

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16015

研究課題名（和文）滑膜細胞のエピゲノム調節による炎症性サイトカイン発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of proinflammatory regulation via epigenetics in synoviocytes.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、関節リウマチの新規治療標的の足掛かりを見つけるため研究をしている。先行研究で同定した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）制御因子UHRF1の働きを解析すると、関節リウマチ病態においてUHRF1は様々な増悪因子を抑制的に制御していることが判明し、また、マウスモデルにおいてUHRF1発現を維持すると関節炎病態が改善す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

現在、関節リウマチ治療において生物学的製剤等が奏功しているが、未だ20-30%には十分な効果が認められない。本研究成果より、滑膜線維芽細胞に発現するUHRF1は様々な関節リウマチ増悪因子の発現を網羅的に抑制していること、UHRF1発現を維持すると関節炎病態が改善することを臨床サンプルやマウスモデルを用いて明らかにした。これらのことから、関節リウマチ患者におけるUHRF1発現維持は増悪因子を網羅的に抑制する新規治療戦略として期待される。

研究成果の概要（英文）：In previous study, we have tried to explore epigenetic regulator and found that Uhrf1 was significantly increased in arthritis tissue and expressed in synovial fibroblasts. Here, we revealed that UHRF1 expressed in synovial fibroblasts negatively orchestrate multiple pathogenesis such as Th17 recruitment and apoptosis resistance in rheumatoid arthritis and that Uhrf1 stabilization improve inflammatory arthritis pathogenesis using clinical specimens and model mice.

研究分野：解剖学

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

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、研究者個人に帰属します。

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; RA) は、関節破壊により ADL (Activity of daily living) や QOL (Quality of life) の障害をもたらす疾患であり、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が望まれている。RA 病態を増悪する要因として、滑膜を構成する滑膜線維芽細胞のアポトーシス抵抗性の獲得に伴う増加 (パンヌス形成) と炎症性サイトカインの発現上昇、炎症細胞の集積 (特に自己免疫疾患病態に深く関与する Th17 細胞) 等が知られているが、未だ不明な点が数多く存在する。また、RA 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、分子機構は大部分が不明である。我々は関節炎モデルマウスを用いた先行研究で、①関節炎組織で DNA メチル化促進因子 Uhrf1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1) の発現が上昇すること、②滑膜線維芽細胞 (SF) 特異的 Uhrf1 欠損マウスは関節炎病態が悪化すること、③RNA-seq 解析により、マウス SF の Uhrf1 欠損は炎症に関わる様々な遺伝子の発現上昇を誘導することを見出した。このことから、Uhrf1 は関節炎病態を抑制する作用があると考えられるが、Uhrf1 の生体内機構に関する報告は非常に少なく、RA に関しては全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、培養細胞、遺伝子改変マウスや患者由来滑膜サンプルを用いて、SF に発現する Uhrf1 による DNA メチル化制御を介した多様な炎症性サイトカイン発現調節および RA 病態における分子機構を明らかにし、新規治療標的を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 培養細胞およびマウスを用いた解析

(1) 細胞増殖とアポトーシスの解析

我々の先行研究において、K/BxN serum transfer arthritis (STA) を誘導した滑膜線維芽細胞 (SF) 特異的 Uhrf1 欠損 (cKO) マウスは Ctrl マウスと比較して、滑膜幅が上昇していたことから、STA を誘導した cKO および Ctrl マウスの関節組織を材料に、免疫染色により Podoplanin (Pdpn; 滑膜線維芽細胞マーカー) と Ki67 (増殖細胞マーカー) や Cleaved caspase-3 (アポトーシスマーカー) の二重染色を行い、Pdpn 陽性細胞における細胞増殖とアポトーシスの割合を解析した。また、Ctrl 由来 SF と cKO 由来 SF を材料に、BrdU-ELISA で細胞増殖を解析し、また、TNF と Cycloheximide でアポトーシスを誘導し細胞数を計測することでアポトーシス抵抗性を解析した。

(2) Uhrf1 による DNA メチル化の標的遺伝子

Uhrf1 は DNA メチル化の維持に必須の分子である。Uhrf1 による DNA メチル化の標的遺伝子を探索するため、STA を誘導した cKO マウスおよび対照 (Ctrl) マウスから初代培養 SF を採取し、細胞から得られたメチル化 DNA を材料に MBD-seq を行なった。さらに、MACS14 を用いた Peak calling により Ctrl 由来 SF と比較して cKO 由来 SF において DNA メチル化の減少した領域 (Peak) を検出した。CEAS (Cis-regulatory element annotation system) で Peak の検出されたゲノム DNA 領域を解析した。また、先行研究で実施した RNA-seq 解析データとの統合解析を行い、Ctrl 由来 SF と比較して cKO 由来 SF において発現上昇の認められた遺伝子のうち、TSS (Transcriptional start site) \pm 50 kb の領域に Peak の認められた遺伝子を SF における Uhrf1 の DNA メチル化標的遺伝子として同定した。同定された標的遺伝子に対して KEGG pathway 解析を行った。

(3) Ccl20 および Th17 細胞の解析

cKO マウスおよび Ctrl マウスにおける Ccl20 の血清中濃度を ELISA で解析した。また、cKO マウスと Ctrl マウスの関節組織における Th17 細胞 (CD45⁺CD4⁺CCR6⁺) の割合を Flow cytometry で解析した。

(4) UHRF1 発現維持に働く化合物の同定

UHRF1 タンパクはメチルトランスフェラーゼ SET8 (別名: SETD8, PR-SET7, KMT5A) によりメチル化修飾を受け、それに伴いユビキチン-プロテアソームにより分解されることが報告された (Zhang et al, *Nucleic Acids Res.*, 2019)。一方、SET8 阻害薬 (UNC0379, NSC663284, BVT948, Ryavidine) も既に報告されていた。これら SET8 阻害薬により UHRF1 発現が維持されるか *in vitro* で解析した。Aphidicolin および Nocodazole で細胞周期を同調した HEK293 細胞を材料に、上記 4 種の SET8 阻害薬をそれぞれ培養液中に添加し、Western Blot で UHRF1 の発現を調べた。

(5) 関節炎モデルマウスへの UHRF1 発現維持化合物の投与

実験 1)-(4) で、最も UHRF1 発現が維持された化合物である Ryavidine を STA モデルマウスに投与した。滑膜組織における Uhrf1 の発現維持を免疫組織染色で解析した。関節炎病態における Ryavidine の効果を後肢の幅と臨床スコアのモニタリングにより解析した。また、滑膜幅を組織学解析で、血清中 Ccl20 濃度を ELISA で解析した。

2) 臨床サンプルを用いた解析

(1) RA 滑膜における UHRF1 の発現解析

変形性関節症 (OA) と RA の臨床サンプルから採取した滑膜組織における UHRF1 mRNA 発現を RT-qPCR で、タンパクの発現を免疫組織染色で解析した。

(2) RA 滑膜の UHRF1 発現と疾患活動性

RA 滑膜の UHRF1 mRNA 発現と疾患活動性 (TJC28, SJC28, SDAI, MMP3, CRP) の関係をピアソン

の相関分析で解析した。

(3)患者由来滑膜線維芽細胞の UHRF1 遺伝子欠損

OA 由来 SF と RA 由来 SF を材料に siRNA で UHRF1 遺伝子をノックダウンした。実験 1)-(2)のマウス滑膜線維芽細胞を用いた RNA-seq と MBD-seq の統合解析および KEGG pathway 解析で同定された 8 つの Uhrf1 標的遺伝子 (CCL20, TNFSF11, CCL5, CSF3, TNFSF9, IL2RB, IL12RB1, ACP5) の発現を RT-qPCR で解析した。

(4)CCL20 および Th17 細胞の解析

OA と RA の滑膜組織における Th17 細胞 (CD45⁺CD4⁺CCR6⁺) の割合を Flow cytometry で解析した。さらに、OA 由来 SF と RA 由来 SF の UHRF1 mRNA 発現レベルを RT-qPCR で調べ、同一患者由来滑膜組織の Th17 細胞の割合との関係をピアソンの相関分析で解析した。

(5)アポトーシスの解析

RA 由来 SF を材料に siRNA で UHRF1 遺伝子をノックダウンした。アポトーシスを誘導できる抗 FAS 抗体を添加し、細胞数を計測することでアポトーシス抵抗性を解析した。

4. 研究成果

1)培養細胞およびマウスを用いた解析

(1)細胞増殖とアポトーシスの解析

cKO マウスおよび Ctrl マウスの関節組織における滑膜線維芽細胞の細胞増殖とアポトーシスを免疫組織学的に解析したところ、Pdpn 陽性細胞における Ki67 陽性の割合は cKO と Ctrl で差は認められなかったが、Cleaved-caspase-3 陽性の割合は Ctrl と比較して cKO で有意に減少していた。また、*in vitro* 解析において、BrdU 陽性の割合も Ctrl 由来 SF と cKO 由来 SF で差は認められず、アポトーシスに対する抵抗性は Ctrl 由来 SF と比較して cKO 由来 SF で上昇していた。

(2)Uhrf1 による DNA メチル化の標的遺伝子

Ctrl 由来 SF と cKO 由来 SF から得られたゲノム DNA におけるメチル化 DNA の相対量を比較したところ、有意差は認められなかった。しかしながら、得られたメチル化 DNA を用いて MBD-seq を行い、MACS14 による Peak calling と CEAS を行ったところ、Peak は Promoter や 5'UTR を含む様々な領域で認められ、DNA メチル化パターンに変化が起きていることが明らかとなった。MBD-seq と RNA-seq の統合解析をしたところ、RNA-seq で Ctrl 由来 SF と比較して cKO 由来 SF において発現上昇の認められた 171 遺伝子のうち、105 遺伝子において TSS±50 kb の領域に Peak が認められることが明らかとなった。さらに、105 遺伝子に対して KEGG pathway 解析を行ったところ、「Cytokine-cytokine receptor interaction (CCL20, TNFSF11, CCL5, CSF3, TNFSF9, IL2RB, IL12RB1)」や「Rheumatoid arthritis (CCL20, TNFSF11, CCL5, ACP5)」に分類される遺伝子が有意にエンリッチされた (図1)。

(3)Ccl20 および Th17 細胞の解析

cKO マウスおよび Ctrl マウスにおける Ccl20 の血清中濃度を ELISA で解析したところ、関節炎誘導前は cKO マウスと Ctrl マウスで有意な差は認められなかったが、関節炎誘導 10 日後では Ctrl マウスと比較して cKO マウスで血清中 Ccl20 レベルが有意に上昇していた。Ccl20 は Th17 細胞をリクルートするケモカインであるため、関節炎組織における Th17 細胞の割合を解析したところ、関節炎誘導 4 日後は cKO マウスと Ctrl マウスで有意差は認められなかったが、関節炎誘導 10 日後では Ctrl マウスと比較して cKO マウスで Th17 の割合が有意に上昇していた。

(4)UHRF1 発現維持に働く化合物の同定

Aphidicolin (G1/S 期) および Nocodazole (G2/M 期) で細胞周期を同調した HEK293 細胞に SET8 阻害薬 (UNC0379, NSC663284, BVT948, Ryuvidine) を投与し、Western Blot で UHRF1 の発現を解析した。通常 UHRF1 の発現は G1/S 期から G2/M 期にかけてユビキチン-プロテアソームにより分解されることが知られているが、SET8 阻害薬を添加すると Aphidicolin 添加と比較して Nocodazole 添加で UHRF1 発現の減少は認められず、特に Ryuvidine 添加による発現の維持は最も顕著であった (図2)。

(5)関節炎モデルマウスへの UHRF1 発現維持化合物の投与

STA モデルマウスに DMSO (対照) あるいは Ryuvidine を投与し、関節炎病態への影響を解析した。関節炎誘導 10 日後の関節組織における Uhrf1 陽性の滑膜線維芽細胞 (Pdpn 陽性) の割合を免疫組織学的に解析したところ、DMSO 投与群と比較して Ryuvidine 投与群で Uhrf1 陽性の割合は有意に増加

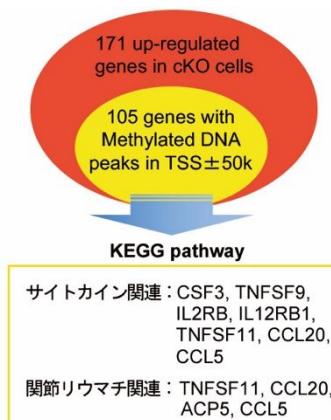


図1. RNA-seqとMBD-seqの統合解析

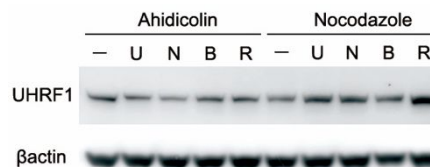


図2. UNC0379(U), NSC663284(N), BVT948(B), Ryuvidine(R)を添加したHEK293のUHRF1発現

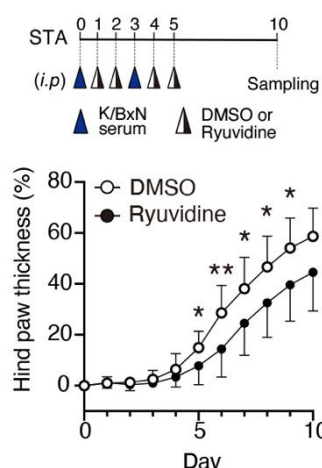


図3. Ryuvidine投与による関節炎病態の軽減

していた。また、関節炎誘導後の後肢幅および臨床スコアは DMSO 投与群と比較して Ryuvidine 投与群で有意に減少した (図3)。関節炎誘導 10 日後の滑膜幅および血清中 Ccl20 濃度も DMSO 投与群と比較して Ryuvidine 投与群で有意に減少した。

2) 臨床サンプルを用いた解析

(1) RA 滑膜における UHRF1 の発現解析

OA 滑膜および RA 滑膜における *UHRF1* mRNA の発現レベルを RT-qPCR で解析したところ、OA と比較して RA で *UHRF1* mRNA 発現は有意に上昇していた。また、滑膜組織における *UHRF1* 発現を免疫組織染色で解析したところ、RA 滑膜において *UHRF1* は滑膜線維芽細胞 (PDPN 陽性) に認められたが OA 滑膜では認められなかった。

(2) RA 滑膜の *UHRF1* 発現と疾患活動性

RA 滑膜における *UHRF1* mRNA 発現と RA の疾患活動性の相関を調べたところ、SJC28、MMP3、CRP において *UHRF1* mRNA の発現レベルと有意な負の相関が認められた (図4)。

(3) 患者由来滑膜線維芽細胞の *UHRF1* 遺伝子欠損

siRNA を用いて OA 由来 SF と RA 由来 SF の *UHRF1* を遺伝子抑制し、*CCL20*、*TNFSF11*、*CCL5*、*CSF3*、*TNFSF9*、*IL2RB*、*IL12RB1*、*ACP5* の発現を RT-qPCR で調べたところ、*UHRF1* をノックダウンした RA 由来 SF において、*CCL20* mRNA の有意な発現上昇が求められたが、OA 由来 SF では同様の発現上昇は認められなかった (図5)。

(4) *CCL20* および Th17 細胞の解析

OA と RA の滑膜組織における Th17 細胞の割合を Flow cytometry で解析したところ、OA と比較して RA 滑膜組織で Th17 細胞の割合は有意に上昇した。また、同一患者由来の SF の *UHRF1* 発現レベルと Th17 の割合の相関を解析したところ、有意な負の相関が認められた。

(5) アポトーシスの解析

siRNA で *UHRF1* 遺伝子をノックダウンした RA 由来 SF を材料に抗 FAS 抗体でアポトーシスを誘導したところ、対照と比較して *UHRF1* ノックダウン SF で生細胞の数は有意に多く、アポトーシス抵抗性の上昇が示された。

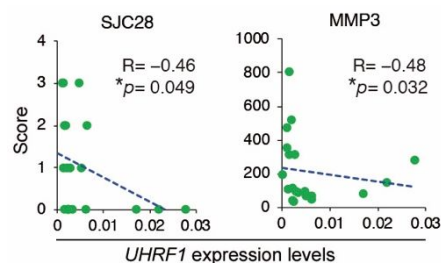


図4. RA患者のUHRF1発現と疾患活動性の相関

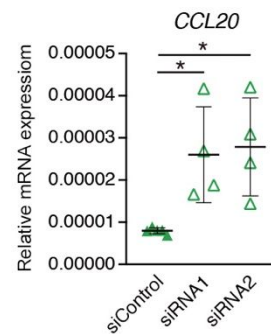


図5. UHRF1発現抑制したRASFのCCL20発現

3) 総括

以上、これまでの研究成果により、滑膜線維芽細胞に発現する *UHRF1* は関節リウマチ病態における様々な増悪因子を網羅的に抑制するエピジェネティック制御分子であることが示された。関節リウマチ病態における *UHRF1* 発現維持は新たな治療戦略になることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sawada Yuichiro, Kikugawa Tadahiko, Iio Hiroyuki, Sakakibara Iori, Yoshida Shuhei, Ikedo Aoi, Yanagihara Yuta, Saeki Noritaka, Gy?rffy Bal?zs, Kishida Takeshi, Okubo Yoichiro, Nakamura Yoshiyasu, Miyagi Yohei, Saika Takashi, Imai Yuuki	4. 巻 146
2. 論文標題 GPRC5A facilitates cell proliferation through cell cycle regulation and correlates with bone metastasis in prostate cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1369 ~ 1382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32554	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 Uematsu Atsushi, Kido Kohki, Takahashi Hirotaka, Takahashi Chikako, Yanagihara Yuta, Saeki Noritaka, Yoshida Shuhei, Maekawa Masashi, Honda Mamoru, Kai Tsutomu, Shimizu Kouhei, Higashiyama Shigeki, Imai Yuuki, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 294
2. 論文標題 The E3 ubiquitin ligase MIB2 enhances inflammation by degrading the deubiquitinating enzyme CYLD	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14135 ~ 14148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010119	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 Saeki Noritaka, Imai Yuuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Reprogramming of synovial macrophage metabolism by synovial fibroblasts under inflammatory conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12964-020-00678-8	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 Iio Hiroyuki, Kikugawa Tadahiko, Sawada Yuichiro, Sakai Hiroshi, Yoshida Shuhei, Yanagihara Yuta, Ikedo Aoi, Saeki Noritaka, Fukada So-ichiro, Saika Takashi, Imai Yuuki	4. 巻 534
2. 論文標題 DNA maintenance methylation enzyme Dnmt1 in satellite cells is essential for muscle regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 79 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.116	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐伯法学, 井上和樹, 渡森一光, 水木伸一, 竹中克斗, 三浦裕正, 今井祐記
2. 発表標題 エピジェネティック制御因子Uhrf1はサイトカイン関連遺伝子発現を抑制し関節リウマチ病態を制御する
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 佐伯法学, 井上和樹, 渡森一光, 水木伸一, 竹中克斗, 三浦裕正, 今井祐記
2. 発表標題 エピジェネティック制御因子Uhrf1は関節リウマチにおける増悪因子発現を制御する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noritaka Saeki, Kazuki Inoue, Maky Ideta-Otsuka, Watamori Kunihiro, Shinichi Mizuki, Katsuto Takenaka, Katsuhide Igarashi, Hiromasa Miura, Yuuki Imai
2. 発表標題 Epigenetic regulator UHRF1 orchestrates expressions of cytokine-related genes in rheumatoid arthritis.
3. 学会等名 29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯法学, 井上和樹, 大塚まき, 渡森一光, 水木伸一, 竹中克斗, 五十嵐勝秀, 三浦裕正, 今井祐記
2. 発表標題 DNA メチル化制御分子UHRF1は関節リウマチの病態増悪を抑制する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本骨代謝学会ANZBMS Travel Award, 2019年

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	今井 祐記 (Imai Yuuki)		

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
---------	---------