

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09038

研究課題名(和文)代謝ストレスによる慢性炎症のエピゲノム制御機構の解明

研究課題名(英文)Epigenetic regulation of chronic inflammation by metabolic stress

研究代表者

蜂屋 瑠見 (HACHIYA, Rumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：50365318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、H3K9メチル化酵素Setdb1の炎症抑制についてLPSによる急性炎症モデルにおける意義を明らかにしてきたが、代謝ストレスによる炎症でもSetdb1が内在性炎症抑制因子として作用することを見出し、その制御機構の解明を課題とした。in silicoにてマイクロアレイ解析を行い、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複数同定し、Setdb1ノックダウンマクロファージを用いたin vitro系に直し解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の学術的意義は、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にアプローチしている点にある。社会的意義は、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が、飽和脂肪酸による慢性炎症の治療標的としての可能性が期待できる点にある。

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 chronic inflammation by metabolic 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 factors which is regulated by Setdb1 by in silico analysis.

研究分野：小児科学、内分泌学

キーワード：慢性炎症 エピジェネティクス マクロファージ 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

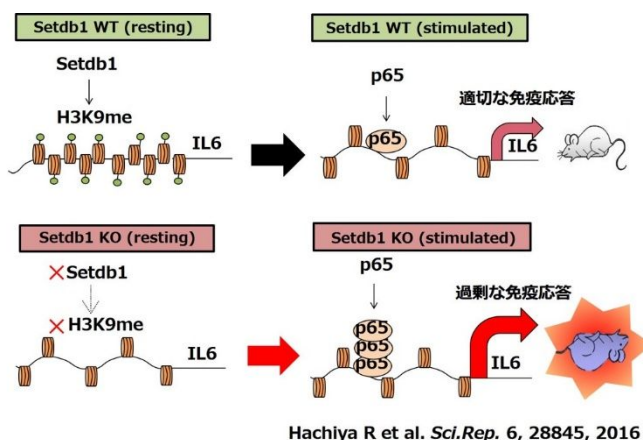
### 1. 研究開始当初の背景

我々は、メタボリックシンドロームの基盤病態として、脂肪細胞とマクロファージが、飽和脂肪酸と炎症性サイトカインを介して相互作用し、脂肪組織炎症が持続する悪循環が存在すること、飽和脂肪酸による炎症の一部にはリポ多糖 (**LPS**) の受容体である **Toll-like receptor 4 (TLR4)** が関与することを報告した (**Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27: 84-91, 2007**)。しかし、慢性炎症を標的とする治療は未だ開発されていない。一方、エピゲノム修飾は、環境要因の影響を受けて可逆的に変化し、メタボリックシンドロームの病態にも寄与するが、マクロファージとエピゲノムについての知見はほとんどない。そこで我々は、まず、炎症転写制御の実験系として知見の多い **LPS** による急性炎症の系を用いて独自にマクロファージ内在性炎症抑制分子のスクリーニングを行い、**H3K9** メチル化酵素 **Setdb1** (転写抑制性のエピゲノム修飾酵素) を同定し、**Setdb1** 欠損マクロファージを用いて **Setdb1** が **in vitro** においてリポ多糖 (**LPS**) による炎症性サイトカイン発現を抑制することを見出した。また、マクロファージ特異的 **Setdb1** ノックアウトマウスに対する **LPS** 投与モデルを用いて、**Setdb1** が **in vivo** においても **TLR4** を介する炎症反応に拮抗的に作用することを見出した。

さらに、**Setdb1** による **IL6** プロモーター上の **H3K9** メチル化が、ゲートキーパーとして **NFκB p65** のリクルートを調整し適切な範囲に免疫応答を制御していること (図1) を見出した (**Scientific Reports 6: 28845, 2016**)。

**LPS** 刺激に比して、飽和脂肪酸刺激では、炎症性サイトカイン発現誘導自体が明らかに遷延性である

(**Diabetes 63(1):152-61, 2014**) ため、**TLR4** シグナルに加えて、細胞内レベルで炎症の慢性化に関わる機構があると想定されるが、飽和脂肪酸による炎症への **Setdb1** の関与は不明である。我々は、**in vitro** の予備的検討を行い、高グルコース、飽和脂肪酸といった代謝ストレスによる炎症においても **Setdb1** が内在性炎症抑制因子として作用することを見出した。



(図1) Setdb1は内在性の炎症抑制因子(ゲートキーパー)である

### 2. 研究の目的

代謝ストレスによる慢性炎症について、**Setdb1** による炎症制御機構を解明する。具体的には、**in vitro** の系を用いて、予備的検討で同定した代謝ストレス(高グルコース、飽和脂肪酸)による炎症(抑制)への **Setdb1** の関与について、網羅的遺伝子発現解析により **Setdb1** が制御するパスウェイを **in silico** に同定し、そのエピゲノム制御を解析する。

### 3. 研究の方法

すでに作成済みの **Setdb1** ノックダウンマクロファージ細胞株(以下 **Setdb1 KD**)を用いた **in vitro** の系を用いる。野生型および **Setdb1 KD** に対して、これまでの予備検討で見出した代謝ストレス刺激(高グルコース、飽和脂肪酸)を行った細胞の炎症性サイトカインの動態について、定量的 **PCR**、**ELISA** を用いて確認する。それらの中から重要と思われる条件を選び、マイクロアレイ解析に供する。**Setdb1** は **H3K9** メチル化を介して遺伝子発現抑制を行うため、**in silico** 解析にて **Setdb1 KD** において野生型に比し発現が有意に上昇している遺伝子を抽出し、**Setdb1**

の制御を受けるパスウェイを同定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) **Setdb1** ノックダウンマクロファージ

すでに作成済みの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%**のノックダウン効率であった。

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。解析の過程で、細胞の継代数が進むにつれ、**Setdb1** のノックダウン効率が悪化し、**Setdb1** の作用を検討しにくくなるという現象が生じ、計画通りに解析を進めることが困難であった。そこで、より安定的かつ明瞭に **Setdb1** の作用を検討するべく、**CRISPR-Cas9** システムを用いた **Setdb1** 欠損細胞株の作成を進めた。

##### (2) 肥満において重要な代謝ストレスによる炎症での **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。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。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。

##### (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複数同定し、それらの分子の生物学的意義を *in vitro* に戻して解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hachiya Rumi、Tanaka Miyako、Itoh Michiko、Suganami Takayoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Molecular mechanism of crosstalk between immune and metabolic systems in metabolic syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-022-00198-7	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蜂屋瑠見, 白川伊吹, 菅波孝祥, 長谷川行洋, 小川佳宏
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術集会
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	菅波 孝祥  (SUGANAMI Takayoshi)		

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