

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17065

研究課題名(和文)急性呼吸促迫症候群におけるヒストンメチル化酵素Setdb2の役割と臨床的意義

研究課題名(英文)The role and clinical significance of histone methylation enzyme Setdb2 in ARDS

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝情報調節のしくみとして、エピジェネティクス(Epig)が指摘されて久しい。すでにがんや精神疾患、糖尿病といった分野ではさまざまな研究が行われている。我々は、急性炎症においても、このEpigが関与していることを確認しており、本研究においては急性呼吸促迫症候群(ARDS)を対象に研究を行った。Epig関連蛋白としてヒストンメチル化蛋白Setdb2をマクロファージ特異的に欠損したマウス(Cre)と野生型のマウスを用いて、ARDSの症状や、炎症によって発現する蛋白の量などを測定・解析した。その結果、Creで症状の悪化が認められた。Setdb2がARDSの悪化と関連していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARDSは現在のCovid-19感染で多くの国民が知ることとなった疾患である。申請者はSetdb2がARDSの病態悪化と関連する因子であることを示した。Setdb2の発現を測定することにより、ARDSの悪化を予想できる可能性がある。実際に血清中のSetdb2は測定が可能であることから、検査データとして汎用性が期待できる。また、Setdb2が炎症抑制に寄与するとする結果が得られた。将来的にSetdb2の発現制御を可能とする薬剤を開発し、急性炎症の悪化の予防・治療へと発展させていきたい。

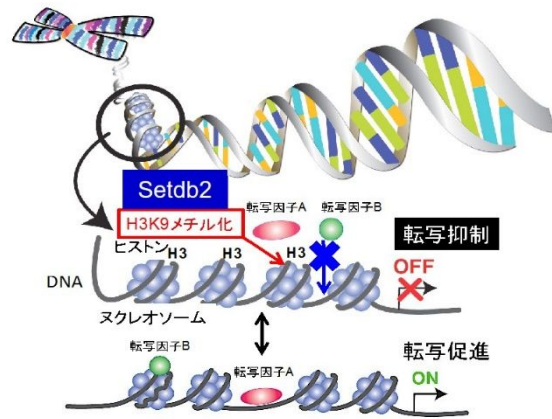
研究成果の概要(英文)：It has been a long time since epigenetics related to the mechanism of gene regulation have been pointed out. Various studies have already been conducted in the fields of cancer, mental illness, and diabetes. We have confirmed that epigenetics is also involved in acute inflammation, and in this study, we investigated acute respiratory distress syndrome (ARDS). We measured and analyzed ARDS symptoms and the amount of inflammatory proteins at mice (Cre) compared with wild-type mice. In mouse (Cre) macrophages, the histone methylated protein Setdb2 is specifically deleted. As a result, the exacerbation of the symptoms was observed in Cre. Setdb2 is thought to be associated with exacerbation of ARDS.

研究分野：集中治療

キーワード：エピジェネティクス Setdb2 ARDS

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促拍症候群(ARDS)は予後不良の疾患であるが、その分子メカニズムは不明なままである。ARDSを発症された患者さんの中で、重症化する場合と緩解・治癒される場合が混在する。そのような医療現場で働きながら、一体何が原因・因子なのか疑問を抱いていた。さまざまな臨床研究によりARDSの重症化に関わるリスクファクターは明らかになりつつあるもの(Ferguson ND, Intensive Care Med 2012;38:1573-82) それらでは説明できないケースも多く経験する。近年、ヒストンの化学修飾は、転写制御やその維持、DNA修復などに深く関わっており、あらゆる生命現象の調節に関わりうる分子機構として、その役割を明らかとすることの重要性が指摘されている。我々は、ARDSの重症化メカニズムの中心的役割を果たすと考えられているサイトカインストームの免疫調節機構においても、ヒストンの化学修飾によるエピジェネティクスが関与しているのではと想起した。予備実験として、LPSを気管内投与することにより作製されたARDSモデルマウスで炎症機構を制御するエピジェネティクス関連因子を網羅的に解析した結果、ヒストン H3K9(9番目のリジン)のメチル化酵素の一つである SET domain, bifurcated 2 (Setdb2) が有意に上昇することを見出した。ARDS発症時のサイトカインストームにおいて、中心的な役割を果たすマクロファージのゲノムが Setdb2 によるヒストン修飾を受けて、生体防御に必要なサイトカインやクリアランスに関わる因子の転写活性を抑制し、ARDSの重症化に繋がっているのではないかと想定され、本研究の着想に至った。



2. 研究の目的

本研究では、「ARDSにおけるヒストンメチル化蛋白の役割」に着目し、エピジェネティクスに関わるヒストンメチル化蛋白 Setdb2 が ARDS の重症化を制御するという新たな視点により、ARDS の重症化メカニズムの解明に取り組む。具体的には、肺実質における炎症性サイトカイン・ケモカインの発現変化の解明、肺胞洗浄液(BALF)における好中球とマクロファージの比率変化の解明、組織比較・生理学的変化の比較により、マクロファージ特異的に Setdb2 を欠損させたマウスでの重症度の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル:

Cre-loxP システムを用いてマクロファージ特異的に Setdb2 を欠損させたマウス (Setdb2^{fl/fl} LysM/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。比較対象の野生型マウスとして 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 2.5 mg/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 IV (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 PBS を用いて気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。回収した BALF を遠心し、血球成分と液性成分に分離した。血球成分は、その細胞数を BIO-RAD 社製の TC20™ Automated Cell counter で測定した。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。

【ARDS model mice】

C57BL/6 or Setdb2 flox/LysM Cre mice



Intratracheal administration of LPS (2.5mg/kg)

Development of ARDS

Reference: Xu Y, Ito T, PLoS One. 2014 Oct 2;9(9)

(5) 組織学的解析 :

摘出した組織 (肺) をホルマリン固定し、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^{ff} LysM/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 欠損マウスで有意に上昇していることが確認できた。その違いは晩期においては認められなくなった。このことから、ARDS 発症早期のサイトカイン産生を Setdb2 が制御していることが示唆された。

(2) ARDS モデルマウスにおける肺胞内浸潤細胞の検討 :

サイトカINSTORMの中心的役割をマクロファージが担っていると仮定した場合、LPS 刺激に直後にマクロファージが動員されると予想された。実際、早期 ARDS では肺胞内浸潤した細胞の多くがマクロファージであった。その後、晩期 ARDS では肺胞内浸潤している細胞の多くが好中球であった。その細胞数・細胞比率については、野生型マウスと比較し、Setdb2 欠損マウスでは、肺胞内浸潤細胞の細胞数の上昇およびマクロファージ比率の上昇が認められた。

(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は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、野生型マウスと比較し、Setdb2 欠損マウスでは Histology score が増加していることがわかった。マクロファージにおける Setdb2 の発現は炎症状態の制御することが示唆された。

(4) ARDS モデルマウスにおける生理学的変化の検討 :

主にマウスの体重変化を評価項目とした。その結果、晩期 ARDS では、野生型マウスと比較し、Setdb2 欠損マウスでは、体重の有意な減少が認められた。この結果は、Setdb2 の欠損により炎症が強く惹起されたことによる結果であると考えられた。

(5) in vitro における炎症性サイトカインの検討 :

マウスの骨髄細胞を M-CSF で刺激し、マクロファージを分化誘導させたのち、LPS 刺激を行い、各種炎症性サイトカインなどの発現を評価した。野生型マウスと比較し、Setdb2 欠損マウス由来のマクロファージは、炎症性サイトカイン、特に IL-6 の発現が上昇することが明らかとなった。

以上の結果より、ARDS モデルにおいて、菌体成分などによってマクロファージが活性化し、大量の炎症性サイトカインを産生すること病態の悪化を引き起こすが、Setdb2 はその過剰産生をコントロールしており、Setdb2 が欠損することによって、著しい病態悪化を示すことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satoki Inoue, Yumiko Tamaki, Shota Sonobe, Junji Egawa Masahiko Kawaguchi	4. 巻 4(1)
2. 論文標題 A pediatric case developing critical abdominal distension caused by a combination of humidified high-flow nasal cannula oxygen therapy and nasal airway.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-017-0143-0	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 Shota Sonobe, Satoki Inoue, Tadashi Nishiwada, Junji Egawa, Masahiko Kawaguchi	4. 巻 5(1)
2. 論文標題 A Case of Subcutaneous Emphysema/Mediastinal Emphysema During the Use of Humidified High-Flow Nasal Cannula.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-019-0305-3	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shota Sonobe, Masahiro Kitabatake, Noriko Ouji-sageshima, Natsuko Imakita, Toshihiro Ito
2. 発表標題 The critical role of Epigenetic regulation by Setdb2 in acute respiratory distress syndrome (ARDS) model
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 園部 奨太
2. 発表標題 エピジェネティクス解析を用いた急性呼吸促進症候群（ARDS）の病態解明
3. 学会等名 第46回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Sonobe, Satoki Inoue, Junji Egawa, Masahiko Kawaguchi
2. 発表標題 Examination of sternotomy range that causes respiratory failure
3. 学会等名 日本集中治療医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shota Sonobe, Masahiro Kitabatake, Atsushi Hara, Ryutarō Furukawa, Tomoko Nishimura, Noriko O uji-Sagaeshima, Toshihiro Ito
2. 発表標題 Histone modification enzyme SET domain bifurcated 2 (Setdb2) regulates acute inflammation in murine model of acute respiratory distress syndrome (ARDS).
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	伊藤 利洋 (Ito Toshihiro)		
研究協力者	北畠 正大 (Kitabatake Masahiro)		
研究協力者	川口 昌彦 (Kawaguchi Masahiko)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井上 聡己 (Inoue Satoki)		