

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17929

研究課題名(和文) エピゲノム制御因子Uhrf1の関節リウマチ病態における機能解析

研究課題名(英文) Investigation of physiological functions of epigenetic regulator Uhrf1 in rheumatoid arthritis

研究代表者

佐伯 法学 (SAEKI, NORITAKA)

愛媛大学・学術支援センター・助教

研究者番号：80791607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチは難治性の慢性炎症性疾患であり、既存薬より効果的な治療薬の開発が強く望まれている。我々は、新規治療標的の手がかりを見つけるため、関節リウマチ患者に認められるエピジェネティック(DNA塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節)の異常に着目し、研究を遂行した。その結果、関節炎組織の滑膜線維芽細胞ではエピジェネティック制御因子Uhrf1の発現が上昇し、炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現を制御することで関節炎病態を抑制していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、関節リウマチ治療において生物学的製剤が奏功しているが、これらは単一の増悪因子に対する阻害剤であり、十分な効果が認められないケースも報告されている。これまでの研究成果より、滑膜線維芽細胞に発現するUhrf1はいくつかの関節リウマチ増悪因子の発現を網羅的に制御している可能性が示唆されている。関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞でUhrf1発現を上昇させる、あるいは安定化させることができれば、既存の治療薬よりも高い効果が得られるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In rheumatoid arthritis, epigenetic regulatory mechanisms in synovial cells are largely unknown. We have tried to explore epigenetic regulator and its molecular functions that contribute to the progression of rheumatoid arthritis. We found that epigenetic regulator Uhrf1 was significantly increased in arthritis tissue and expressed in synovial fibroblasts. In addition, our results indicated that Uhrf1 in synovial fibroblasts suppressed expressions of cytokines-related genes and regulated arthritis progression negatively.

研究分野：病態生理学

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 エピジェネティクス Uhrf1 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチは難治性の慢性炎症性疾患である。生物学的製剤による治療が奏功しているが、より効果的な治療法の開発は現在も強く望まれている。近年、関節リウマチの滑膜細胞におけるエピジェネティック異常 (DNA 低メチル化やヒストン高アセチル化) が報告されているが、制御機構は大部分が不明である。我々は、関節リウマチ解析モデルとして頻用される Collagen Antibody-Induced Arthritis (CAIA) マウスを作製し、関節組織のマイクロアレイと qPCR による確認実験を行ったところ、関節炎組織において転写に関わる分子のうち Uhrf1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1) の mRNA 発現が高いレベルで上昇していることを見出した。Uhrf1 は DNA の維持メチルに重要な分子として知られるが、生体内機能は大部分が不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、関節炎モデルマウスを用いて関節炎病態における Uhrf1 の発現と生体内機能について明らかにし、新規治療法の開発の手がかりを探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 関節炎モデルマウスの作出

Collagen Antibody-Induced Arthritis (CAIA): C57BL/6 マウスに anti-type collagen antibody cocktail を腹腔内投与し、3 日後に LPS を腹腔内投与した。

K/BxN serum transfer arthritis (K/BxN STA): KRN/B マウス (TCR の Transgenic マウスを C57BL/6 に戻し交配) と NOD マウスを交配し、関節炎を自然発症する K/BxN マウスを得た。K/BxN マウスの血清をプールし、C57BL/6 系統マウスに 0 日目と 3 日目に K/BxN 血清を腹腔内投与した。

#### (2) マウス滑膜細胞の初代培養

CAIA および K/BxN STA の誘導により腫脹した関節炎組織を collagenase 処理し、滑膜細胞を得た。さらに、コラーゲンコートディッシュへの接着性とトリプシンの反応性から、形態的に異なる 2 つの細胞集団を分離した。分離した各細胞集団について、RT-qPCR で滑膜線維芽細胞マーカーとマクロファージマーカーの mRNA 発現を調べた。

#### (3) Uhrf1 発現解析

関節炎組織: CAIA および K/BxN STA の誘導 10 日目の後肢をサンプリングし、total RNA を抽出した。RT-qPCR で Uhrf1 mRNA の発現を調べた。

ヒト臨床サンプル解析: Gene Expression Omnibus (GEO) に登録された、ヒト滑膜バイオプシーから採取した mRNA を用いた RNA-seq のデータ (GSE89408) を独自に再解析し UHRF1 mRNA の発現を調べた。

免疫組織学的解析: Rosa26-EGFP マウスと Col6a1-Cre (滑膜線維芽細胞特異的 Cre 発現) マウスおよび LysM-Cre (マクロファージ特異的 Cre 発現) マウスを交配し、滑膜線維芽細胞レポーターマウスとマクロファージレポーターマウスを作成した。レポーターマウスに K/BxN STA を誘導し、腫脹した後肢の組織標本を作成した。Anti-GFP antibody, Anti-Uhrf1 antibody と DAPI を用いて免疫蛍光染色をした。

初代培養滑膜細胞: 滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージの培養液中に炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL17, TNFSF11, CSF1 や CSF2 を加えて 24 時間培養しサンプリングした。total RNA を抽出し RT-qPCR で Uhrf1 mRNA 発現を調べた。

#### (4) 関節炎病態における Uhrf1 の生体内機能

Uhrf1<sup>fl/fl</sup> マウスと Col6a1-Cre マウスおよび LysM-Cre をそれぞれ交配し、Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre (滑膜線維芽細胞特異的 Uhrf1 欠損) マウスおよび Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; LysM-Cre (マクロファージ特異的 Uhrf1 欠損) マウスを作成した。作出した Uhrf1 欠損マウスと同腹仔の対照 (Uhrf1<sup>fl/fl</sup>) マウスに CAIA および K/BxN STA を誘導し、後肢の幅と臨床スコアを 10 日間モニタリングした。さらに、関節炎誘導 10 日目の後肢をサンプリングして組織標本を作成した。Safranin O/Fast green 染色と Trap 染色を行い、組織学的解析を行なった。

#### (5) 関節炎病態における Uhrf1 の分子機構

Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre マウスと Uhrf1<sup>fl/fl</sup> マウスに K/BxN STA を誘導し、4 日後の関節炎組織から初代滑膜線維芽細胞を採取した。この細胞から得られた mRNA を使用して RNA-seq を実施した。

#### (6) Uhrf1 の発現調節機構

DNase-seq のデータベース情報 (ChIP-Atlas, <https://chip-atlas.org/>) からヒトとマウスで相同性の高い Uhrf1 の候補プロモーター領域を選択し、DNA 配列情報を用いた Motif discovery 解析 (JASPAR, [jaspar.genereg.net/](http://jaspar.genereg.net/)) により候補転写因子を抽出した。HEK293 細胞を用いた Luciferase によるレポーターアッセイを行い、候補転写因子が候補プロモーター領域に対して活性を持つか検証した。

#### 4. 研究成果

(1) マウス滑膜細胞の初代培養：マウス関節炎組織から採取した滑膜細胞を培養し、細胞の接着性を利用して形態的に線維芽細胞様とマクロファージ様の細胞がリッチな集団を分離した。それぞれの細胞集団から total RNA を抽出し RT-qPCR でマクロファージマーカー (CD68, Emr1, ItgaM, LysM, Csf1r) と滑膜線維芽細胞マーカー (CDH11, Vcam1, Col6a1, Csf1) の mRNA 発現を調べたところ、マクロファージ様細胞は線維芽細胞様細胞と比較してマクロファージマーカーの発現が有意に高く、滑膜線維芽細胞マーカーの発現が有意に低かった。一方、線維芽細胞様細胞はマクロファージ様細胞と比較して滑膜線維芽細胞マーカーの発現が有意に高く、マクロファージマーカーの発現が有意に低かった (図 1)。以上より、得られた細胞は滑膜組織由来マクロファージと滑膜線維芽細胞リッチな細胞集団であると考えられた。

#### (2) Uhrf1 発現解析

当該研究室で得られているマイクロアレイの結果を検証するために RT-qPCR で Uhrf1 mRNA 発現を検証した。CAIA および K/BxN STA の関節炎組織から得られた total RNA を用いて RT-qPCR を行い、Uhrf1 mRNA 発現を調べたところ、対照マウスの関節組織と比較して関節炎組織で Uhrf1 mRNA 発現が有意に上昇していた (図 2)。また、GEO に登録された RNA-seq のデータを独自に再解析したところ、正常滑膜や変形性関節症滑膜と比較して関節リウマチ滑膜では UHRF1 mRNA の発現が有意に上昇していた。関節炎を誘導した滑膜線維芽細胞レポーターマウスとマクロファージレポーターマウスから後肢をサンプリングして組織標本を作成し免疫染色を行なった。両方のレポーターマウスの滑膜炎組織において、GFP 陽性細胞の核に Uhrf1 の局在が認められた。また、初代培養滑膜細胞の Uhrf1 mRNA 発現を調べたところ、滑膜線維芽細胞の Uhrf1 mRNA は滑膜マクロファージと比較して有意に高いことが明らかとなった。さらに、培養液中に炎症性サイトカインを添加したところ、滑膜線維芽細胞の Uhrf1 mRNA は対照と比較して、TNF $\alpha$  添加で有意に発現上昇し、IL17 添加で有意に発現減少した。滑膜マクロファージの Uhrf1 mRNA は対照と比較して、TNF $\alpha$ 、TNFSF11 および CSF2 添加で有意に発現上昇した。以上より、Uhrf1 は滑膜炎組織において少なくとも滑膜線維芽細胞とマクロファージに発現することが明らかとなり、炎症性サイトカインによって発現が変動することが示唆された。

#### (3) 関節炎病態における Uhrf1 の生体内機能

*Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre* マウスおよび *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; LysM-Cre* マウスを作成し、CAIA および K/BxN STA を誘導した。後肢の腫脹と臨床スコアを 10 日間モニタリングしたところ、*Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre* マウスは同腹仔の *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較して有意に後肢の腫脹と臨床スコアが悪化することが判明した (図 3 上)。一方、*Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; LysM-Cre* マウスは同腹仔の *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較して、関節炎の程度に有意な差は認められなかった。関節炎誘導 10 日目の *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre* マウスおよび *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>* マウスの後肢を組織学的に解析したところ、滑膜の厚みおよび後肢組織における Trap 陽性領域の割合は *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>* マウスと比較して *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre* マウスで顕著だった (図 3 下)。

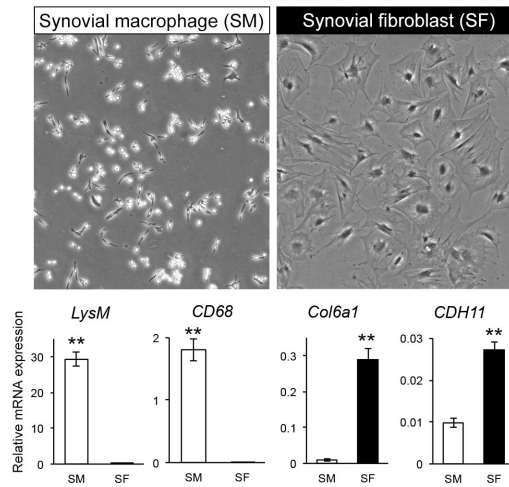


図 1. マウス由来滑膜細胞の初代培養法の確立

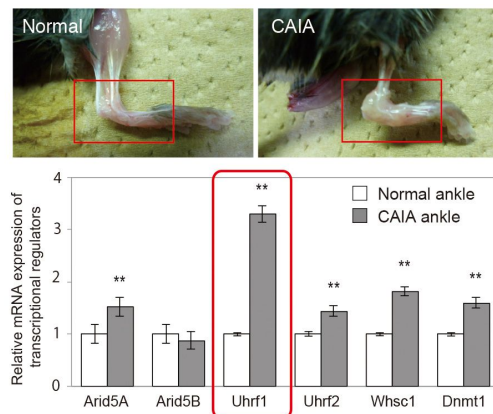


図 2. 関節炎組織における転写調節因子の mRNA 発現

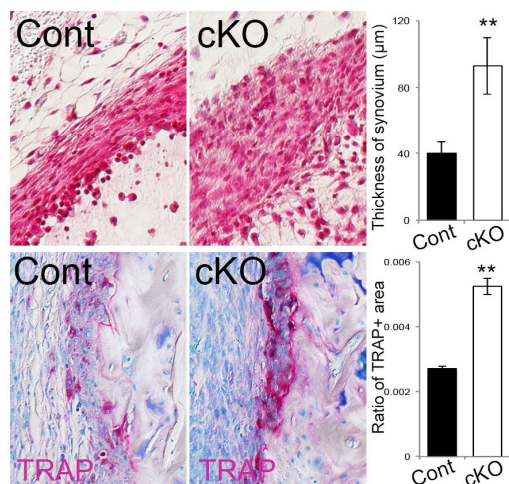
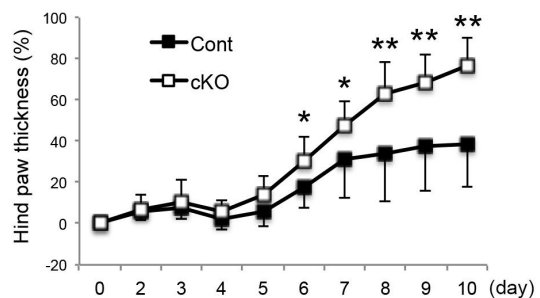


図 3. 滑膜線維芽細胞特異的 Uhrf1 欠損マウスの関節炎に対する表現系



以上より、滑膜線維芽細胞に発現する Uhrf1 は関節炎病態を負に制御していることが明らかになった。

#### (4) 関節炎病態における Uhrf1 の分子機構

K/BxN STA を誘導した *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre* マウスと *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>* マウスから初代滑膜線維芽細胞を採取し、RNA-seq を実施した。*Uhrf1<sup>fl/fl</sup>* 細胞と比較して *Uhrf1<sup>fl/fl</sup>; Col6a1-Cre* 細胞では 171 遺伝子が 2 倍以上有意に発現上昇し、89 遺伝子が 1/2 以下に有意に発現減少していた ( $p < 0.05$ )。発現上昇していた遺伝子群で KEGG パスウェイ解析を行うと「Rheumatoid arthritis (TNFSF11, CCL20, ACP5, ANGPT1, H2-AB1, CCL5, IL1A)」や「Cytokine-cytokine receptor interaction (CSF3, IL12RB1, TNFSF11, IL18RAP, CCL20, CXCR6, CCL5, IL1A)」に分類される遺伝子が高いレベルで有意に変動していた。

#### (5) Uhrf1 の発現調節機構

In silico で、Uhrf1 の候補プロモーター領域 (領域 A, B) と候補転写因子 (Nfya, Arnt, Hif1a, Sp1) を抽出した (図 4 a)。HEK293 細胞を用いて、Luciferase Reporter Assay を行なったところ、Nfya は領域 A および B において転写活性を持つことを明らかにした (図 4 b, c)。Arnt, Hif1a, Sp1 に関しては現在解析中である。

#### (6) 総括

(1)-(5)より、滑膜線維芽細胞に発現する Uhrf1 は炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現を網羅的に負に制御し、関節リウマチ病態のネガティブフィードバック機構に関与していると考えられる。関節リウマチ患者における滑膜線維芽細胞の UHRF1 発現を上昇させる、あるいは安定化させることができれば、既存の治療薬よりも高い効果が得られる可能性がある。今後、滑膜線維芽細胞に発現する Uhrf1 の分子機構をより詳細に調べる必要がある。

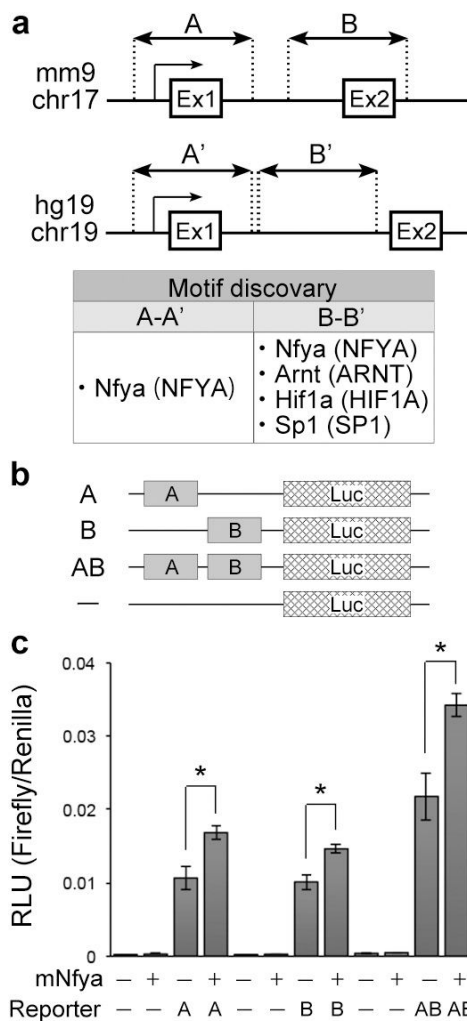


図4. (a) In silicoで導き出したUhrf1の候補プロモーター領域と転写因子, (b) 作成したレポーターコンストラクト, (c) マウスNfya発現ベクターによるレポーターアッセイ (HEK293細胞)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件, 全て査読あり)

- (1) Yanagihara Y, Inoue K, Saeki N, Sawada Y, Yoshida S, Lee J, Iimura T, Imai Y  
Zscan10 suppresses osteoclast differentiation by regulating expression of Haptoglobin.  
*Bone*, 2019 Feb 13;122:93-100. doi: 10.1016/j.bone.2019.02.011.
- (2) Yamashita M, Inoue K, Saeki N, Ideta-Otsuka M, Yanagihara Y, Sawada Y, Sakakibara I, Lee J, Ichikawa K, Kamei Y, Iimura T, Igarashi K, Takada Y, Imai Y  
Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression.  
*Development*, 2018 Jan 8;145(1). pii: dev157412. doi: 10.1242/dev.157412.

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Epigenetic regulator Uhrf1 suppresses progression of arthritis in CAIA mouse model  
Noritaka Saeki, Kazuki Inoue, Yuuki Imai  
International Federation of Musculoskeletal Research Societies 3rd Herbert Fleisch Workshop  
2019年3月17日
- (2) エピゲノム制御因子 Uhrf1 は筋分化を正に制御する  
沢田雄一郎, 菊川忠彦, 飯尾浩之, 酒井大史, 榊原伊織, 小野悠介, 柳原裕太, 佐伯法学, 雑賀隆史, 今井祐記  
第6回若手による骨格筋細胞研究会 2018年11月12日
- (3) Epigenetic regulator, Uhrf1, positively controls skeletal muscle differentiation  
Yuichiro Sawada, Tadahiko Kikugawa, Iori Sakakibara, Yusuke Ono, Yuta Yanagihara, Noritaka Saeki, Hiroyuki Iio, Takashi Saika, Yuuki Imai  
The American Society for Bone and Mineral Research 2018 Annual Meeting 2018年9月28日

- (4) Epigenetic regulator Uhrf1 suppresses progression of arthritis in CAIA mice model  
Noritaka Saeki, Kazuki Inoue, Yuuki Imai  
プロテイン・アイランド松山 2018 国際シンポジウム 2018 年 9 月 12 日
- (5) エピゲノム制御因子 Uhrf1 は筋分化を正に制御する  
沢田雄一郎, 榊原伊織, 柳原裕太, 佐伯法学, 菊川忠彦, 雑賀隆史, 小野悠介, 今井祐記  
第 36 回日本骨代謝学会学術集会 2018 年 7 月 26 日
- (6) エピジェネティック制御因子 Uhrf1 は関節炎病態の抑制に働く  
佐伯法学, 今井祐記, 井上和樹  
第 36 回日本骨代謝学会学術集会 2018 年 7 月 26 日
- (7) 骨格筋におけるエピゲノム制御因子 Uhrf1 の機能解析  
沢田雄一郎, 榊原伊織, 小野悠介, 柳原裕太, 佐伯法学, 菊川忠彦, 雑賀隆史, 今井祐記  
第 3 回日本筋学会学術集会 2017 年 8 月 4 日
- (8) エピゲノム制御因子 Uhrf1 による DNA メチル化制御を介した軟骨分化・骨格形成  
山下美智子, 井上和樹, 佐伯法学, 榊原伊織, 李智媛, 大塚まき, 亀井義明, 五十嵐勝秀, 高田泰次, 飯村忠浩, 今井祐記  
第 35 回日本骨代謝学会学術集会 2017 年 7 月 27 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〕

IFMRS 3rd Herbert Fleisch Workshop Travel Award, 2019 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：今井祐記

ローマ字氏名：Imai Yuuki

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。