

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09992

研究課題名(和文) 治療抵抗性関節リウマチに対するTet3を標的とするエピゲノム創薬

研究課題名(英文) Drug discovery targeting Tet3 for refractory rheumatoid arthritis

研究代表者

中野 和久 (Nakano, Kazuhisa)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：50406500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ(RA)においては、炎症環境下で関節滑膜にエピゲノム変化が生じることでより関節破壊を来しやすい形質が獲得され、治療抵抗性となることが想定される。我々は一連の検討により、DNA脱メチル化酵素であるTET3が、TNF のような炎症性サイトカインなどにより誘導され、多くの遺伝子の発現を変化させることを明らかにし、RA病態形成におけるepigenetic gate-keeperとして、炎症の遷延化の鍵を握っている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、関節リウマチ(RA)においては、生物学的製剤やJAK阻害剤などの分子標的薬の登場により、寛解を目指した治療が可能となったが、分子標的療法でもその3割から4割は治療抵抗性を示し、治療経過とともに難治化する。今回の研究成果は、TET3を標的としたRA滑膜におけるエピゲノム異常の是正が、RA治療のブレイクスルーとなりうる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In rheumatoid arthritis (RA), which is a representative autoimmune disease, it is assumed that epigenetic alterations occur in the synovium under the inflammatory environment, resulting in the acquisition of a trait that is more prone to joint destruction and refractory to treatment. In a series of studies, we found that the DNA demethylase TET3 was induced by inflammatory cytokines including TNF and altered the expression of many genes. As an epigenetic gate-keeper in the pathogenesis of RA, TET3 may play a key role in prolonging inflammation.

研究分野：関節リウマチ

キーワード：関節リウマチ サイトカイン 滑膜 DNAメチル化 エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子異常のみならず、エピジェネティクスの異常が RA の発症や重症度に深く関わることを示唆されるようになった。DNA のメチル化はエピジェネティクスの代表的な機構の一つであり、RA においても DNA メチル化異常が存在することが報告されてきたが、申請者らはゲノム網羅的 DNA メチル化解析により、RA 患者由来滑膜線維芽細胞 (FLS) には疾患に特有な DNA メチル化パターンが存在し、異常メチル化を示した遺伝子の多くが RA の病態に深く関わることを示した (Nakano K et al. Ann Rheum Dis 2013)。

RA において、生物学的製剤による炎症性サイトカインを標的とした治療は、寛解導入を身近なものにしたが、RA 治療にはいわゆる「Window of Opportunity」が存在し、治療開始の遅れは治療効果を限定的なものとする。このことは、炎症環境の持続自体が、滑膜炎部位に存在する細胞をより攻撃的かつ治療抵抗的な表現型に変質させている可能性を示唆するが、この詳細なメカニズムは不詳であった。申請者らは、RA における滑膜炎・骨関節破壊の中心的役割を担う TNF や IL-1 が、FLS において DNA メチル化酵素 (DNMT) の発現を低下させ、受動的脱メチル化を促進することを示し、疾患特有の DNA メチル化パターン形成の分子機構の一端を明らかにした (Nakano K et al. J Immunol 2013)。また近年、DNA 脱メチル化酵素として機能する Tet (Ten-Eleven translocation) タンパク質ファミリーが同定され、Tet タンパク質がメチル化シトシン (5mC) を水酸化して 5-ヒドロキメチルシトシン (5hmC) を合成することが知られるが、申請者らは昨年度までの検討で、ヒト FLS において TNF、IL-1、IL-17 等の刺激は Tet3 の mRNA、蛋白発現、及び 5hmC 発現を促進すること、Tet3 をノックダウンしたヒト FLS では TNF 依存性の CCL2 産生、ICAM-1 発現、浸潤能が阻害されること、さらには K/BxN 関節炎モデルでの検討では、野生型マウスに認められた顕著な骨破壊、軟骨破壊、滑膜炎が、Tet3<sup>-/-</sup>マウスでは有意に抑制されることを明らかにし (未発表)、RA 滑膜における TNF 等の持続的な炎症性サイトカイン曝露は、FLS に Tet3 依存性に炎症記憶を付与することで、高い組織浸潤性や破骨細胞誘導等を有する攻撃的表現型を不可逆的にもたらし炎症非依存性の骨破壊をもたらす可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、炎症による Tet3 の発現調節機構を明らかにし、より安全性の高いエピゲノム創薬への展開を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 炎症性サイトカイン-Tet axis による標的分子の同定

(2) 患者由来培養滑膜細胞 (FLS) における炎症性サイトカインによる Tet3 発現誘導における O-GlcNAc 化の関与について

以上2つの研究を並行して行う。

## 4. 研究成果

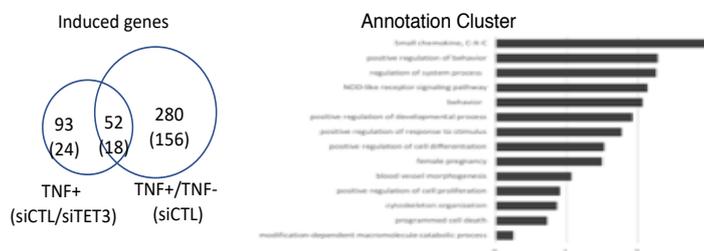
(1) FLS において、TET3 依存性に TNF で誘導される遺伝子群を明らかにするために、siRNA を用いて TET3 をノックダウンし、TNF 刺激の有無で、DNA マイクロアレイを使って網羅的に発現遺伝子の差を評価した。

TNF (-) or TNF (+)/control siRNA, TNF (-) or TNF (+)/TET3-KD の4群間で発現に有意差があった遺伝子において、クラスター解析を行った。TNF(-)/control siRNA と比較して TNF (+)/control siRNA でより発現が上昇/低下した遺伝子数は各々280/185、TNF (+)/TET3-KD と比較して TNF (+)/control siRNA により、より発現の上昇/低下した遺伝子数が各々93/87であった (図)。これらの2群で重複する発現の上昇/低下した遺伝子、各々52/43 遺伝子が、TET3 の発

現を介して TNF  $\alpha$  刺激により発現が上昇/低下する遺伝子群として考えられた。52 個の *TET3* 介在性 TNF 誘導性遺伝子の中では、好中球の遊走に関与する *CXCL8*, *CXCL5* などの CXC-ケモカイン、*MYOCD*, *CNN1*, *ITGB3* などの migration に関与する遺伝子、*LIF* や *IL1B* など炎症をさらに増幅させる遺伝子、*KIT*, *RELB* などの proto-oncogenes、*IFI44L* や *OAS1*, *RSAD2* などの IFN 誘導性遺伝子、*TNFAIP3* や *FADS2* などの RA リスク SNP 遺伝子の他、*NEFM*, *SCG2*, *NTRK3* などの神経系に関与する遺伝子が見つかった。さらに、ケモカインに焦点を当てたクラスター解析を行い、*CXCL8*, *CXCL5* などに加え、*CCL2* も *TET3* 介在性 TNF 誘導性遺伝子の一つであることが示唆された。

また、TNF (-) or TNF (+)/control siRNA, TNF (-) or TNF (+)/*TET3*-KD の 4 群間で発現に有意差があった遺伝子を用いて、パスウェイ解析を行ったところ、‘TNF signaling’ は 16.1 倍 ( $P = 2.79E-06$ , FDR = 0.003) にエンリッチされ、NOD-like receptor signaling や NF-kappa B signaling、Cytokine-cytokine receptor interaction、Chemokine signaling などエンリッチされ、これらの経路が TNF-*TET3* axis により活性化されることが示唆された (下図)。

### TNF刺激時にTET3の介在によって発現が調節される遺伝子群



(2) 患者由来滑膜組織・培養滑膜細胞における O-GlcNAc トランスフェラーゼ (OGT) の発現、O-GlcNAc 化の状態、炎症性サイトカインによる誘導とその発現調節機構については現在も検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 河邊明男、中野和久、山形薫、阪田圭、中山田真吾、田中良哉
2. 発表標題 関節リウマチ滑膜においてTNFは能動的脱メチル化酵素TET3依存性に軟骨破壊を促進する
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----