

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16207

研究課題名(和文) ヒストンアセチル化酵素による関節リウマチ滑膜細胞の日内リズム調節機構の解明

研究課題名(英文) Role of histone acetyltransferases in modulation of circadian rhythm in rheumatoid arthritis.

研究代表者

吉田 幸祐 (Yoshida, Kohsuke)

神戸大学・保健学研究科・保健学研究員

研究者番号：80452499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の病態形成におけるヒストンアセチル化酵素の役割について、以下の知見を得た。RA滑膜細胞を用いた実験系から、炎症性サイトカインTNFはヒストンアセチル化酵素p300/CBPを増加させることで時計遺伝子Bmal1を増加させた。この現象はp300/CBP阻害剤であるC646を使用することによって抑制された。Bmal1と同じ共通配列を有する炎症性ケモカインCCL2の産生もC646の使用によって抑制され、CCL2による細胞遊走も抑制された。関節炎モデルマウスを用いた実験系から、C646は関節炎の重症化を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は関節リウマチ患者由来滑膜繊維芽細胞において、TNF-による時計遺伝子発現パターンの変調にはヒストンアセチル化酵素が関与している、ことを示した初めての知見である。ヒストンアセチル化酵素阻害薬であるC646は、滑膜細胞の遊走を抑制し関節炎モデルマウスの重症化を抑制させる効果を認めた。これらのことから、ヒストンアセチル化酵素は関節炎の悪化を時計遺伝子を介して軽減することができる可能性が示され、RAの新しい治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We newly found a role of histone acetyltransferases CBP and p300 in rheumatoid arthritis (RA) as follows. In vitro assay using RA-fibroblast like synovial cells, (1) TNF-, a pro-inflammatory cytokine, induced core clock gene Bmal1 through up-regulating Cbp and p300 gene expression. (2) This induction is cancelled by C646, p300/CBP inhibitor. (3) As well as Bmal1, expression of CCL2 gene, a pro-inflammatory chemokine, is suppressed by C646. In vivo assay using collagen-induced arthritis (CIA) mice, (4) C646-treated mice decreased a arthritis score as compared with DMSO-treated one.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：ヒストンアセチル化酵素 時計遺伝子 関節リウマチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis:以下 RA) の諸症状には日内変動が認められ、例えば、炎症性サイトカインや自己抗体の分泌は RA 患者に特有な「朝の関節のこわばり」に一致して午前中にそのピークを形成する。そのため、夜間に副腎皮質ステロイドホルモン剤を服用することは、これら夜間の RA 増悪因子に作用して、早朝の RA 関節炎の症状を抑制する有効な治療とされている。また RA 患者は睡眠障害を訴えることが多く、RA 治療薬の服用によって睡眠障害が改善することが示されている。このように、RA の病態を理解する上で病態の日内変動や個々の患者に特有な日内リズムの変調は重要な位置づけにあることが予想されてはいたが、その詳細は不明であった。

近年、時計遺伝子の発見により疾病における日内リズムの解析が可能となり、関節炎モデルマウスを用いた実験から、私達は関節炎と時計遺伝子との相互的調節を明らかにした。すなわち、健康マウスに関節炎を誘導すると時計遺伝子の発現量や周期が変調すること、また、時計遺伝子 *Cry1/2* を欠損させたマウスに関節炎を誘導した場合、健康マウスに誘導した場合よりも関節炎が悪化することを見出した。しかし、関節炎などの炎症状態がどのようなメカニズムによって滑膜細胞など末梢細胞の日内リズムへ作用しているかは未だ明らかではない。

そこで RA の治療標的である炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ に着目し、時計遺伝子に及ぼす影響を検討したところ、日内リズムを負に制御する時計遺伝子 *Per2* は減少する一方、正に制御する *Bmal1* は増加していた。この現象は、本来ならシーソーのようにバランスをとりながら時計遺伝子群の転写を制御しているはずの転写促進因子と転写抑制因子の関係が $\text{TNF-}\alpha$ によって崩れていることが原因であった。特に *Bmal1* 遺伝子は、転写促進因子 ROR 優位となることで過剰発現していることがわかった。これらのことから、 $\text{TNF-}\alpha$ は RA 滑膜細胞内の日内リズムを亢進させることが示唆される。また、この $\text{TNF-}\alpha$ による時計遺伝子への効果は、細胞内カルシウムイオン流入阻害剤 BAPTA-AM によって抑制され、RA 滑膜細胞の増殖活性も抑制されることがわかった (2014-2015 年度科研費助成課題・若手研究 B)。すなわち、カルシウムシグナル伝達を外部から制御することで、時計遺伝子発現を介して、RA 滑膜細胞の過剰増殖を制御できるのではないかと着想した。

そこでカルシウムシグナルの下流に位置し、ヒストンアセチル化酵素として機能する p300 について転写因子結合予測ソフトを用いて調べてみると、転写促進因子 ROR 遺伝子のプロモーター領域に p300 結合配列が複数個所存在することが予測された。

2. 研究の目的

本研究は、日内リズムを正に制御する *Bmal1* 遺伝子とその転写促進因子 ROR に焦点を当て、炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ による RA 滑膜細胞内の時計遺伝子攪乱機構を明らかにすることを目的とした。特にヒストンアセチル化酵素 p300 は、ROR を介して時計遺伝子 *Bmal1* 発現機構に関与している可能性があり、p300 やそれと協調する CBP (CREB binding protein) が RA 滑膜細胞内の日内リズムを攪乱するキープレイヤー、すなわち RA の治療標的候補となる可能性を探るためのものである。

3. 研究の方法

(1) RA 滑膜細胞を用いた in vitro による研究

手術時に得られた RA 患者由来の滑膜組織を、コラゲナーゼにより単離、培養した初代培養系の滑膜線維芽細胞を使用する。培養継代数が 3~6 継代した滑膜細胞を研究に使用する。以下を行うことにより、 $\text{TNF-}\alpha$ がもたらす時計遺伝子 *Bmal1* とその転写促進因子 ROR α 誘導における、ヒストンアセチル化酵素 p300 の役割を明らかにしようと試みた。

I. 【 $\text{TNF-}\alpha$ によるヒストンアセチル化酵素 p300 または CBP に及ぼす影響の検討】

$\text{TNF-}\alpha$ 刺激により p300 または CBP の mRNA 発現量が増加しているか TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR によって検討した。

II. 【CBP/p300 阻害による $\text{TNF-}\alpha$ 誘導性 ROR 遺伝子発現増加への影響の検討】

CBP/p300 阻害剤である C646 を用いて RA 滑膜細胞を 1 時間前処理し、 $\text{TNF-}\alpha$ による ROR、*Bmal1* の増加が抑制されるか、リアルタイム PCR を用いて検討した。カルシウムシグナルを介しているならば、BAPTA-AM 処理した場合と同様の結果を示すと予想した。siRNA を用いて p300 または CBP、あるいはその両方の遺伝子発現を低下させた RA 滑膜細胞を作製した後、 $\text{TNF-}\alpha$ による ROR、*Bmal1* 遺伝子発現の増加が抑制されるか、リアルタイム PCR を用いて検討した。

III. 【*Bmal1* 遺伝子が RA 滑膜細胞の細胞増殖機構に及ぼす影響の検討】

siRNA を用いて *Bmal1* 遺伝子発現を低下させた RA 滑膜細胞を作製した後、 $\text{TNF-}\alpha$ によるサイクリン E1 の増加が抑制されるか、リアルタイム PCR を用いて検討した。同時に細胞増

殖アッセイを行い、細胞増殖能を評価した。

(2) RA 患者由来血液または関節炎モデルマウスを用いた in vivo による研究

IV.【生物学的製剤；TNF- 阻害剤による治療前後における時計遺伝子に及ぼす影響の検討】

・本申請課題で患者検体の提供を受ける神戸海星病院では、RA 治療薬として生物学的製剤 (TNF- 阻害剤) を投与した前後において、患者血清と末梢血単核球由来 total RNA を採取している。本サンプルを用いて、各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定する。TNF- 阻害剤投与前後の変化を調べることで、生体内における TNF- と時計遺伝子群の関わりを推測できる可能性があるとする。と予想した。

V.【CBP/p300 阻害剤による関節炎モデルマウスへの治療効果と時計遺伝子発現に及ぼす影響の検討】 関節炎の誘導方法は、関節炎に感受性の高い DBA/1J マウスを用いて、コラーゲン誘導性関節炎 (以下 CIA) マウスを選択した。関節炎非誘導群、関節炎誘導群、関節炎誘導 + C646 投与群を作製した。それぞれの群における関節炎スコア (四肢各最高 4 点、合計 16 点)、血清中炎症性サイトカイン濃度、軟骨破壊に直接関与する MMP (マトリックスメタロプロテアーゼ) 3 濃度、を測定した。C646 は、関節炎が出現しはじめる 4 日目に投与を開始する。

4. 研究成果

これまでの研究で、関節リウマチ (RA) 滑膜細胞において、炎症性サイトカイン TNF- による時計遺伝子 Bmal1 発現量の増加は、転写活性因子 ROR の増加と転写抑制因子 Reverb の減少によって起こることを明らかにしている。またこの ROR 増加はカルシウムシグナルを介する経路を通り、Reverb の減少はカルシウムシグナルを介さない経路を通して Bmal1 の増加をもたらすことも見出ししている。

(1) TNF- による Bmal1 遺伝子の攪乱機構におけるヒストンアセチル化酵素の役割；

TNF- 刺激により RA 滑膜細胞内の p300 mRNA 発現量はわずかに増加した一方、p300 と協調して作用する CREB-binding protein (Cbp) 発現量には変化がなかった。また、カルシウムキレート剤である BAPTA-AM を用いて、細胞内カルシウムイオンの流入を阻害した場合、TNF- 刺激によって p300、Cbp とともに mRNA 発現量が有意に低下した。この結果は Bmal1 を調節する転写抑制因子 Reverb の結果と同様のものではあった。このことは細胞内カルシウムイオン濃度によって p300 や Cbp の mRNA 発現量が調節されていることを示すものである。次に、RNA 干渉によって p300 と Cbp 発現量を共に抑制した RA 滑膜細胞を作製し、TNF- 刺激をおこなった。その結果、TNF- 誘導性の Bmal1 増加が抑制された。またこの時の転写抑制因子 Reverb の減少と転写活性因子 ROR の増加も抑制されていた。さらに、p300/CBP 阻害剤である C646 を前処理した場合においても、の結果と同様の現象が確認された。すなわち、TNF- による Bmal1 遺伝子の攪乱機構にヒストンアセチル化酵素が関与していることを、RNA 干渉や阻害剤を用いた実験系から示すことができたと考えられる。

(2) RA 滑膜細胞の増殖機構における Bmal1 遺伝子の役割；

そこで、Bmal1 が RA 滑膜細胞の増殖機構にどのように関与しているかを明らかにするため、細胞調節因子に焦点を当てた。

RNA 干渉実験から、Bmal1 は細胞周期調節因子サイクリン E1 の activator として機能することを明らかにした、しかし Bmal1 遺伝子を発現抑制しただけでは、TNF 誘導性のサイクリン E1 遺伝子発現増加をキャンセルすることはできなかった。実際、Bmal1 を抑制した細胞では、TNF による細胞増殖へは影響しなかった。上記 - により、TNF による細胞増殖誘導は Bmal1 を介さず、別の経路で起こっている、あるいは Bmal1 遺伝子単独を発現抑制するだけでは不十分な可能性が考えられた。

(3) TNF- による炎症性サイトカイン・ケモカインの攪乱機構におけるヒストンアセチル化酵素の役割；

一方、Bmal1 と同様に RORE を有する、あるいは有する可能性が示唆される分子で、かつ RA の病態形成に深く関わる分子として、細胞遊走に關与するケモカイン CCL2、サイトカイン IL6、軟骨破壊に關与する MMP3 にも着目した。これらの分子においても、Bmal1 と同様に p300/CBP を siRNA や阻害剤を用いて抑制すると、TNF による発現誘導が抑制されていた。特に CCL2 については、ROR 阻害剤と Reverb 誘導剤の共投与によっても、TNF による誘導を抑制することができた。さらに CBP/p300 阻害剤が RA 滑膜細胞の遊走能に与える影響を創傷治療アッセイ (スクラッチアッセイ) を用いて検討し、以下の知見を得た。DMSO 前処理をした TNF 刺激培養上清を添加すると、RA 滑膜細胞の遊走数は増加した。この遊走亢進は、CCL2 中和抗体の添加によって抑制された。C646 前処理をした TNF 刺激培養上清を添加した場合も、細胞遊走亢進は抑制されていた。次に、細胞運動の中心的な役割を果たす F-アクチンの重合を確認してみると、DMSO 前処理をした TNF 刺激培養上清を添加した場合、RA 滑膜細胞の F-actin 発現が増加した。この F-actin 発現増加は、CCL2 中和抗体の添加によって抑制された。C646 前処理をした TNF 刺激培養上清を添加した場合も、RA 滑膜細胞の F-actin 発現増加は抑制されて

いた。以上のように、アクチン重合の視点からもスクラッチアッセイと同様の傾向を示していた。

さらに、CBP/p300 阻害剤 (C646) が関節リウマチモデル動物において治療効果を示すか、コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) を用いて検討した。対照群は四肢 16 点満点の関節炎スコアのうち、48 日目時点で平均 8 点ほどの関節炎を示した。対照群と比較して、C646 投与群は同時点で平均 4 点程度と有意に抑制されていた。これら 2 群の血清中サイトカイン濃度を測定してみたが、IL-6、TNF- α 、MMP3 のいずれにおいても明らかな差は認めなかった。また、生物学的製剤投与前後の時計遺伝子発現を比較した結果、一部の時計遺伝子群は疾患活動性と相関していた。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

これまで我々のグループを含め、RA 滑膜細胞において、炎症性サイトカインによって時計遺伝子の発現量が変化することが複数報告されていたが、その詳細は不明であった。今回の研究で、TNF- α による時計遺伝子発現パターンの変調には、ヒストンアセチル化酵素が関与していることが明らかとなり、炎症による日内リズムの攪乱機構の一部が解明されたことになる。実際に、関節炎モデルマウスを用いた実験で用いた C646 は関節炎の重症化を防ぐ効果を認めたため、本研究がヒストンアセチル化酵素を標的とした新たな RA 治療を提示出来る知見となるかもしれない。ただし、C646 が関節炎スコアとしては効果を認めたものの、当初予想していた血清中の炎症性サイトカインやケモカインの産生を抑制しているような結果は認めなかった。再試験や別の関節炎モデルを利用するなどして、C646 による治療効果の詳細を明らかにすることが今後の課題と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kaneshiro K, Yoshida K, Morii K, Oketani Y, Uchida K, Yaekura A, Okumura I, Hashimoto T, Kawasaki Y, Shibamura N, Sakai Y, Hashiramoto A.	4. 巻 30
2. 論文標題 Expressions of circadian clock genes represent disease activities of RA patients treated with biological DMARDs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 293-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1602242.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida K, Nakai A, Kaneshiro K, Hashimoto N, Suzuki K, Uchida K, Hashimoto T, Kawasaki Y, Tateishi K, Nakagawa N, Shibamura N, Sakai Y, Hashiramoto A	4. 巻 495
2. 論文標題 TNF- induces expression of the circadian clock gene Bmal1 via dual calcium-dependent pathways in rheumatoid synovial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1675-1680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.015.	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 奥村郁美、吉田幸祐、金城健太、八重倉愛里沙、桶谷優斗、森井寛太、立石耕司、寺島康浩、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 TNF 誘導性CCL2は転写因子ROR /REV-ERB 、ヒストンアセチル化酵素CBP/p300を介してRA滑膜細胞の遊走に關与する
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥村郁美、吉田幸祐、金城健太、内田京、八重倉愛里沙、桶谷優斗、森井寛太、立石耕司、寺島康浩、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 RA滑膜細胞におけるTNF 誘導性CCL2発現増加に対するヒストンアセチル化酵素と転写因子ROR /REV-ERB の役割
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森井寛太、桶谷優斗、金城健太、内田京、奥村郁美、八重倉愛里沙、吉田幸祐、川崎善子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 生物学的製剤治療が関節リウマチ患者白血球における時計遺伝子発現を変動させる
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内田京、吉田幸祐、金城健太、中井綾子、鈴木行人、橋本哲平、川崎善子、立石耕司、寺島康浩、中川夏子、柴沼均、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1は細胞周期調節因子を介して関節リウマチ滑膜細胞の増殖能を制御する
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中井綾子、吉田幸祐、橋本哲平、金城健太、橋本尚憲、鈴木行人、内田京、川崎善子、中川夏子、柴沼均、立石博臣、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 TNF はヒストンアセチル化酵素を介してRA滑膜細胞内の時計遺伝子Bmal1発現を調節する
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内田京、吉田幸祐、橋本哲平、金城健太、中井綾子、橋本尚憲、鈴木行人、立石耕司、中川夏子、柴沼均、立石博臣、酒井良忠、柱本照
2. 発表標題 時計遺伝子が滑膜細胞の細胞周期を調節する
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ikumi Okumura, Kohsuke Yoshida, Ayako Nakai, Kenta Kaneshiro, Koto Uchida, Arisa Yaekura, Yuto Oketani, Kanta Morii, Koji Tateishi, Yasuhiro Terashima, Yoshiko Kawasaki, Nao Shibamura, Yoshitada Sakai, Akira Hashiramoto.
2. 発表標題 Roles Of Histone Acetyltransferases CBP/p300 And Transcriptional Factor ROR /REV-ERB Against TNF -induced CCL2 Expression in RA-FLSs
3. 学会等名 2019 American College of Rheumatology (国際学会)
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	柱本 照 (Hashiramoto Akira)	神戸大学・大学院保健学研究科・教授 (14501)	
研究協力者	柴沼 均 (Shibanuma Nao)	神戸海星病院・整形外科・副院長	
研究協力者	中川 夏子 (Nakagawa Natsuko)	兵庫県立加古川医療センター・リウマチ膠原病センター・センター次長兼リウマチ科部長・整形外科部長	