

令和元年6月13日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09902

研究課題名(和文)成人スティル病末梢血のエピゲノム異常の検討と病態解明

研究課題名(英文) Epigenetic aberration and pathologic analysis in peripheral blood of adult-onset still's disease

研究代表者

三村 俊英 (Mimura, Toshihide)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：30260491

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)：1) flow cytometryを用いた末梢血ヒストン修飾変化の解析により、AOSD単球、好中球およびB細胞分画においてH3K4me3/H3K27me3に変化が見られた。さらに疾患活動性とこのヒストン修飾変化は関連していた。特に、単球分画のCD14++CD16-細胞群は血清IL-18と関連した。

2) 上記の結果から単球分画に焦点を絞ってATAC-Seqを試みたが有意な結果は得られなかった。時間も考慮してtranscriptome解析を行った。その結果は有望な遺伝子を含めて健康人に比して有意な遺伝子発現変化が存在することを認めた。現在その結果を基にChIP-Seqを行うべく準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究においては、病気の原因の不明な成人発症スチル病(AOSD)の原因を解明するために、血液中の白血球のエピゲノム異常(遺伝子に変化を認めないけれどタンパク質の発現には変化が見られる制御機構)、特にヒストン修飾変化を各細胞亜群毎に解明する研究で、私達は単球という細胞群においてヒストンのメチル化異常を認めた。さらに、このメチル化異常の結果、どのような遺伝子の発現に変化が見られるのかを明らかにした。それを基に、この結果が蛋白の発現に影響するのか、そしてどのように病気の状態に関与するのか現在も研究を進めています。これが明らかになれば、新規治療法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：1) Histone modification in peripheral blood nucleated cells from adult-onset Still's disease (AOSD) was detected by flow cytometric analysis using specific antibodies against H3K4me3 or H3K27me3. There were specific aberrations of histone methylation in monocytes, neutrophils and B cells from AOSD patients comparing with healthy controls or other disease controls. Of interest was these histone methylation abnormalities were significantly associated with disease activity. Additionally aberrant histone methylations of a specific subset of monocyte with CD14++CD16- were significantly correlated with serum IL-18 concentration.

2) To analyze the pathogenic mechanism of AOSD from epigenetic point of view, ATAC-Seq was performed to identify genes with open chromatin. However, the technique showed nothing and an alternative method was carried out. We made transcriptome analysis and found several candidates of the target genes. We now preparing for ChIP-Seq analysis for the purpose above.

研究分野：リウマチ膠原病

キーワード：エピジェネティクス ヒストンメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

**成人発症スティル病 (AOSD)**は、原因不明の全身性慢性炎症性疾患であり、症状は弛張熱、皮疹、関節炎、リウマトイド因子陰性で、炎症反応と血清フェリチン高値が特徴的である。厚生労働省の指定する難病の1つで、通常は副腎皮質ステロイドに反応することが多いが、治療に難渋する症例も少なくは無い。また、一旦は軽快しても再発・再燃を来することが多い。不明熱の代表的疾患で感染症や悪性腫瘍などの除外診断が重要であり、有用な診断マーカーが無いため診断に苦慮することが多い。さらに、生命予後不良なマクロファージ活性化症候群 (MAS) または反応性血球貪食症候群 (RHS) の発症が膠原病関連疾患の中で多い特徴がある。臨床症状および除外診断から見ると、AOSD は膠原病関連疾患に含まれているが、自己抗体や自己反応性 T 細胞の存在は示されていないことから、自己免疫ではなく近年の新規疾患概念である自己炎症性疾患に含まれると考えられる。AOSD 発症年齢の平均値は 40 歳代後半で単一な遺伝子異常によって発症するとは考えにくい。また、申請者が中心的役割を担った 2012 年実施の厚生労働省班会議による AOSD 全国調査によれば、家族内発生は見られなかった (Asanuma, et al. *Mod Rheumatol*, 2015)。これらの点から AOSD の多くは単一遺伝子異常によらない発症機序を有すると考えられる。遺伝子異常によらないという点ではエピゲノムレベルでの異常が想定される。さらに AOSD は病型によって3つに分類され (単周期性全身型、多周期性全身型、関節型)、発症時の臨床症状は似ているものの、経過は全く異なる場合が多い。これは、独立した異なる原因 (感染症、遺伝子異常) で発症する可能性が、一元的には可塑性のあるエピゲノム異常により発症する可能性を示唆している。ゲノムとは異なりエピゲノムは細胞種毎に異なり、可塑性があることが特徴であることから、異常が想定される末梢血有核細胞を亜分画に分類して網羅的に解析を行わない限り病態に関連する異常を同定することは不可能である。申請者は、末梢血有核細胞亜集団毎のヒストン修飾を FACS (fluorescence activated cell sorting) によって簡便に解析するシステムを構築し、エピゲノム異常が想定されるベッチェット病を対象疾患として解析したところ、2つの細胞亜集団 (好中球、 $\square\square$ TCR 陽性 T 細胞) においてエピゲノム異常を得たことからこれを発表 (Aizaki, et al. American College of Rheumatology Annual Meeting, San Francisco, 2015 にて発表および投稿準備中) するとともにこのシステムの特許出願を行った (三村俊英、他、特願 2014-200824)。また、エピゲノムによって調節される遺伝子転写領域のクロマチン構造変化 (クロマチン構造が緩んで転写亢進となる open chromatin (euchromatin) 状態か、転写抑制される closed chromatin (heterochromatin) 状態) を解析する上で最近技術革新があり、理論的には単一細胞の euchromatin 状態の塩基配列を同定することが出来るシステム (ATAC-seq) が相次いで報告された。GWAS や詳細な細胞亜分画分析を経ない transcriptome 解析では決して得られない情報であるが、大変重要な情報になり得ると考える。

## 2. 研究の目的

本研究の研究目的は、発症原因や病態の不明である AOSD における病態に関係するエピゲノム異常を解明し、新規治療の標的を探索する事である。具体的には以下の3つの柱を目的とする。

- 1) AOSD 患者末梢血有核細胞亜分画におけるヒストン修飾の状態を、flow cytometry を用いて細胞表面染色と核内染色によるヒストン修飾の状態を解析する。
- 2) ATAC-seq 法を用いて、AOSD 患者末梢血有核細胞表面抗原から亜分画に分類された細胞におけるクロマチン構造のうちオープン (euchromatin) 状態の遺伝子配列を決定しその遺伝子をゲノムレベルで同定する。
- 3) 上記 1) における flow cytometry を用いた末梢血有核細胞亜分画毎のヒストンマークの解析が、2) で示されるクロマチン構造と相関するのかが、健常対照者との比較なども用いて解析する。さらにそれが各細胞亜分画の機能に影響しているのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

成人発症スティル病 (AOSD) 患者 (およそ 70 人) および健常対照者の試料 (末梢血) が得られる状態である。AOSD 患者の末梢血を好中球とリンパ球に分離後それぞれの細胞表面マーカーとヒストン修飾の flow cytometry を用いてヒストン修飾における異常細胞亜集団の抽出および特異細胞亜集団別の ATAC-Seq 解析を行い、転写領域におけるクロマチン構造の変化とそれによる遺伝子発現変化と機能変化を解析する。これが奏効しない場合には、標的細胞亜群の transcriptome 解析を行い発現変化の強い遺伝子に小弟を宛てて ChIP-seq を進める。これらにより AOSD 特異的なヒストン修飾が明らかになり、機能との相関が証明されれば治療ターゲットとして新規治療の開発も期待できる。研究が順調に進めば、実際にモデルを用いて予備実験を行うことも視野に入る。

## 4. 研究成果

- 1) flow cytometry を用いた末梢血ヒストン修飾変化の解析により、AOSD 単球、好中球およ

びB細胞分画においてH3K4me3/H3K27me3に変化が見られた。さらに疾患活動性とこのヒストン修飾変化は相関していることも明らかになった。特に、単球分画のCD14++CD16-において血清IL-18との相関も見られた。

- 2) 上記の結果から単球分画に焦点を絞ってATAC-Seqを試みたが技術的な問題から有意な結果は得られなかった。時間経過も考慮して第2の方法であるtranscriptome解析を行った。その結果は有望な遺伝子を含めて健常人に比して有意な遺伝子発現変化が存在することを認めた。現在その結果を基にChIP-Seqを行うべく準備を進めている。なお、この結果の一部は、第63回日本リウマチ学会総会・学術集会にて報告する予定である。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計11件)

Mimura, T., Kondo, Y., Ohta, A., Iwamoto, M., Ota, A., Okamoto, N., Kawaguchi, Y., Kono, H., Takasaki, Y., Takei, S., Nishimoto, N., Fujimoto, M., Asanuma, YF., Mimori, A., Okiyama, N., Kaneko, S., Takahashi, H., Yokosawa, M., Sumida, T. Evidence-based clinical practice guideline for adult Still's disease. *Modern Rheumatology*, 2018, 28, 736-757, 査読有, DOI: 10.1080/14397595.2018.1465633

Araki, Y., Aizaki, Y., Sato, K., Oda, H., Kurokawa, R., Mimura, T. Altered gene expression profiles of histone lysine methyltransferases and demethylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36, 314-316, 査読有, <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=11175>

Araki, Y., Mimura, T. Matrix Metalloproteinase Gene Activation Resulting from Disordered Epigenetic Mechanisms in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*, 2017, 18, 1-20, 査読有, DOI: 10.3390/ijms18050905

Araki, Y., Wada, TT., Aizaki, Y., Sato, K., Yokota, K., Fujimoto, K., Yoon-Tae, Oda, H., Kurokawa, R., Mimura, T. Histone methylation and STAT3 differentially regulate IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatol*, 2016, 68, 1111-1123, 査読有, DOI: 10.1002/art.39563

Araki, Y., Mimura, T. The mechanisms underlying chronic inflammation in rheumatoid arthritis from the perspective of the epigenetic landscape. *Journal of Immunology Research*, 2016, 2016, 1-10, 査読有, DOI: 10.1155/2016/6290682

Araki, Y., Mimura, T. The histone modification code in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Mediators of Inflammation*, 2017, 2017, 1-12, 査読有, DOI: 10.1155/2017/2608605

### 〔学会発表〕(計34件)

Sato K, Aizaki Y, Yazawa H, Mimura T. In the Presence of IL-18, IL-10 but Not IL-6 Induces IFN- $\gamma$  Production and the Surface Expression of TRAIL on NK Cells. 2018 ACR/ARHP Annual Meeting, 2018

三村俊英. 教育講演;成人Still病の診断と治療. 第115回日本内科学会総会・講演会, 2018

相崎良美, 荒木靖人, 三村俊英. ベーチェット病患者の末梢血白血球におけるヒストンメチル化の解析. 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2018

Araki Y, Mimura T. Histone lysine methylation and STAT3 differentially regulate constitutive and IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Keystone symposia*, 2017

Sato K, Aizaki Y, Araki Y, Mimura T. A novel hierarchical relationship between interleukin-17A and interferon-alpha is indicated by analysis of multiple cytokines in the serum of Adult-Onset Still's disease and Behcet's disease. *EULAR* 2017, 2017

Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Kajiyama H, Yokota K, Sato K, Asanuma FY, Yoon-Taek Kim Y, Oda H, Mimura T. The epigenetic mechanism of constitutive and IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016

Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Kajiyama H, Yokota K, Sato K, Asanuma FY, Kim Y-T, Oda H, Mimura T. Altered profiles of histone lysine methylation affect MMP gene transcription in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. EULAR 2016, 2016

Aizaki Y, Araki Y, Sato K, Yokota K, Mimura T. Histone methylation in T cells as a biomarker of Behcet's disease activity. 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, 2016

Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Yokota K, Kajiyama H, Asanuma FY, Sato K, Oda H, Mimura T. Histone lysine methylation and STAT3 differentially regulate constitutive and IL-6-induced MMPs gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, 2016

Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Sato K, Mimura T. Histone lysine methylation and STAT3 differentially regulate constitutive and IL-6-induced MMPs gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. 第45回日本免疫学会学術集会, 2016

〔図書〕(計10件)

三村 俊英 他, メディカルレビュー社, 日常診療に活かす診療ガイドライン, 2018, 45-649

Araki Y, Mimura T, Elsevier, Epigenetics in Human Disease, 2nd edition, 2018, 353-386

三村 俊英 他, 診断と治療社, 成人スチル病診療ガイドライン 2017年版, 1-100

〔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

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/gyoseki2N.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 黒川 理樹

ローマ字氏名: (KUROKAWA, riki)

研究協力者氏名: 野間 久史

ローマ字氏名: (NOMA, hisashi)

研究協力者氏名: 荒木 靖人

ローマ字氏名: (ARAKI, yasuto)

研究協力者氏名：黒澤 奈津子  
ローマ字氏名：(KUROSAWA, natsuko)

研究協力者氏名：相崎 良美  
ローマ字氏名：(AIZAKI, yoshimi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。