

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790956

研究課題名（和文） 敗血症におけるエピジェネティック制御機構の検討

研究課題名（英文） Epigenetic gene regulation in sepsis

研究代表者

石井 誠 (ISHII MAKOTO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30317333

研究成果の概要（和文）：

敗血症マウスにおけるエピジェネティクスの関与を検討した。敗血症マウスの腹腔内マクロファージは、ヒストン修飾によるサポートの下で M2 の表現型を有する傾向を認めた。また敗血症後の末梢血好中球ではヒストン修飾を介した CXCR2 の低下を認め、病態増悪に寄与していることが示唆された。さらに、ヒストン H3K4 メチル化酵素である MLL のヘテロ欠失マウスの検討により、敗血症の病態にヒストンのメチル化も関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the epigenetic gene regulation in mice model of polymicrobial sepsis. The peritoneal macrophages recovered from septic mice showed M2 phenotype and was regulated by histone modification. CXCR2 levels in peripheral neutrophils recovered from septic mice were also regulated by epigenetic change, contributing to worsening the severity of sepsis. In addition, we showed the importance of MLL, a histone H3K4 methyltransferase, during sepsis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：敗血症、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、一般に DNA の塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現・情報を調節する機構をいう。この遺伝子発現のエピジェネティック制御は、もともと腫瘍医学や発生医学の分野で主に検討されてきた。近年ではさらに免疫学や感染症学の分野においてもその重要性は認識されている。

敗血症は感染症を原因とする全身性炎症反応症候群でしばしば致命的となる重篤な

疾患である。その病態として敗血症後のいわゆる immunoparalysis とよばれる免疫不全状態がしばしば臨床的にも問題となっている。近年この敗血症の病態に、各種免疫担当細胞（たとえば樹状細胞、ヘルパー T 細胞、制御性 T 細胞など）のエピジェネティックな修飾による遺伝子発現制御が関与することが報告されている。しかし、敗血症におけるエピジェネティクス制御に関して、特にマクロファージや好中球に注目した検討は十分なされていない。

敗血症は、その病態に免疫細胞、特に M2 マクロファージと呼ばれる表現型を有するマクロファージが、重要な役割を果たしていると近年報告されている (Mehta A et al, Shock 2004) (Takahashi H et al. Cret Care Med, 2004)。本研究代表者は、これまで M2 マクロファージのエピジェネティック制御機構に関する研究に従事し、ヒストンのメチル化が M2 マクロファージの表現型の維持に重要であることを報告した (Ishii M et al. Blood, 2009)。そこで本研究ではまず敗血症におけるエピジェネティック制御機構に関し、M2 マクロファージに注目して検討する。

重症敗血症において、末梢血好中球上のケモカインレセプター CXCR2 の発現が低下し、感染巣への好中球の集積が低下し、細菌クリアランスが低下する結果、生存率が悪化することが報告されている (Pinheiro da Silva F et al. Front. Biosci. 2009) (Alves-Filho JC et al. Shock, 2008)。そこで、敗血症マウスモデルを用いて、CXCR2 の発現がエピジェネティックな制御を受けるかの検討を通じて、敗血症における好中球でのエピジェネティクスの関与を明らかにする。

さらにヒストン H3 の N 末端より 4 番目のリジン基 (K4) の特異的脱メチル化酵素である MLL のヘテロ欠失マウスを用いて、敗血症を惹起し、MLL の敗血症における役割の検討を通じて敗血症におけるエピジェネティクスの総合的検討を行う。

2 . 研究の目的

(1) 腹膜炎誘発敗血症性マウスモデル [Cecal ligation and puncture (CLP) モデル] を用いて、腹腔内や脾臓におけるマクロファージの表現型 (M2 マクロファージ/ M1 マクロファージ) を評価する。さらに M2 マーカーや M1 マーカーのプロモーター領域におけるヒストンのメチル化 [H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3] やアセチル化 [acetyl H3] を検討し、敗血症におけるマクロファージのヒストン修飾を評価することを目的とする。

(2) 上述の腹膜炎誘発敗血症マウスモデルを用いて、末梢血好中球上のケモカインレセプター CXCR2 の発現が低下していることを確認する。さらに、CXCR2 のプロモーター領域におけるヒストンのメチル化 [H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3] やアセチル化 [acetyl H3] を検討し、敗血症における好中球のヒス

トン修飾を評価することを目的とする。

(3) さらにヒストン H3K4 のメチル化酵素である MLL のヘテロ欠失マウス (MLL^{+/-}) を用いて、同敗血症モデルで WT と比較検討することにより、敗血症におけるヒストン H3K4 メチル化酵素 MLL の役割を総合的に検討する下を目的とする。

3 . 研究の方法

敗血症は、マウスの盲腸の結紮・穿孔により腹膜炎を惹起し誘発する (Cecal ligation and puncture : CLP)。

(1) 敗血症後のマクロファージの表現型 (M1/M2) の検討は、腹腔細胞を PBS3ml を注入して回収後、プラスチックディッシュに 2 時間培養し接着細胞をマクロファージとして回収する。細胞の RNA を分離し cDNA を得た後、M1/M2 マーカー (Ym1, FIZZ-1, Arginase-1 / NOS2) の発現を real time PCR 法にて測定しその表現型を評価する。

さらに各 M1/M2 マーカーのプロモーター領域におけるヒストンのメチル化 (H3K4me3, H3K27me3) およびアセチル化に関して ChIP assay 法を用いて検討する。

(2) 敗血症後にマウスの末梢血を心臓採血にて採取し、赤血球を溶血した後、好中球を Ly6G 抗体磁気ビーズにて分離する。好中球上の CXCR2 の蛋白発現はフローサイトメトリ法にて、また CXCR2 mRNA の発現は real-time PCR 法にて評価する。

好中球上の、CXCR2 プロモーター領域におけるヒストンのメチル化 (H3K4me3, H3K27me3) およびアセチル化に関して ChIP assay 法を用いて検討する。

(3) また H3K4 の脱メチル化酵素である MLL のヘテロ欠失マウスを用いて、敗血症での生存率、マクロファージの表現型、BAL 中および腹腔内サイトカインの発現などを比較検討し、また in vitro においてもマクロファージの表現型の検討を行い、敗血症におけるエピジェネティックな制御機構の多面的検討を行う。

4 . 研究成果

(1) 敗血症におけるマクロファージのエピジェネティック制御

敗血症 6 時間後に採取した腹腔マクロファージでは、対照マウスに比べて M2 マーカー (Ym1, FIZZ-1, Arginase-1) が上昇する傾向が見られたが有意差は認めなかった。

M2 マクロファージの各マーカー (M2 マーカー) のプロモーター領域におけるヒストン修飾は、H3K4me3 が上昇し H3K27me3 は低下したが、有意差は認められなかった。アセチル化には変化が見られなかった。

(2) 敗血症における好中球のエピジェネティク制御

敗血症後、末梢血好中球上の CXCR2 の発現は有意に低下した。

末梢血好中球において、CXCR2 プロモーター領域では、転写活性上昇に寄与するヒストン H3 リジン 4 メチル化 (H3K4me3) や転写活性低下に寄与するヒストン H3 リジン 27 メチル化 (H3K27me3) は sham 及び CLP 群で差は認めなかった。しかし、転写活性上昇に寄与するヒストン H3 アセチル化 (Acetyl H3) は CLP 群の方が sham 群に比べ有意に低かった。

よって重症敗血症における末梢血好中球上の CXCR2 の低下は、Acetyl H3 の低下によりエピジェネティックな遺伝子発現制御を受けると考えられた。

(3) MLL ヘテロ欠失マウスを用いた検討

敗血症マウスの生存率は MLL+/ -マウスの方が WT マウスに比べ有意に上昇していた。

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6) の発現の上昇は、MLL+/ -マウスの方が WT マウスに比べ有意に低下していた。

血液、腹腔洗浄液、脾臓抽出液における細菌量は MLL+/ -マウスの方が WT マウスに比べ有意に少なかった。

以上より H3K4 の特異的脱メチル化酵素である MLL が敗血症の病態に寄与していることが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

Kimizuka Y, Kimura S, Saga T, Ishii M, Hasegawa N, Betsuyaku T, Iwakura Y, Tateda K, Yamaguchi K. Roles of IL-17 in an experimental Legionella pneumonia model. Infect Immun. 80:1121-1127,

2012. (査読あり)

Kamata H, Tasaka S, Inoue K, Miyamoto K, Nakano Y, Shinoda H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Ishii M, Hasegawa N, Takamiya R, Fujishima S, Takano H, Ishizaka A. Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice. Exp Biol Med. 236:315-324, 2011. (査読あり)

石井誠。特集 呼吸器病原体 病原因子 生体反応 感染症におけるエピジェネティクス 呼吸器内科 19:71-76, 2011. (査読なし)

Carson WF 4th, Cavassani KA, Ito T, Schaller M, Ishii M, Dou Y, Kunkel SL. Impaired CD4+ T-cell proliferation and effector function correlates with repressive histone methylation events in a mouse model of severe sepsis. Eur J Immunol 40:998-1010, 2010. (査読あり)

Cavassani CA, Wen H, Moreira AP, Schaller MA, Carson IV WF, Ishii M, Lindell DM, Lukacs NW, Keshamouni WG, Hogaboam CM, Kunkel SL. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells creates an environment to potentiate tumor growth. Blood, 115:4403-4411, 2010. (査読あり)

石井誠、山口佳寿博。最新 ARDS の全て -ARDS の疾患感受性遺伝子とエピジェネティック制御 あらたな治療法開発に向けて 医学のあゆみ 別冊 ARDS のすべて, 231-236, 2010. (査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

Ishii M, Asano K, Namkoong H, Kagawa S, Nakamura M, Hirai H, Nagata K, Tasaka S, Hasegawa N. Prostaglandin D2 Receptor CRTH2 is a Critical Regulator in a Mice Model of Polymicrobial Sepsis. The 34th annual conference on shock (American shock society). Nor Fork, June 12th, 2011

Ishii M, Hasegawa N, Mizoguchi K, Namkoong H, Kagawa S, Nakamura M, Hirai H, Nagata K, Tasaka S, Asano K. Critical Roles Of Prostaglandin D2 Receptor CRTH2 In A Mice Model Of Polymicrobial Sepsis. The 107th annual International Conference of American thoracic society. Denver. May 16th, 2011.

Carson WF, Cavassani K, Schaller M, Li X, **Ishii M**, Ito T, Lukacs NW, Hogaboam CM, Dou Y, Kunkel SL. Mice Haploinsufficient For The Histone Methyltransferase MLL Exhibit Decreased Inflammatory Responses During Polymicrobial Sepsis. The 107th annual International Conference of American thoracic society. Denver. May 15th, 2011.

Ishii M, Hasegawa N, Mizoguchi K, Namkoong H, Kagawa S, Nakamura M, Hirai H, Nagata K, Tasaka S, Asano K. Prostaglandin D2 Receptor CRTH2 is A Critical Regulator in A Mice Model of Polymicrobial Sepsis. 第 51 回日本呼吸器学会、東京、2011 年 4 月 24 日。

石井誠、浅野浩一郎、溝口孝輔、鎌田浩史、君塚善文、藤原 宏、船津洋平、加川志津子、中村正孝、平井博之、永田欽也、田坂定智、長谷川直樹、石坂彰敏。敗血症におけるプロスタグランジン D2 とそのリセプター-CRTH2 の役割に関する検討。第 25 回 日本 Shock 学会総会、東京、2010 年 5 月 29 日。

Ishii M, Hogaboam CM, Ishizaka A, Kunkel SL. Critical roles of Toll-like receptor 9 on sepsis-induced acute lung injury. The 106th annual International Conference of American thoracic society. New Orleans. May 16th, 2010.

石井誠、石坂彰敏、Steven L. Kunkel. 敗血症性急性肺損傷における Toll-like receptor 9 (TLR9) の役割の検討。第 50 回日本呼吸器学会、京都、2010 年 4 月 24 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 誠 (ISHII MAKOTO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30317333