

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：37116
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K08925
研究課題名(和文) CD4陽性T細胞のスーパーエンハンサー異常に起因する画期的な関節リウマチ病態形成

研究課題名(英文) A novel pathogenesis of rheumatoid arthritis due to dysregulated super-enhancer in CD4-positive T cells

研究代表者
山形 薫 (YAMAGATA, KAORU)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：80533786
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： UBASH3Aの発現について、関節リウマチ(RA)患者の CD4+T細胞では、健常人の CD4+T細胞より低かった。RA患者では、抑制型転写因子であるBACH2がCD4+T細胞のUBASH3A遺伝子座に集積したが、健常人では逆の現象が観察された。CD4+T細胞膜のT細胞受容体を刺激するとIL-6が産生されるが、UBASH3Aの過剰発現はその産生を有意に抑制した。以上より、RA患者由来のCD4+T細胞にて、SEのエピジェネティック制御によるUBASH3A発現量の低下は、TCRシグナルの過剰な活性化を経て、IL-6の産生を亢進させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ(RA)の患者においてT細胞が活性化しており、RA病態への機能的関与が予想されている。しかし、依然として病態の形成過程と進展過程を担う基盤について不明な点が多い。我々は、CD4+T細胞で高発現するUBASH3Aがリウマチで発現異常を示し、炎症と関わり、そしてRAの病態進展を担うことを解明した。

研究成果の概要(英文)： UBASH3A mRNA and protein expression was lower in CD4+ T cells from RA patients than in those from healthy donors. UBASH3A mRNA levels were reduced by eRNA_1 and eRNA_3 knockdown. In RA patients, BTB and CNC homology 2 (BACH2), the silencing transcription factor, accumulated at the UBASH3A loci in CD4+ T cells, whereas the SE-defining factor, mediator complex subunit 1 (MED1)/bromodomain 4 (BRD4), did not. However, opposite phenomena were observed in healthy donors. Although stimulation of TCRs expressed on CD4+ T cells from RA patients led to interleukin (IL)-6 production, UBASH3A over-expression significantly inhibited its production. In conclusion, we found that transcription of UBASH3A is suppressed via epigenetic regulation of SE in CD4+ T cells from RA patients. Decreased UBASH3A levels lead to excessive activation of TCR signaling, resulting in enhanced production of IL-6.

研究分野：リウマチ内科学

キーワード：関節リウマチ CD4陽性T細胞 スーパーエンハンサー UBASH3A BACH2 eRNA ChIP

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、滑膜炎と進行性の関節破壊を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。RA の病態は、関節液における腫瘍壊死因子 (TNF) -、インターロイキン (IL) -6、IL-1、マトリックスメタロプロテアーゼ 3 などの過剰産生、滑膜におけるリンパ球の浸潤により同様に特徴付けられる。特に異所性で過剰産生する IL-6 は、T ヘルパー17 (Th17) 細胞と制御性 T 細胞 (Treg) の間の不均衡、自己抗体の過剰産生、全身性炎症、関節破壊など、RA の病態を進展させる重要な因子である。これらの因子が RA 病態形成を担うため、その阻害薬が臨床で使用されている。このような阻害薬の使用により RA の寛解を経験する患者がいる一方で、寛解に至らない、または再発を経験する患者もあり、RA の病態形成および進行を担うドライバーの特定はまだ限定的であるといえる。

リウマチの分野では、大規模コホートにおけるゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、すでに 101 種類の感受性遺伝子座の一塩基多型 (SNPs) が同定されている。一般に、疾患に関連する SNPs の多くは、タンパク質をコードする領域ではなく、非コード領域に位置している。重要なことは、RA に感受性のある SNPs のほとんどがエンハンサー領域にマッピングされていることである。典型的なエンハンサーと比較して、個々のエンハンサーからなる大きなエンハンサー集団であるスーパーエンハンサー (SE) には、3.2 倍もの RA 感受性 SNP が存在しており、これらの SNP は SE を介した転写調節と強く関連していると考えられる。驚くべきことに、RA 感受性 SNP の 26% (27/101) が CD4⁺ T 細胞の活性化した SEs 領域内に位置している。SE は、グローバルな遺伝子制御を担うことにより、細胞のアイデンティティを定義する極めて重要なエンハンサーとして機能する。しかし、RA の病態形成における SE の役割について未解明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、SE の活性変化により RA に感受性のある遺伝子群の発現に影響することで、RA 発症の原因になっていると仮説を立てた。我々は SE の統合的なデータベース (dbSUPER)、GWAS、Bio Gene Portal System (BioGPS) など複数のデータベースを用いた大規模 *in silico* 解析を行い、SE の制御を受ける遺伝子群と関節リウマチ (RA) に感受性のある遺伝子群のいずれにも関連する遺伝子として ubiquitin-associated and SH3 domain-containing protein A (UBASH3A) 遺伝子を見出した。そこで、CD4⁺ T 細胞における UBASH3A の発現制御機構、RA における発現様式、そして RA 病態形成における機能的役割について解明し、リウマチの新たな治療標的を見出すことを目的とする。

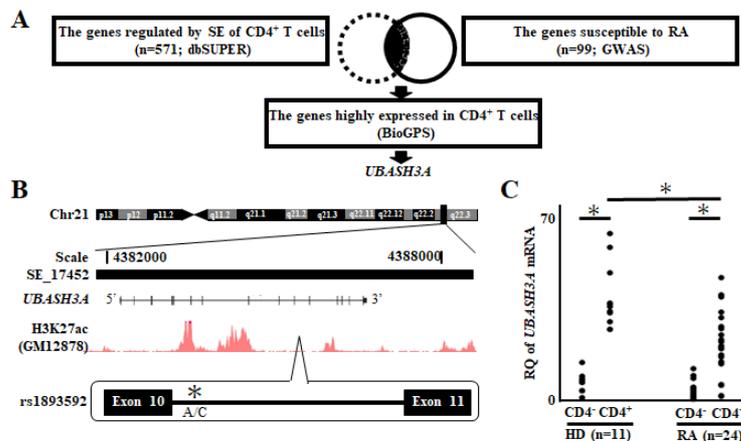


図1. *in silico*解析によるUBASH3A遺伝子の抽出、およびRA患者と健康人のCD4⁺T細胞における発現様式

3. 研究の方法

(1) CD4⁺ T 細胞で発現する RA に感受性のある遺伝子の探索

RA に感受性のある遺伝子を抽出するために 3 つの公開データベースに着目する。1) GWAS 研究により疾患感受性 SNP を内部または近傍に有する遺伝子群がまとめられている。2) dbSUPER は細胞種別に活性化される SE の種類、大きさそして位置をまとめた統合的なデータベースである。3) BioGPS はマイクロアレイを行い細胞種別に各種 mRNA の発現プロファイリングを纏めたデータベースである。各群において共通し、RA に感受性のある候補遺伝子として UBASH3A を見出している。

(2) RA 患者の CD4⁺ T 細胞における UBASH3A の発現様式

健康人 (n=11) と RA 患者 (n=24) の末梢血単核球 (PBMC) を CD4⁺ T 細胞と CD4⁻ 細胞に分離し、UBASH3A mRNA 発現を RT-qPCR 法で定量する。また健康人 (n=3) と RA 患者 (n=3) 由来の PBMC を分離後、準備された CD4⁺ T 細胞から全細胞抽出液を準備し、ウェスタンブロッティング法にて UBASH3A タンパク質量を比較する。さらに rs1893592-A/C の遺伝子型に応じて RA 患者 (n=14) の CD4⁺ T 細胞における UBASH3A mRNA の発現様式を明らかにする。

(3) *UBASH3A*-SE から発現するエンハンサーRNAの同定と解析

リンパ球芽腫細胞株 GM12878 内の SE 領域(SE_17452)における 27 番目のリジン残基のアセチル化を含むヒストン H3(H3K27ac; SE のマーカー)分布のピークから発現する enhancer RNAs (eRNAs)に着目する。つぎに cDNA の増幅に必要な特異的プライマーを設計する。また各領域のセンス鎖とアンチセンス鎖を標的にする locked nucleic acid (LNA)を設計する。そして各 LNA を CD4⁺ T 細胞株である Jurkat 細胞に導入し、各 eRNA のノックダウンを確認する。その後、*UBASH3A* 遺伝子の発現を RT-qPCR 法で調べ *UBASH3A* 遺伝子の発現を制御する eRNA 種を見出す。

(4) *UBASH3A*-SE に動員される因子の検討

UBASH3A 遺伝子は SE 構造を示す。健康人(n=3)と RA 患者(n=3)の末梢血由来 CD4⁺ T 細胞の *UBASH3A* 遺伝子において H3K27ac ピークを示す 3 つの領域に着目する。SE マーカー(H3K27ac、p300)そして転写共役因子 MED1 と BRD4)と抑制型転写因子(BACH2 と Blimp1)の各因子に関する標識またはリクルートについて検討するためにクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイを行う。

(5) *UBASH3A* 発現に伴い CD4⁺ T 細胞の NF- κ B のリン酸化に関する検討

一般的に T 細胞受容体(TCR)の活性化により下流の転写因子 NF- κ B はリン酸化される。そこで CD4⁺ T 細胞に空ベクターおよび *UBASH3A* プラスミドを導入後、CD3 および CD28 に対する抗体で処理し、TCR 刺激を行う。その後、NF- κ B の活性化の指標であるリン酸化のレベルについて検討するためにウェスタンブロッティングを行う。

(6) CD4⁺ T 細胞の T 細胞受容体シグナルにおける *UBASH3A* の役割

TCR シグナルの活性化により、炎症性サイトカインをコードする遺伝子の発現が誘導されることが知られている。そこで(5)と同様に、CD4⁺ T 細胞に空ベクターおよび *UBASH3A* プラスミドを導入後、TCR 刺激を行う。IL-1、IL-6、IL-17、TNF- α をコードする各遺伝子の発現を RT-qPCR 法で、各サイトカイン量を Cytometric Beads array (CBA)法で測定する。

(7) *UBASH3A* 発現に伴い CD4⁺ T 細胞の *IL-6* プロモーターに動員される因子の同定。

一般的に TCR の活性化により転写因子 NF- κ B は *IL-6* 遺伝子のプロモーターにリクルートされる。そこで(5)と同様に、CD4⁺ T 細胞に空ベクターおよび *UBASH3A* プラスミドを導入後、TCR 刺激を行う。その後、*IL-6* プロモーターにおける NF- κ B のリクルートについて検討するために ChIP アッセイを行う。

4. 研究成果

(1) *in silico* 解析により RA に感受性のある *UBASH3A* 遺伝子の抽出

RA 疾患に対する GWAS 研究により RA 感受性 SNP の影響を受ける可能性がある遺伝子として 99 種類報告されてきた。dbSUPER を用いて、CD4⁺ T 細胞において SE の制御を受ける遺伝子として 571 種類見出された。2 群で共通する遺伝子として複数見出された。それらの遺伝子のうち BioGPS を用いて、CD4⁺ T 細胞において高発現する遺伝子を調べた結果、*UBASH3A* を抽出することに成功した(図 1A と 1B)。

(2) *UBASH3A* 遺伝子の発現様式と発現制御機構の解明

健康人と比較して RA 患者の CD4⁺ T 細胞における *UBASH3A* の発現低下を mRNA およびタンパク質レベルで見出した(図 1C)。つぎに、rs1893592-A/C の各遺伝子型(AA, AC, CC)と *UBASH3A* mRNA 量の相関はなかった。さらに、*UBASH3A* 遺伝子の Intragenic および近傍の Extragenic 領域は SE 構造を示す。RT-qPCR 法により Extragenic 領域の 3 つの H3K27ac ピークから eRNA を見出した。そして各 LNA を健康人由来 CD4⁺ T 細胞に導入後 24 時間で eRNA の発現は有意に低下した。それに伴い eRNA_1 と_3 のセンス鎖とアンチセンス鎖の区別なく eRNA の発現抑制により *UBASH3A* 量は有意に低下した。また健康人と

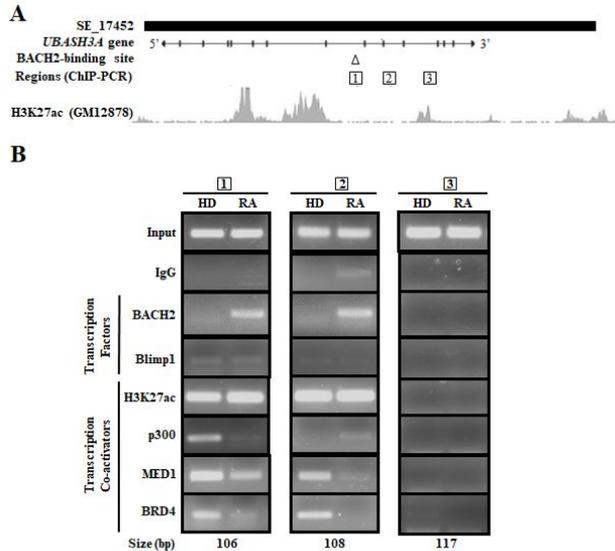


図2. RA患者と健康人のCD4⁺T細胞における転写因子と転写共役因子のリクルート制御

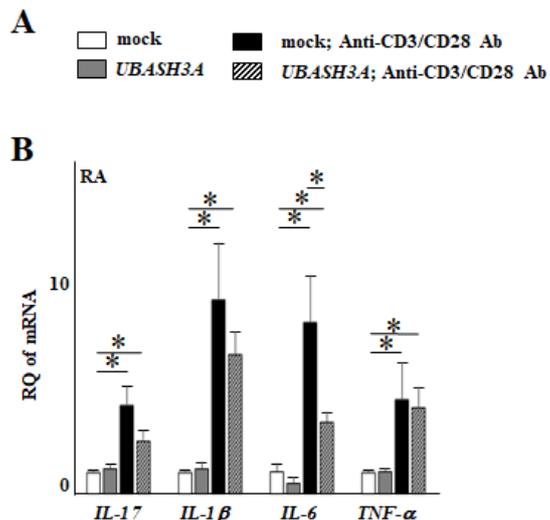


図3. RA患者のCD4⁺T細胞における*UBASH3A*過剰発現はIL-6転写物の発現を有意に抑制する

RA 患者の末梢血由来 CD4⁺ T 細胞の *UBASH3A* 遺伝子において BACH2 結合領域、rs1893592-A/C の領域、H3K27ac ピークを示す領域に着目し(図 2A)、ChIP アッセイを行ったところ、H3K27ac のレベルと p300 のリクルートについて一貫した結果は示唆されなかった。健常人で MED1 と BRD4 のリクルートが促進されたものの、RA 患者では抑制されていた(図 2B)。一方、健常人で抑制型転写因子 BACH2 のリクルートされなかったのに対し、RA 患者で領域 1 と 2 でリクルートがみられた。以上より、CD4⁺ T 細胞における eRNA および MED1/BRD4, BACH2 を介した *UBASH3A* の発現制御機構が存在し、健常人に比して RA 患者で *UBASH3A* 発現は低下していることが明らかにされた。

(3) *UBASH3A* の役割 1)まず、健常人由来 CD4⁺ T 細胞に発現する CD3 および CD28 に対する抗体で処理後 20 分で、内在性の NF- κ B のリン酸化が誘導された。つぎに、*UBASH3A* プラスミドを事前に導入後、CD3 および CD28 を刺激したところ、NF- κ B のリン酸化は有意に抑制された。*UBASH3A* が TCR シグナルを減衰したと考えられる。2)既報にあるように健常人由来 CD4⁺ T 細胞において CD3/CD28 を抗体刺激後に誘導される炎症性サイトカインの産生を反映して、各抗体処理後の CD4⁺ T 細胞では、ChIP 法により *IL-6* プロモーター近位部の NF- κ B 結合部位に NF- κ B のリクルートがより顕著に見られた。つぎに CD4⁺ T 細胞に空ベクターおよび *UBASH3A* プラスミドを導入後 TCR 刺激を行った結果、*UBASH3A* 発現により NF- κ B のリクルートが抑制された。3)まず健常人由来 CD4⁺ T 細胞における TCR シグナルにより IL-1、IL-6、IL-17、TNF- α をコードする各遺伝子の発現と産生が誘導された。さらに CD4⁺ T 細胞に空ベクターおよび *UBASH3A* プラスミドを導入後、TCR 刺激を行う。*UBASH3A* の発現により、一連のサイトカインのうち IL-6 の発現と産生が最も強く抑制された。RA 患者由来 CD4⁺ T 細胞でより顕著であった(図 3A と 3B)。しかしながら、この炎症性サイトカイン IL-6 の産生に対する *UBASH3A* の抑制効果は、健常人と RA 患者の両方の CD4⁺ T 細胞で観察されたので、*UBASH3A* の発現異常は RA の発症状態でなく病態の進展に寄与すると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamagata K, Nakayamada S, Tanaka Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 Critical Roles of Super-enhancers in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 16-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00124-9. eCollection 2020.	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 Lee S, Nakayamada S, Kubo S, Yamagata K, Yoshinari H, Tanaka Yoshiya.	4. 巻 59
2. 論文標題 IL-23 drives expansion of Th17 cells through epigenetic regulation by signal transducer and activators of transcription 3 in lupus patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford).	6. 最初と最後の頁 3058-3069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keaa176.	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 該当する
1. 著者名 Hao H, Nakayamada S, Yamagata K, Ohkubo N, Iwata S, Inoue Y, Zhang M, Zhang T, Kanda Satoh Y, Shan Y, Otsuka T, Tanaka Y.	4. 巻 73
2. 論文標題 IL-2 drives conversion of T follicular helper cells to T follicular regulatory cells through transcriptional regulation in systemic lupus erythematosus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 132-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41457. Epub 2020 Nov 10.	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 該当する
1. 著者名 Narisawa M, Kubo S, Okada Y, Yamagata K, Nakayamada S, Sakata K, Yamaoka K, Tanaka Y.	4. 巻 142
2. 論文標題 Human dendritic cell-derived osteoclasts with high bone resorption capacity and T cell stimulation ability.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone.	6. 最初と最後の頁 115616-115625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115616. Epub 2020 Aug 29.	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 Kurozumi A, Nakano K, Yamagata K, Okada Y, Nakayamada S, Tanaka Y.	4. 巻 124
2. 論文標題 IL-6 and sIL-6R induces STAT3-dependent differentiation of human VSMCs into osteoblast-like cells through JMJD2B-mediated histone demethylation of RUNX2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 53-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.04.006.	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 Tanaka K, Yamagata K, Kubo S, Nakayamada S, Sakata K, Matsui T, Yamagishi SI, Okada Y, Tanaka Y.	4. 巻 128
2. 論文標題 Glycolaldehyde-modified advanced glycation end-products inhibit differentiation of human monocytes into osteoclasts via upregulation of IL-10.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115034-115040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115034.	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 Yamagata K, Nakayamada S, Zhang T, Zhang X, Tanaka Y.	4. 巻 38
2. 論文標題 Soluble IL-6R promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells to enhance the repair of articular cartilage defects using a rat model for rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 670-679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Zhang MZ, Iwata S, Hajime M, Ohkubo N, Todoroki Y, Miyata H, Ueno M, Hao H, Zhang T, Fan J, Nakayamada S, Yamagata K, Tanaka Y.	4. 巻 72
2. 論文標題 Methionine commits cells to differentiate into plasmablasts through epigenetic regulation of BTB and CNC homolog 2 by the methyltransferase enhancer of zeste homolog 2.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1143-1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41208.	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 該当する

1. 著者名 Trimova G, Yamagata K, Iwata S, Hirata S, Zhang T, Uemura F, Satoh M, Biln N, Nakayamada S, Maksymowych WP, Tanaka Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Tumour necrosis factor alpha promotes secretion of 14-3-3 by inducing necroptosis in macrophages.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 24-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-020-2110-9.	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 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Tong Zhang, Gulzhan Trimova, Phuong Anh Nguyen, Fumi Uemura, Ippei Miyagawa, Shigeru Iwata, Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 Emerging role of epigenetic dysregulation of ubash3a in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA)
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山形薫、中山田真吾、上村芙美、岩田慈、田中良哉
2. 発表標題 関節リウマチ患者のCD4陽性T細胞におけるubash3a遺伝子のエピジェネティック制御と炎症誘導機構の解明
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Ippei Miyagawa, Fumi Uemura, Shigeru Iwata, Yoshiya Tanaka
2. 発表標題 Massive in silico studies specified UBASH3A as a candidate pathogenic factor that is down-regulated in CD4+T cells of patients with rheumatoid arthritis (RA)
3. 学会等名 第63回 日本リウマチ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山形薫、中山田真吾、岩田慈、張童、トリモバグルズハン、グエンファンアン、上村芙美、宮川一平、加藤茂明、田中良哉
2. 発表標題 スーパーエンハンサー(SE)による関節リウマチ(RA)感受性遺伝子UBASH3Aのエピジェネティック制御機構の解明
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山形薫、中山田真吾、岩田慈、Nguyen Phuong Anh、上村芙美、張童、Gulzhan Trimova、吉成紘子、宮川一平、加藤茂明、田中良哉
2. 発表標題 スーパーエンハンサーによる UBASH3A 遺伝子のエピジェネティック制御とその破綻による関節リウマチ (RA)病態形成
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山形薫、中山田真吾、張童、近藤 真弘、岩田慈、田中良哉
2. 発表標題 ナノファイバーを用いた間葉系幹細胞生体内移植の最適化とEBI3による制御
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 軟骨組織修復方法	発明者 田中良哉、山形薫、 中山田真吾	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-119273	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 軟骨組織修復方法	発明者 田中良哉、山形薫、 中山田真吾	権利者 学校法人 産業 医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2016-119273	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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 分 担 者	田中 良哉 (TANAKA YOSHIYA) (30248562)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

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