 の発現は検出できなかったが、サイトカイン刺激に伴い NOS2 の発現が著明に増加した。そして、コントロールマウスと比較して、Set7/9 ノックアウトマウスの膵島ではサイトカイン応答性の NOS2 発現が抑制された (図 7)。また、他の NF- κ B 標的遺伝子に関しては、Set7/9 ノックアウトに伴うサイトカイン応答性発現の減弱は認めなかった。

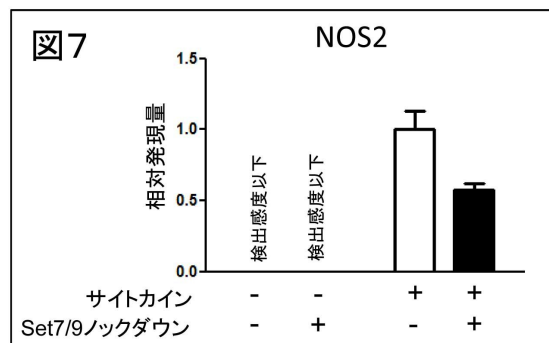
(6) 本研究の結果から、メチル化酵素 Set7/9 が NF- κ B と複合体を形成して、NOS2 遺伝子に誘導され、H3K4 メチル化を増加させることで NOS2 遺伝子発現を促すことが明らかになった。さらに、膵 β 細胞において Set7/9 の発現を抑制することで、サイトカイン誘導性のアポトーシス増加が抑制された。

NOS2 の翻訳産物である iNOS は、NO 産生を通じて膵 β 細胞の機能障害あるいは細胞死を誘導することから、Set7/9 が NO の産生促進を介して膵 β 細胞死に関与する可能性が示唆された。

膵島炎症にメチル化酵素 Set7/9 が関与することを我々の研究グループが初めて見出した。すなわち、Set7/9 を治療標的とすることで、膵島炎症を減弱し、あるいは膵 β 細胞死を回避することで膵 β 細胞量の低下を防ぎ、糖尿病の進行を抑制できる可能性がある。

ただし、本研究には、未解明な点も残されている。今回、いくつかの NF- κ B 標的遺伝子の発現を検証したが、Set7/9 ノックダウンによる影響を受けた遺伝子は NOS2 のみであった。NOS2 以外の NF- κ B 標的遺伝子の H3K4 メチル化には、他のメチル化酵素が関与することが予想される。p65 と複合体を形成する Set7/9 が、NOS2 遺伝子特異的に誘導される機構として、複合体を形成する他のコファクターの関与が推察される。また、既報では Set7/9 は、膵特異的転写因子である Pdx-1 と複合体を形成することで、Ins1 遺伝子あるいは glut2 遺伝子に誘導され、同遺伝子の遺伝子発現を促すことから、膵 β 細胞機能維持にも関与している。Set7/9 は、結合するコファクターに応じて、膵 β 細胞に対して保護的あるいは抑制的に作用する。従って、Set7/9 がコファクターと結合する機構の詳細が明らかになれば、Set7/9 の一部の機能を選択的に抑制あるいは促進でき、糖尿病治療に有効な機能のみを導き出せるかもしれない。

本研究では Set7/9 による膵島炎症を調節する新たな機構を解明した。炎症を適切に制御できれば、1 型糖尿病のみならず 2 型糖尿病の膵 β 細胞障害をも改善し得る。この研究が、新たな治療法を開発する上での一助となることが期待される。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 2 件)

藤巻杏子、荻原 健、原 朱美、藤谷与士夫、綿田裕孝：Set7/9 は iNOS 発現制御を介して膵島炎症に関与する。第 56 回日本糖

尿病学会年次学術集会 2013年5月17日 熊本

Kyoko KUDO-FUJIMAKI, Takeshi OGIHARA, Yoshio FUJITANI, Hirotaka WATADA: Set7/9 regulates cytokine-induced expression of iNOS in Beta cells through histone modification. The American Diabetes Association 73rd Scientific Sessions, 2013年6月22-24日, アメリカ シカゴ.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻原 健 (OGIHARA, Takeshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60399722