

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461345

研究課題名(和文) 膵細胞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 pancreatic beta cells

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病発症には膵細胞の機能不全が関与し、慢性炎症は細胞障害の一因とされる。既報にてメチル化酵素Set7/9と炎症を制御する転写因子NF- $\kappa$ Bとの関連が報告された。細胞腫瘍株にてSet7/9のノックダウンした結果、炎症性サイトカイン応答性のiNOS発現とアポトーシスが抑制された。Set7/9ノックアウトマウスの単離膵島でもサイトカイン応答性のNos2発現が低下した。Set7/9はNF- $\kappa$ Bと結合し、サイトカイン応答性に核内へ移行し、Nos2遺伝子のヒストン蛋白をメチル化することで遺伝子発現を亢進することが示唆された。本研究にて、Set7/9による膵島炎症の新たな調節機構が見出された。

研究成果の概要(英文)：Set7/9 is an enzyme that methylates lysine 4 of histone 3 (H3K4) to maintain euchromatin. While Set7/9 contributes to the transactivation of beta cell specific genes, Set7/9 also reportedly binds NF- $\kappa$ B to regulate inflammatory 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 in islet inflammation. To induce inflammation, mouse beta insulinoma cells were treated with a cocktail of pro-inflammatory cytokines. Cytokine treatment induced the expression of iNOS and apoptosis, which were attenuated by Set7/9 knockdown. Set7/9 made complex with NF- $\kappa$ B and was recruited on NF- $\kappa$ B binding site of Nos2 gene to methylate H3K4 in response to cytokine treatment. 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 Nos2 transcription through histone modifications in beta cells.

研究分野：糖尿病

キーワード：メチル化 Set7/9 細胞 NF- $\kappa$ B 炎症 iNOS

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は、慢性的な高血糖に伴い網膜症・腎症・神経障害などの細小血管障害、あるいは心筋梗塞・脳梗塞・閉塞性動脈硬化症などの合併症を併発する疾患である。その発症には、血糖低下作用を担うインスリンの分泌不全および作用不全が関与し、インスリンは膵ランゲルハンス島を構成するβ細胞から分泌される。1型糖尿病は、自己免疫異常に端を発する膵島炎により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疾患である。2型糖尿病では、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。すなわち、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。

膵β細胞量の増加を目論む治療法として、膵臓/膵島移植は有効な手段であるが、ドナー登録が伸び悩んでいる日本では、移植臓器の提供数とレシピエント数の隔たりが解消される目途は立っていない。将来は、全能性を有するiPS細胞から、β細胞への分化誘導法が確立され、β細胞が供給されることが期待される。ただし、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β細胞は未だ得られていない。更に、iPS細胞による細胞/組織の再生は個々の患者の病状に応じたオーダーメイド治療とも捉えられ、治療コストは高額であることが予想される。従って、糖尿病患者自身の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が確立できれば、より多くの糖尿病患者がその恩恵を享受できる可能性がある。

膵β細胞障害の過程では、酸化ストレス・小胞体ストレス・オートファジー不全などのメカニズムが想定されており、炎症も構成要素一つである。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β細胞障害に慢性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することが報告されている (Richardson SJ, et al.: Diabetologia 2009)。

(2) 遺伝子の発現調節には転写因子による制御とともに、クロマチンの構造変化も影響する。転写因子が、プロモーター領域に結合することで遺伝子発現が促されるが、クロマチン構造が閉じている場合には転写因子による標的遺伝子へのアクセスが制限される。クロマチン構造は能動的に調節され、

ヒストン蛋白のアセチル化・メチル化・ユビキチン化やDNAのメチル化が関与する。Set7/9は、メチル化活性を発揮するSetドメインを有するヒストンメチル化酵素として見出された。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、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。

我々の研究室はSet7/9が膵島に豊富に発現することを見出した。Set7/9は、膵臓特異的に発現する転写因子Pdx-1と複合体を形成し、β細胞機能に重要な遺伝子であるインスリン遺伝子やGlut2遺伝子に誘導され、H3K4のメチル化を通じて、それら遺伝子の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(Deering TG, Ogihara T, et al: Diabetes, 2009, Ogihara T, et al: Islets, 2013)。

## 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(Li Y, et al: JBC 2008)。(b) NF-κBの構成成分であるp65をメチル化し、NF-κB自身の転写活性を上昇させる(Ea CK and Baltimore D: PNAS 2009)。(c) Set7/9によるp65のメチル化が、ユビキチン化を誘導し、p65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(Yang XD, et al: EMBO 2009)。

これまでに、膵β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。β細胞における炎症の新たなメカニズムが解明できれば、β細胞量の維持を目標とした治療法開発の糸口となる可能性がある。我々は、Set7/9が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BTC3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(5 ng/ml IL-1β、10 ng/ml TNF-α、100 ng/ml INF-γ)で刺激し、膵島炎を再現した。前述の細胞からTotal RNAを回収し、定量的RT-PCR法を用いてNos2を含むサイトカイン応答性遺伝子の発現を測

定した。βTC3 細胞から総蛋白、もしくは核分画と細胞質分画を抽出し、ウェスタンブロット法を用いて蛋白発現量を評価した。

サイトカイン刺激前後のβTC3 細胞から総蛋白を抽出後、抗 Set7/9 抗体で免疫沈降し、抗 p65 抗体でウェスタンブロットを施行することで、Set7/9 と p65 との複合体形成の有無を解析した。

βTC3 細胞をサイトカインミックスで刺激後に Trypsin/EDTA を用いて回収した。FITCで標識ラベルした Annexin Vを用いて細胞を染色し、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 のモノ及びジメチル化を Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)アッセイにて評価した。FLAG-Set7/9 発現ベクターもしくは空ベクターをリポフェクション法を用いてβTC3 細胞に遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体を用いて ChIP アッセイを施行した。

#### (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脾臓・脳・肝臓を単離し、ウェスタンブロット法を用いて Set7/9 の発現量を評価した。単離脾臓をサイトカインミックスで刺激後、Total RNA 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*, *Tnfa*, *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 1A)。ただし、*Tnfa*, *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、*Tnfa*, *Sod2* のサイトカイン応答性発現は影響を受

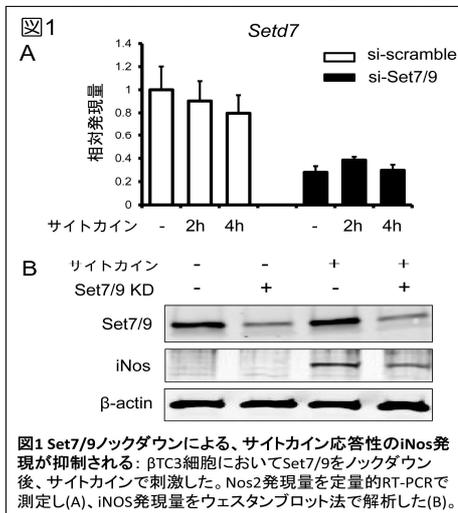


図1 Set7/9ノックダウンによる、サイトカイン応答性のiNos発現が抑制される: βTC3細胞においてSet7/9をノックダウン後、サイトカインで刺激した。Nos2発現量を定量的RT-PCRで測定し(A)、iNOS発現量をウェスタンブロット法で解析した(B)。

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。ウェ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減弱した(図 1B)。

(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。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、アポトーシスの際に細胞膜表面に析出する Phosphatidylserine に親和性を有する。アポトーシス評価のため、サイトカイン刺激有無の βTC3 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 2A)。次いで、アポトーシスの早期マーカーである cleaved Caspase 3 をウェスタンブロット法で解析した結果、サイトカイン刺激に伴い cleaved Caspase 3 蛋白量が増加し、Set7/9 ノックダウンに伴い、その増加が抑制された(図 2B)。

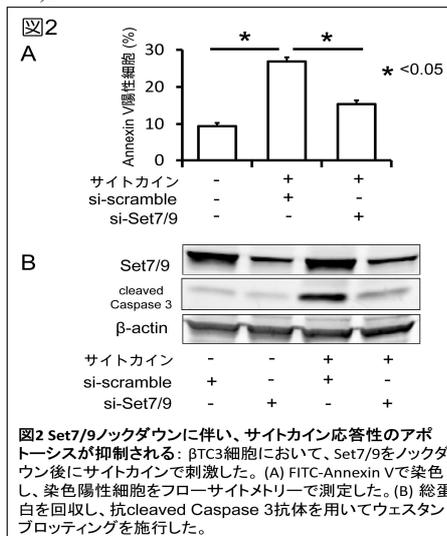


図2 Set7/9ノックダウンに伴い、サイトカイン応答性のアポトーシスが抑制される: βTC3細胞において、Set7/9をノックダウン後にサイトカインで刺激した。(A) FITC-Annexin Vで染色し、染色陽性細胞をフローサイトメトリーで測定した。(B) 総蛋白を回収し、抗cleaved Caspase 3抗体を用いてウェスタンブロット法を施行した。

(3) 既報では、非β細胞において Set7/9 が p65 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、サイトカイン刺激有無の βTC3 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、ウェスタンブロット法で解析した。その結果、p65 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-κB と複合体を形成することが示唆された(図 3)。ただし、サイトカイン刺激前後で Set7/9 と p65 の結合能に変化を認めなかった。

(4) Set7/9 は高血糖などの刺激により核内と細胞質内間で移行することが報告されている。サイトカイン刺激有無の βTC3 細胞から核分画・細胞質分画・総蛋白を抽出し、

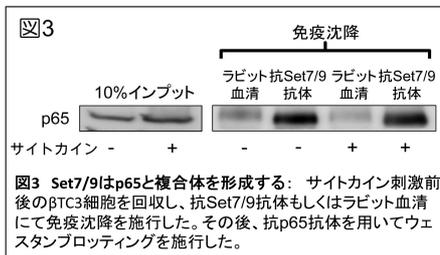


図3 Set7/9はp65と複合体を形成する: サイトカイン刺激前後のβTC3細胞を回収し、抗Set7/9抗体もしくはラビット血清にて免疫沈降を施行した。その後、抗p65抗体を用いてウェスタンブロットングを施行した。

抗 Set7/9 抗体および抗 p65 抗体を用いて解析した。p65 がサイトカイン応答性に核内へ移行するのは既報どおりであったが、Set7/9 もサイトカイン刺激に伴い核内へ移行することを確認した。

(5) 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-κB 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、βTC3 細胞から回収した蛋白を抗 p65 抗体にて免疫沈降し、抗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 4A)、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 4B)。

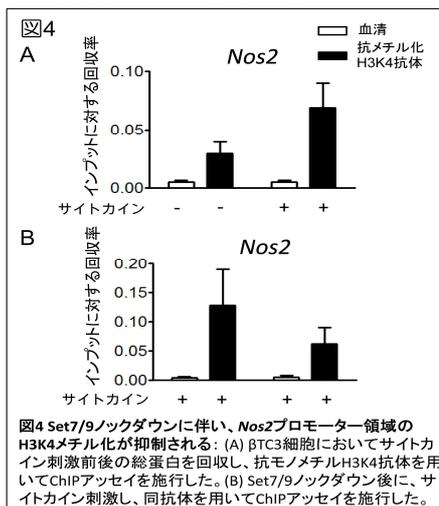


図4 Set7/9ノックダウンに伴い、*Nos2*プロモーター領域の H3K4メチル化が抑制される: (A) βTC3細胞においてサイトカイン刺激前後の総蛋白を回収し、抗メチル化H3K4抗体を用いてChIPアッセイを施行した。(B) Set7/9ノックダウン後、サイトカイン刺激し、同抗体を用いてChIPアッセイを施行した。

更に、*Tnfa*、*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。*Tnfa* プロモーター領域は、サイトカイン応答性に H3K4 メチル化が増加した。ただし、Set7/9 をノックダウンしても、*Tnfa* 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。

(6) *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 βTC3 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(図 5)。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。

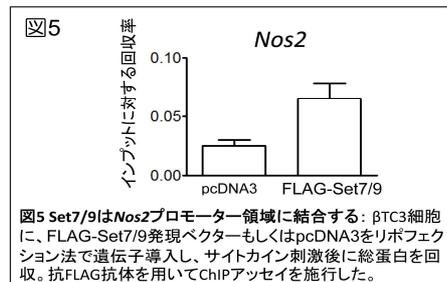


図5 Set7/9は*Nos2*プロモーター領域に結合する: βTC3細胞に、FLAG-Set7/9発現ベクターもしくはpcDNA3をリポフェクション法で遺伝子導入し、サイトカイン刺激後に総蛋白を回収。抗FLAG抗体を用いてChIPアッセイを施行した。

(7) β細胞腫瘍株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 は脳・肝臓・脾臓に発現することから各臓器を回収し、ウェスタンブロット法で解析した結果、Set7/9 ノックアウトマウスにおいて Set7/9 の発現が欠失していることを確認した。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脾臓を単離し、サイトカイン刺激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脾臓ではサイトカイン応答性の *Nos2* 発現が抑制された(図 6)。

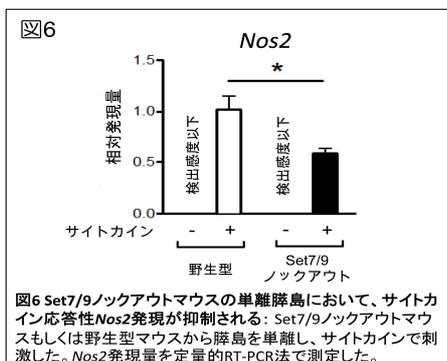


図6 Set7/9ノックアウトマウスの単離脾臓において、サイトカイン応答性*Nos2*発現が抑制される: Set7/9ノックアウトマウスもしくは野生型マウスから脾臓を単離し、サイトカインで刺激した。*Nos2*発現量を定量的RT-PCR法で測定した。

また、β細胞腫瘍株の解析と同様に *Tnfa* および *Sod2* 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。

(8) 本研究の結果から、メチル化酵素 Set7/9 は NF-κB と複合体を形成し、サイトカイン応答性に細胞質から核内へ移行した上

で *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 細胞死に關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* が關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-κB 標的遺伝子の発現を検証したが、*Set7/9* ノックダウンの影響を受けた遺伝子は *Nos2* のみであった。*Nos2* 以外の NF-κB 標的遺伝子の H3K4 メチル化には、他のメチル化酵素が關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關与が推察される。

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 *Slc2a* 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 細胞機能維持にも關与している。本研究の共同研究グループである Mirmira らは、タモキシフェン誘導性の β 細胞特異的 *Set7/9* ノックアウトマウスを作成し、耐糖能を評価している。その結果、β 細胞特異的 *Set7/9* ノックアウトマウスにおいて耐糖能障害を確認した (Maganti AV, et al: JBC 2015)。我々の研究室でも、β 細胞特異的 *Set7/9* ノックアウトマウスを作成しており、高齢・高脂肪食などの負荷により膵島内に慢性的な炎症を誘導し、β 細胞機能評価を施行予定である。

*Set7/9* の作用は、膵 β 細胞に対して二面性を有しており、例えば、*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

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fujimaki, K., Ogihara, T., Morris, D., Oda, H., Iida, H., Fujitani, Y., Mirmira, R., Evans-Molina, C., Watada, H.: SET7/9 Enzyme

Regulates Cytokine-induced Expression of Inducible Nitric-oxide Synthase through Methylation of Lysine 4 at Histone 3 in the Islet β Cell, *J Biol Chem*, 290(27): 16607-16618, 2015 査読有

〔学会発表〕(計 5 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關与する。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 73<sup>rd</sup> Scientific Sessions, 2013 年 6 月 22-24 日, アメリカ シカゴ.

飯田 雅、荻原 健、田蒔基行、藤谷与士夫、綿田裕孝: 膵 β 細胞におけるセロトニン合成律速酵素 Tph1 のプロラクチン応答性発現機構の解明。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 2014 年 5 月 23 日 大阪

Iida H, Ogihara T, Fujitani Y, Watada H: JAK2/STAT5 pathway regulates the expression of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) during pregnancy in Mouse Islets. American Diabetes Association 74<sup>th</sup> Scientific Sessions, 2014 年 6 月 13-17 日, アメリカ, サンフランシスコ

荻原 健、藤巻杏子、綿田裕: Bilateral property of methyltransferase *Set7/9* in β cell function. 第 59 回日本糖尿病学会学術集会 2016 年 5 月 20 日 京都

## 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