

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860704

研究課題名(和文)肥満脂肪組織マクロファージにおける細胞内炎症のエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of intracellular inflammation in macrophages of obese adipose tissue.

研究代表者

蜂屋 瑠見 (HACHIYA, Rumi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：50365318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの基盤病態として、肥満脂肪組織における慢性炎症が想定されているが、細胞内の炎症の慢性化機構は不明点が多く、環境素因と遺伝素因の相互作用による影響を受けていると考えられる。我々は、環境素因と遺伝素因の間をつなぐエピジェネティック因子の一つであるヒストンメチル化酵素Setdb1がマクロファージの新規炎症抑制因子であることを細胞レベルおよび個体レベルで明らかにした。マクロファージが様々な環境素因にどのように反応するかについて新たな知見が明らかになり、肥満脂肪組織の炎症におけるSetdb1の機能を明らかにしていくための基礎的知見を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Proinflammatory cytokine production in macrophages involves multiple regulatory mechanisms, which are affected by environmental and intrinsic stress. Here we demonstrate that SET domain, bifurcated 1 (Setdb1) in macrophages potently suppresses Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated expression of proinflammatory cytokines including interleukin-6 through its methyltransferase activity. As a molecular mechanism, Setdb1-deficiency decreases the basal H3K9 methylation levels and augments TLR4-mediated NF- κ B recruitment on the proximal promoter region of interleukin-6, thereby accelerating interleukin-6 promoter activity. Moreover, macrophage-specific Setdb1-knockout mice exhibit higher serum interleukin-6 concentrations in response to lipopolysaccharide challenge and are more susceptible to endotoxin shock than wildtype mice. This study provides evidence that Setdb1 is a novel epigenetic regulator of proinflammatory cytokine expression in macrophages in vitro and in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マクロファージ エピジェネティクス サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの基盤病態として、肥満脂肪組織における慢性炎症が想定されている。申請者らはこれまでに、肥満脂肪組織マクロファージにおける炎症性サイトカイン発現制御において、炎症シグナル伝達系 Toll-like receptor 4 (TLR4) /NF-κB 経路が重要であることを証明した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 354: 45-49, 2007)。また、activating transcription factor 4 (ATF4) が TLR4 シグナルを増強する「ポジティブフィードバック機構」(Diabetes. 63:152-61, 2014) および、activating transcription factor 3 (ATF3) が TLR4 シグナルを抑制する「ネガティブフィードバック機構」の存在も見出した (Circ. Res. 105: 25-32, 2009)。しかしながら、細胞内の炎症の慢性化機構は不明点が多い。

申請者らは、環境素因と遺伝素因の間をつなぐエピジェネティック制御に注目し、マクロファージにおいて、転写抑制に関わるヒストン H3K9 メチル化酵素 Setdb1 (SET domain. Bifurcated 1) が炎症性サイトカイン発現を負に調節することを予備的に見出した。

2. 研究の目的

Setdb1 による炎症性サイトカイン発現制御の報告が全くないことから、炎症性サイトカイン発現解析の主要な実験系であるリポポリサッカライド (LPS; 細胞内毒素) を投与し、これまでに同定し得なかった新たな炎症の病態メカニズムを明らかにすることにより、増加の一途を辿るメタボリックシンドロームをはじめとした炎症性疾患の新しい治療標的の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) Setdb1 機能欠損マクロファージにおける遺伝子発現解析

野生型および Setdb1 を機能欠損 (ノックアウト、ノックダウン) したマクロファージを用いて、LPS 刺激を行い、マイクロアレイ法により網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、その結果を定量的 PCR 法で確認した。

(2) 酵素活性部位変異体を用いた解析

Setdb1 のヒストンメチル化酵素としての酵素活性の重要性を検討するため、Setdb1 ノックダウンしたマクロファージに酵素活性部位変異体を強制過剰発現し、IL6 のプロモーターアッセイを行った。

(3) ヒストンメチル化状態の解析

野生型および Setdb1 をノックアウトしたマクロファージを用いて、LPS 刺激を行い、クロマチン免疫沈降法を用いて、IL6 プロモーター上の H3K9me3 の経時変化を検討した。

(4) IL6 プロモーター上の結合モチーフ解析

IL6 のプロモーター 1kb の deletion mutant を用いて、Setdb1 の作用に重要な結合モチーフを

絞り込んだ。また、NF-κB p65 のクロマチン免疫沈降を行った。

(5) 生体における Setdb1 の意義の検討

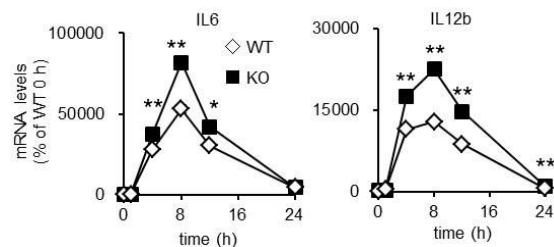
野生型およびマクロファージ特異的 Setdb1 欠損マウスに LPS を腹腔内投与し、各種臓器重量、IL6 の発現、分泌を解析した。致死量の LPS 投与を別に行い、野生型と欠損マウスで生存率を比較した。

4. 研究成果

(1) Setdb1 機能欠損マクロファージにおける遺伝子発現解析

マイクロアレイ法により、野生型において LPS 誘導性に発現が上昇する遺伝子群のうち、Setdb1 機能欠損によって、より発現が上昇する遺伝子群をパスウェイ解析した結果、炎症性サイトカインが多く集積していた。定量的 PCR により、Setdb1 の機能欠損は IL6 などの LPS による炎症性サイトカイン発現誘導を増強することを確認した。(図 1)

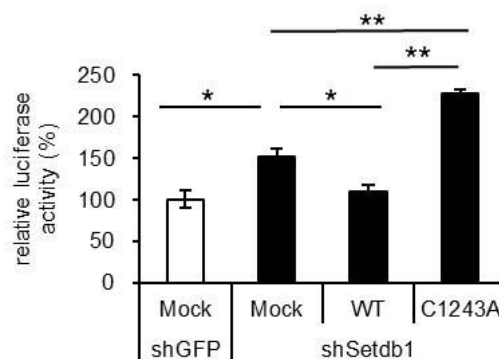
図 1. Setdb1 欠損マクロファージにおける炎症性サイトカイン遺伝子発現



(2) 酵素活性部位変異体を用いた解析

まず、Setdb1 をノックダウンしたマクロファージの IL6 転写活性は野生型に比し増強していた。次に Setdb1 の野生型および酵素活性部位変異体を過剰発現してレスキューしたところ、野生型の過剰発現はノックダウンの効果をキャンセルしたが、酵素活性部位変異体の過剰発現は効果を示さなかった。(図 2)

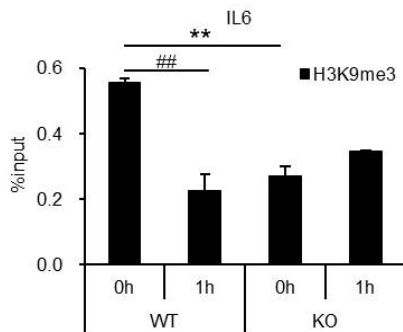
図 2. 酵素活性部位変異体を用いた IL6 プロモーターアッセイ



(3) ヒストンメチル化状態の解析

野生型では、LPS 刺激 1 h で、Il6 プロモーター上の H3K9me3 が減少した。SETDB1 ノックアウトでは定常状態の Il6 プロモーター部位の H3K9me3 が脱メチル化され、LPS 刺激による変化が消失した。(図 3)

図 3. Il6 プロモーターのヒストンメチル化状態

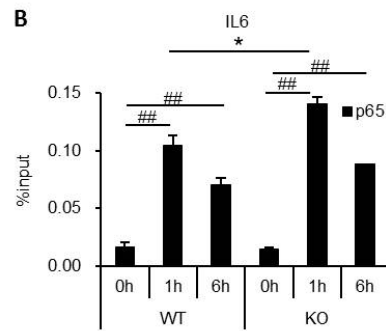
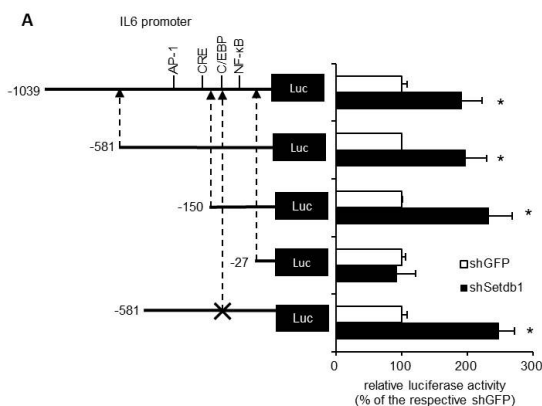


(4) Il6 プロモーター上の結合モチーフ解析

Il6 のプロモーター 1 kb の deletion mutant を用いて、Setdb1 の作用に重要な結合モチーフを絞り込んだところ、上流 -150bp—27bp の領域が重要であることが示唆された。この領域内には C/EBP 結合サイトと NF-κB 結合サイトが存在するため、C/EBP 結合サイトに変異を挿入したが、Setdb1 ノックダウンによる効果は影響されず、NF-κB 結合サイトが重要であることが示唆された(図 4A)。クロマチン免疫沈降を用いて NF-κB p65 のリクルートを解析したところ、Setdb1 欠損マクロファージでは NF-κB p65 のリクルートが増強していた(図 4B)。

図 4. Setdb1 欠損は Il6 プロモーターにおいて NF-κB p65 のリクルートを増強する

A. deletion mutant による Il6 プロモーターアッセイ
B. NF-κB p65 クロマチン免疫沈降

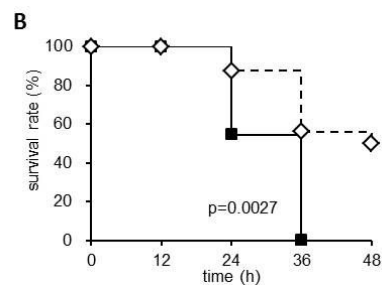
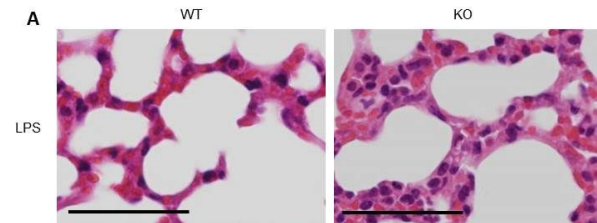


(5) 生体における Setdb1 の意義の検討

野生型 (WT) およびマクロファージ特異的 Setdb1 欠損マウス (KO) に LPS を腹腔内投与したところ、肺および脾臓の臓器重量が KO で増加した。肺の病理組織所見では細胞壁肥厚、炎症性細胞浸潤が KO で増強していた(図 5A)。肺、脾臓、肝臓の Il6 mRNA 発現レベルが増強し、血中 Il6 分泌量も KO で増強していた。さらに、致死量の LPS 投与では、KO で生存率が低下した(図 5B)。

図 5. 生体における Setdb1 の意義の検討

A. 肺の病理組織像 (scale bars: 50μm)
B. 生存曲線



以上の結果から、マクロファージにおいて、ヒストンメチル化酵素 Setdb1 がヒストンメチル化活性を介して炎症を抑制していることを、細胞レベルおよび個体レベルで明らかにした。

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 1 件)

1. R. Hachiya, T. Shihashi, I. Shirakawa, Y.

Iwasaki , Y. Matsumura , Y. Oishi , Y. Nakayama ,
Y. Miyamoto , I. Manabe , K. Ochi , M. Tanaka ,
N. Goda , J. Sakai , Y. Ogawa. The H3K9
methyltransferase Setdb1 regulates
TLR4-mediated inflammatory responses in
macrophages. **Scientific Reports**, in press. 査読
あり

〔学会発表〕(計2件)

1. 椎橋卓哉、蜂屋瑠見 他：ヒストンメチル化酵素によるマクロファージの炎症抑制機構の解明(口演)、第35回日本肥満学会、2014/10/25、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)
2. 蜂屋瑠見 他：炎症転写制御におけるヒストンメチル化酵素の機能的意義の解明(ポスター)、第19回アディポサイエンス・シンポジウム、2014/8/23、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

蜂屋 瑠見 (HACHIYA, Rumi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・
特任助教

研究者番号：50365318