

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18H02846
研究課題名（和文）関節リウマチ滑膜線維芽細胞における炎症メディエーター産生エピゲノム機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of epigenetic structure responsible for inflammatory mediator production from rheumatoid arthritis synovial fibroblast

研究代表者
藤尾 圭志（FUJIO, KEISHI）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70401114
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,000,000円

研究成果の概要（和文）：滑膜線維芽細胞（SFs）は、IL-6に代表される炎症メディエーターを高発現することで、関節リウマチ（RA）の滑膜炎の惹起と持続に寄与する。本課題において申請者は、SFsからの炎症メディエーターの遺伝子発現とクロマチン構造変化および疾患感受性多型の関連を、世界に先駆けてカタログ化した。更に、統合的機能ゲノム解析を通じて、複合的な炎症環境下におけるSFsのクロマチン構造変化が、RAの疾患感受性やIL-6の発現亢進と関連することを明らかにした。また、この病的な構造形成に重要な転写因子コンプレックスを同定し、その構成因子であるMTF1が関節炎形成にかかわることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年登場した生物学的製剤や分子標的薬により、RAの治療は大きく発展したが、これら薬剤の効果が十分に得られない患者の存在や、全身的な免疫抑制が原因の重篤な有害事象が、治療を行う上で臨床的課題となっている。本研究では、関節局所に存在し、炎症や骨軟骨破壊を担うSFsに着目することで、統合的機能ゲノム解析によりRAの遺伝素因と関連する新たな創薬標的を同定した。本知見は、既存の薬剤とは全く異なる経路を介した、より全身的な免疫抑制作用の少ない治療開発につながる可能性を内包している。

研究成果の概要（英文）：Synovial fibroblasts (SFs) contribute to the induction and persistence of synovitis in rheumatoid arthritis (RA) by highly expressing inflammatory mediators represented by IL-6. In this research, the applicant was the first in the world to catalog the relationship between gene expression of inflammatory mediators from SFs and chromatin structural changes and disease susceptibility polymorphisms. Moreover, through integrated functional genome analysis, it was clarified that chromatin structural changes in SFs under a complex inflammatory environment are associated with RA susceptibility and high expression of IL-6. The applicant also identified a transcription factor complex crucial for this pathological structure formation and clarified that its constituent, MTF1, is involved in arthritis formation.

研究分野：アレルギー・リウマチ学

キーワード：関節リウマチ 遺伝素因 エピゲノム修飾

1. 研究開始当初の背景

RA の関節炎では、TNF- α が滑膜線維芽細胞に作用することによる IL-6 や MMP3 などの炎症メディエーター産生が重要と考えられている。誘導された IL-6 は滑膜線維芽細胞自体に作用し、破骨細胞分化を誘導する RANKL が発現し骨破壊に至ることが分かっている。しかしながら TNF- α 阻害療法、IL-6R 阻害療法とも RA の約半数では高い有効性を示すが、残りの約半数では効果は不十分であり、TNF- α による滑膜線維芽細胞への作用はより複雑で他の要素も関連していると考えられる。申請者らは滑膜線維芽細胞に TNF- α を単独で作用させても、IL-6 や MMP3 などの炎症メディエーターの mRNA 発現は限定的であるが、TNF- α と複数のサイトカインを組み合わせることで、大量の mRNA 発現につながることを見出した。TNF- α と複数のサイトカインを組み合わせた場合には、IL-6 や MMP3 の mRNA 発現が著明に亢進し、エンハンサー領域のオープンクロマチンが拡大することを見出した。実際にエンハンサー領域のオープンクロマチン形成に重要な p300 を阻害すると、滑膜線維芽細胞からの IL-6 産生が著明に抑制された。さらにマウスのコラーゲン誘発性関節炎の関節炎発症後に p300 阻害剤を投与すると、関節炎の進行が有意に抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

上記知見は、TNF- α だけでなく複数の炎症性サイトカインが協働することにより、滑膜線維芽細胞の炎症メディエーター産生を惹起するようなエピゲノム修飾を形成していることを示している。エピゲノム修飾は細胞及び組織特異性が高く、このような滑膜線維芽細胞のエピゲノムを標的とすることで、炎症メディエーター産生を特異的に制御できる可能性がある。実際に複数サイトカイン刺激時にのみ発現が亢進し、かつ出現するオープンクロマチン領域に結合配列がある転写因子の中に脂肪細胞分化のマスター転写因子 KLF14 が含まれているが、KLF14 は末梢血リンパ球ではほぼ全く発現していない。このことは、RA 滑膜線維芽細胞の複数サイトカイン刺激時の炎症メディエーター遺伝子領域に細胞特異的なエピゲノム修飾が形成されるところを示唆している。本研究では、各条件のトランスクリプトームデータ、ChIP-seq データと遺伝子多型データを用いて、炎症メディエーター産生に重要な転写因子やアダプター分子を同定し、機能を解析する。そしてそのようなエピゲノム修飾を構成する蛋白複合体の阻害方法を検討することで、RA の滑膜線維芽細胞を標的とする新規治療法開発の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

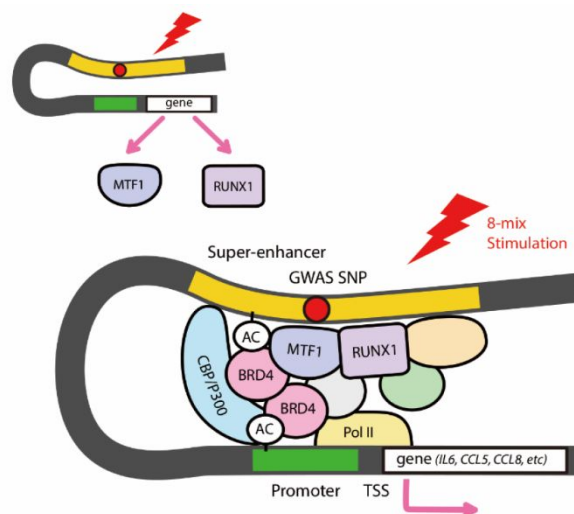
RA30 例、OA30 例の滑膜線維芽細胞を各種サイトカインで刺激し、刺激条件毎のトランスクリプトーム、H3K27ac、H3K4me1、H3K4me3 の ChIP-seq によるオープンクロマチン情報を解析した。RA の GWAS-SNP の刺激滑膜線維芽細胞のエピゲノム修飾へエンリッチメントを評価した。また上記データセットにて eQTL 解析を行った。8 種類の 9 サイトカインを組み合わせた 8-mix 条件で誘導されるスーパーエンハンサーを同定し、Hi-C によりスーパーエンハンサーとプロモーターが結合する遺伝子を同定した。

4. 研究成果

RA の GWAS-SNP は IFN- γ 、IFN- β 、8-mix 刺激時のスーパーエンハンサーに集積していた。上記データセットの eQTL 解析により RA GWAS-SNP のうち 13 が、滑膜線維芽細胞で eQTL 効果を発揮することを見出した。特に CD40 近傍の RA GWAS-SNP は IFN- γ と 8-mix 刺激時に CD40 に eQTL 効果を発揮し、B 細胞では eQTL 効果を発揮しなかった。8 種類のサイトカインを組み合わせた 8-mix 条件で誘導されるスーパーエンハンサーを同定し、Hi-C によりスーパーエンハンサーとプロモーターが結合する遺伝子を同定したところ、MTF1 や RUNX1 などの転写因子、IL-6 などのサイトカイン、ケモカインが含まれていた。とくに RA 感受性遺伝子である MTF1 と RUNX1 が含まれていたことは注目すべきと考えられた。8-mix で誘導されるスーパーエンハンサーの結合配列を調べると、MTF1 の結合配列が濃縮されていた。そこで MTF1 のノックダウンを行うと、滑膜線維芽細胞においてスーパーエンハンサーと結合する遺伝子の遺伝子発現が抑制され、MTF1 は刺激滑膜線維芽細胞のスーパーエンハンサー構造を制御していると考えられた。実際に MTF1 阻害薬は、試験管内での滑膜線維芽細胞からの IL-6, CCL5 の産生を抑制し、マウス関節炎を改善させた。

本課題において申請者は、SFs からの炎症メディエーターの遺伝子発現とクロマチン構造変化および疾患感受性多型の関連を、世界に先駆けてカタログ化した。更に、統合的機能ゲノム解析を通じて、複合的な炎症環境下における SFs のクロマチン構造変化が、RA の疾患感受性や IL-6 の発現亢進と関連することを明らかにした。また、この病的な構造形成に重要な転写因子コンプレックスを同定し、その構成因子である MTF1 が関節炎形成にかかわることを明らかにした。

近年登場した生物学的製剤や分子標的薬により、RA の治療は大きく発展したが、これら薬剤の効果が十分に得られない患者の存在や、全身的な免疫抑制が原因の重篤な有害事象が、治療を行う上で臨床的課題となっている。本研究では、関節局所に存在し、炎症や骨軟骨破壊を担う SFs に着目することで、統合的機能ゲノム解析により RA の遺伝素因と関連する新たな創薬標的を同定した。本知見は、既存の薬剤とは全く異なる経路を介した、より全身的な免疫抑制作用の少ない治療開発につながる可能性を内包している。



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 Tsuchiya H, Ota M, Fujio K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Multiomics landscape of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-021-00157-8.	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 -

1. 著者名 Tsuchiya H, Ota M, Sumitomo S, Ishigaki K, Suzuki A, Sakata T, Tsuchida Y, Inui H, Hirose J, Kochi Y, Kadono Y, Shirahige K, Tanaka S, Yamamoto K, Fujio K.	4. 巻 epub
2. 論文標題 Parsing multiomics landscape of activated synovial fibroblasts highlights drug targets linked to genetic risk of rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis.	6. 最初と最後の頁 epub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2020-218189.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 土屋遙香、太田峰人、住友秀次、藤尾圭志
2. 発表標題 関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞の統合的機能ゲノム解析
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keishi Fujio, Haruka Tsuchiya, Mineto Ota, Shuji Sumitomo
2. 発表標題 Synovial fibroblast eQTL and differential expressed genes
3. 学会等名 11th International Forum on Rheumatoid Arthritis（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 KEISHI FUJIO
2. 発表標題 Functional Genomics analysis of synovial fibroblast from rheumatoid arthritis
3. 学会等名 日本免疫学会シンポジウム(国際学会)
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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関