

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462379

研究課題名(和文) 関節炎疾患特異的なMMP分子による軟骨破壊機序の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of arthritic diseases-specific cartilage destruction by MMP molecules

研究代表者

荒木 靖人 (Araki, Yasuto)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10580839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の病態におけるエピジェネティクス制御異常の解明のため、RAと変形性関節症(OA)の滑膜線維芽細胞(SFs)において、基質分解酵素のmatrix metalloproteinase (MMP)の遺伝子発現とヒストン修飾を調べた。MMP-1、3、9、13遺伝子発現は、RASFsにおいてOASFsより有意に高かった。RASFsのMMP遺伝子のプロモーター領域のヒストンメチル化は、遺伝子発現の亢進と矛盾しなかった。さらに、RASFsにおいてMMP-1、3、13遺伝子発現はIL-6反応性であった。以上から、ヒストンメチル化はRASFsの活性化に重要な役割を果たしている事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify dysfunctions of epigenetic regulation in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA), gene expression of matrix metalloproteinases (MMPs), which are matrix-degrading enzymes, and histone modifications in the promoters were examined in RA synovial fibroblasts (SFs) and osteoarthritis (OA) SFs. Gene expression of MMP-1, 3, 9, and 13 was significantly higher in RASFs than in OASFs. Histone methylation profiles in the MMP promoters were consistent with the MMP gene expression. In addition, MMP-1, 3, and 13 genes were responsive to IL-6 stimulation in RASFs. Taken together, it is suggested that histone methylation plays an important role in the activation of RASFs.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：関節リウマチ 変形性関節症 MMP エピジェネティクス ヒストン修飾

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 関節炎の病態は疾患毎に異なると考えられ、その機序を明らかにする事は、疾患特異的な関節炎の活動性の指標や関節炎の治療の開発につながる事が見込まれる。代表的な関節疾患である関節リウマチ (RA) と変形性関節症 (OA) において、関節炎における軟骨破壊の原因分子の一つである Matrix metalloproteinase (MMP) ファミリーに焦点を当て、エピゲノム異常の存在を明らかにする。

(2) MMP 分子は MMP-1 から MMP-28 まで存在し、コラーゲンやゼラチンなどの軟骨に多く含まれる基質を分解する酵素であり、RA において軟骨破壊の主役の一つである (Rengel Y. et al. *Arthritis Res Ther.* 9: 221-230)。MMP 遺伝子転写の活性化機序及び MMP 分子の基質特異的な活性に着目して、関節炎を来す疾患特異的な軟骨破壊の機序の解明を行う。

## 2. 研究の目的

(1) RA は、全身の関節に慢性炎症を来す難治性の自己免疫疾患である。関節内の滑膜組織が増生し、進行性に軟骨と骨が破壊される。RA の多発家系の存在、RA 患者の HLA-DR4 陽性率が高い事、一塩基多型との関連 (PADI4、PTPN22、CCR6 遺伝子) が指摘されており、遺伝的要因の関与は明らかである。一方、それだけでは RA の発症は説明できず、環境的要因 (ウイルス感染症、喫煙) などの非遺伝的要因が関与していると推測されている。また、RA の発症機序を考えると、リウマチ因子や抗 CCP 抗体などの自己抗体、活性化マクロファージや CD4 陽性 T 細胞の滑膜への浸潤、炎症関節における炎症性サイトカイン産生などの免疫異常が存在しており、これにより関節破壊や滑膜増殖につながっている。このような自己免疫反応と同時に、自然免疫反応 (Toll-like receptor を介する反応など) も関与して、関節局所にて炎症が誘導されている。RA の滑膜線維芽細胞 (SFs) はマクロファージやリンパ球により刺激 (TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカイン) されて活性化している。活性化した SFs は、炎症性サイトカイン・ケモカイン産生、基質分解酵素分泌により関節破壊を起こす一方、増殖能亢進、アポトーシス感受性低下などの癌細胞と似た形質も持つ。しかしながら、SFs の活性化がどのように起こり、維持されているのかは不明である。

(2) エピジェネティクスの機構がクロマチンの構造および遺伝子転写と関連している事から、我々はエピジェネティクス制御の異常が RA の滑膜炎の病態に関わっているのではないかと考えた。エピジェネティクスとは、遺伝子配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構を意味し、主な機序として DNA

メチル化、ヒストン修飾、クロマチンリモデリング、非コード RNA (micro RNA など) が挙げられる。エピジェネティクス制御の異常が癌細胞において多数報告されており、腎慢性線維化、統合失調症、神経変性疾患、糖尿病などの様々な後天的疾患においても同様な異常が報告されている。上記に述べたように、RASFs は活性化しており、炎症性サイトカイン・ケモカイン (IL-6、IL-8)、基質分解酵素 (MMP、cathepsin)、細胞増殖関連因子 (cyclin D1、TGF $\beta$  1、VEGF) などの特異的遺伝子発現が報告されている。我々は、これらの遺伝子発現の原因の一つに、エピジェネティクス制御の異常があると仮定した。

(3) 本研究では、RA の滑膜炎にエピジェネティクス制御の異常が関連しているかを明らかにするために、基質分解酵素である MMP 遺伝子に焦点を当ててヒストン修飾の役割を検討した。ヒストン修飾にはヒストンアセチル化やメチル化など多数の修飾があり、正もしくは負に遺伝子転写を制御する修飾がそれぞれ知られている。RASFs と OASFs において、MMP 遺伝子の発現とヒストン修飾を調べた。MMP-1、3、9、13 遺伝子発現は、RASFs において OASFs に比べて有意に高値であった。RASFs において、MMP 遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾は、遺伝子発現の亢進を説明できる変化を示していた。さらに、RASFs において、MMP-1、3、13 遺伝子発現は IL-6 反応性であったが、MMP-9 遺伝子発現は IL-6 刺激により変化しなかった。IL-6 刺激により誘導される転写因子 STAT3 は、MMP-1、3、13 遺伝子のプロモーター領域には結合する一方、MMP-9 遺伝子では結合が見られなかった。

(4) 以上の結果から、ヒストン修飾は RASFs における MMP 遺伝子発現と相関しており、RASFs の活性化に重要な役割を果たしている事が示唆された。さらに、IL-6 刺激により MMP-1、3、13 遺伝子が活性化する事を見出し、それが転写因子の STAT3 を介する事を明らかにした。本研究の結果を基に、RA の新しい検査・診断法及びエピジェネティクスを制御する新しい治療の開発につながる事が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗体と試薬

抗 H3K4me3 抗体 (07-473)、抗 H3K27me3 抗体 (17-622) は Millipore 社より購入した。ヒトリコンビナント IL-6、ヒトリコンビナント可溶性 IL-6R $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) は PeproTech 社より購入した。

### (2) SFs の調製および刺激培養

埼玉医科大学倫理委員会の承認下に、RA および OA の患者から、書面によりインフォームド・コンセントを得た後、当大学病院の整形外科における人工関節置換術時に滑膜組

織を採取した。滑膜組織を細切後、1.5mg/ml collagenase と 0.04% hyaluronidase を添加した DMEM 溶液に懸濁して、37℃にて2時間震盪した。ナイロンメッシュを通過させた後、10% FBS と 1% Penicillin/Streptomycin を添加した DMEM 溶液中にて、37℃、5% CO<sub>2</sub> 下において培養した。0.25% Trypsin-EDTA 溶液を用いて、培養細胞の継代を行った。4-8 回継代した細胞を、SFs として実験に用いた。

100ng/ $\mu$ l ヒトリコンビナント IL-6、100ng/ $\mu$ l ヒトリコンビナント sIL-6R $\alpha$  の存在下あるいは非存在下にて SFs を 4、24 時間刺激培養した後、細胞を回収して実験に用いた。

### (3) 逆転写反応と定量的 PCR

培養細胞を TRIzol (Invitrogen 社) に懸濁した後、付属のプロトコールに従い、mRNA を分離した。SuperScript III (Invitrogen 社) と Oligo(dT)12-18 primer (Invitrogen 社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作成した。各遺伝子特異的なプライマーを用いて、リアルタイム PCR (Applied Biosystems 社の StepOnePlus システム) を行い、 $\beta$ -actin を internal control として各遺伝子発現を数値化して比較検討を行った。

### (4) クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法と定量的 PCR

0.2U micrococcal nuclease (Sigma 社) あるいは 0.1%ホルムアルデヒドによる処理後、ヒストン修飾あるいは STAT3 特異的抗体を用いて免疫沈降反応を行った。回収された複合体を洗浄し、1mg/ml proteinase K および 0.3% SDS にて処理を行い、複合体から DNA を分離した。フェノール・クロロホルムにて DNA を抽出し、エタノール沈殿により DNA を精製した。各遺伝子特異的なプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行い、免疫沈降していない DNA (input) に対する免疫沈降にて回収された DNA の割合を計算して比較検討を行った。

### (5) 統計

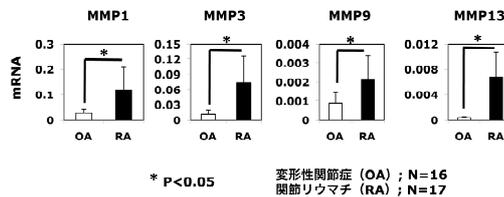
Mann-Whitney の U-test にて P 値<0.05 を有意差ありと判断した。

## 4. 研究成果

(1) RASFs における MMP 遺伝子発現の亢進：我々は、RASFs の活性化にエピジェネティクス制御の異常が関与しているのではないかと仮定し、本研究で検証を行った。MMP 遺伝子を対象に、エピジェネティクス制御としてヒストン修飾の程度を調べる事とした。RA 及び OA の患者から SFs を分離し、MMP-1-28 の遺伝子に関して遺伝子発現を比較した。MMP-1、3、9、13 は、RA の病態に関与している事が報告されており、予想された通り、これらの 4 つの MMP 遺伝子は、RASFs において高発現していた (図 1)。MMP-1、13 は type II コラーゲンを分解し、MMP-3、9 はプロテオグ

リカンなどのコラーゲン以外の基質を分解する。軟骨の破壊は表面のプロテオグリカン分解から始まり、深層のコラーゲン分解へと進む事から、これら複数の MMP 分子が共同して軟骨破壊に関与していると考えられた。

図1.



(2) RASFs における MMP 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンメチル化の異常：次に、各 MMP 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンメチル化 (H3K4me3、H3K27me3) を ChIP 法及びリアルタイム PCR 法にて比較検討した。H3K4me3 は緩んだクロマチン構造部に見られるヒストン修飾であり、遺伝子転写を正に制御するヒストン活性化マーカーと考えられている。一方、H3K27me3 は凝縮したクロマチン構造部に存在し、遺伝子転写を負に制御するヒストン抑制性マーカーと考えられている。RASFs では、MMP-1、3、9、13 遺伝子のプロモーター領域において、H3K4me3 は有意に高値を示した (図 2)。H3K27me3 は MMP-1、9 遺伝子において有意に低値であったが、MMP-3、13 遺伝子においては低値である傾向はあるものの有意差は認められなかった (図 3)。これらの結果から、RASFs において、MMP-1、3、9、13 遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造は緩んだ状態であるために遺伝子転写が亢進していると考えられ、MMP 遺伝子発現制御にはヒストン修飾が重要な役割を果たしている事が示唆された。さらに RA において炎症性サイトカインなどの刺激に対する反応性が亢進しているのではないかと予想された。

図2.

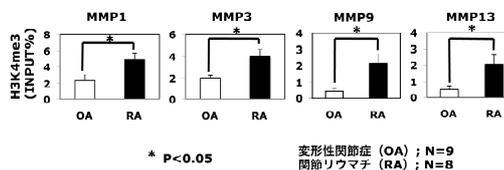
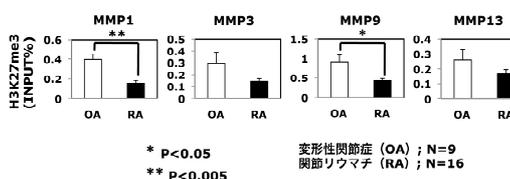


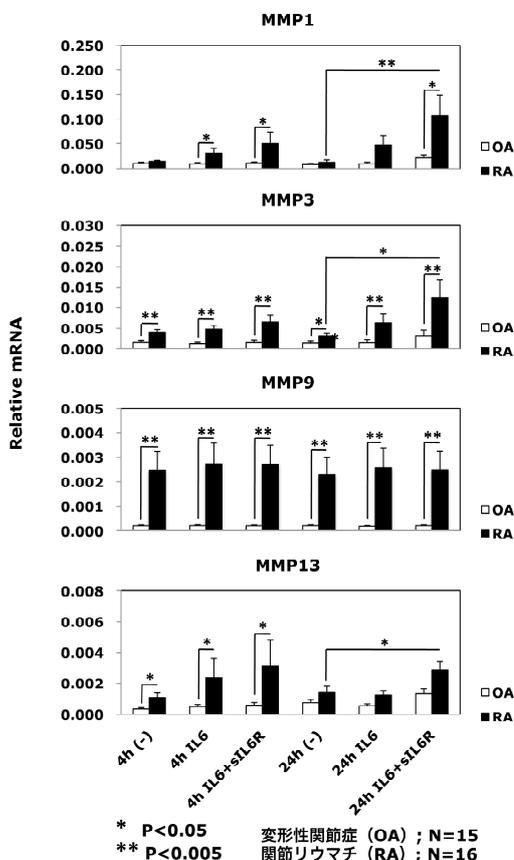
図3.



(3) RASFs における IL-6 刺激による MMP 遺伝

子の活性化：IL-6 は RA の病態に関与する炎症性サイトカインの一つであり、ヒト化抗 sIL-6R モノクローナル抗体は RA の治療にも用いられている。IL-6 受容体は gp130 分子と膜結合型 IL-6R $\alpha$  から構成されるが、IL-6R $\alpha$  は可溶性蛋白としても存在しており、gp130 分子に IL-6 と sIL-6R $\alpha$  の両者が結合する事により IL-6 刺激が入る経路も存在する。そこで、IL-6 のみ、あるいは IL-6 と sIL-6R $\alpha$  にて刺激を行ったところ、RASFs において、MMP-1、3、13 遺伝子の発現が亢進したが、OASFs においては変化が見られなかった (図 4)。一方、MMP-9 遺伝子の発現は、これらの刺激に対して RASFs において反応が見られず、MMP-1、3、13 遺伝子とは IL-6 への反応性が異なると考えられた。

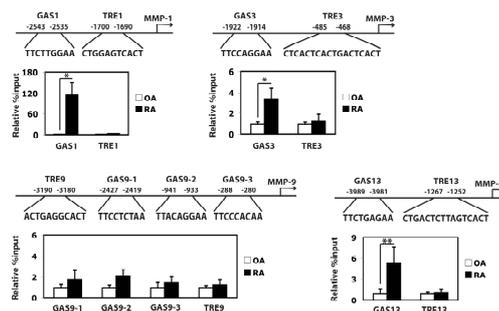
図4.



(4) RASFs における IL-6 刺激後の MMP 遺伝子のプロモーター領域に対する STAT3 の結合：MMP 遺伝子の IL-6 に対する応答性の差の原因を明らかにするために、IL-6 により誘導される転写因子 STAT3 に着目した。STAT3 がこれらの MMP 遺伝子のプロモーター領域に結合するかどうかを解析したところ、MMP-1、3、13 遺伝子では結合する一方、MMP-9 遺伝子では結合が見られなかった (図 5)。MMP 遺伝子の IL-6 刺激への応答性の差は STAT3 のプロモーター領域への結合により説明される事が判明した。以上の結果から、RASFs において MMP 遺伝子の転写はクロマチン構造と転写因子

の両者により制御されている事が示唆された。

図5.



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

(1) Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Sato K, Yokota K, Fujimoto K, Kim YT, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Histone methylation and STAT3 differentially regulate IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol.* 査読有. 68(5). 2016. 1111-1123  
DOI: 10.1002/art.39563

(2) Akiyama Y, Yokota K, Nakajima K, Yoshida Y, Araki Y, Kajiyama H, Asanuma-Funakubo Y, Sato K, Mimura T. Effects of bosentan on the skin temperature of hands and feet in patients with connective tissue diseases complicated with Raynaud's phenomenon: a prospective, open-label, uncontrolled, single-center study. *Rheumatology Global Journal of Medical Research: F Diseases.* 査読有. 15(2). 2015.  
[https://globaljournals.org/GJMR\\_Volume15/2-Effects-of-Bosentan-on-the-Skin.pdf](https://globaljournals.org/GJMR_Volume15/2-Effects-of-Bosentan-on-the-Skin.pdf)

(3) Ota M, Yanagisawa M, Tachibana H, Yokota K, Araki Y, Sato K, Mimura T. A significant induction of neutrophilic chemoattractants but not RANKL in synoviocytes stimulated with interleukin 17. *J Bone Miner Metab.* 査読有. 33(1). 2015. 40-7  
DOI: 10.1007/s00774-014-0565-y

(4) 荒木靖人、次世代シーケンサーを用いたエピゲノム解析で病態にせまれるか？ (特集 リウマチ性疾患のゲノム&エピゲノム解析：GWAS から次世代シーケンサーの時代へ)、分子リウマチ治療、査読無、8(3)、2015、136-140

(5)Wada TT, Araki Y, Sato K, Aizaki Y, Yokota K, Kim YT, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有. 444(4). 2014. 682-6  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.195

(6)Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Kitaura H, Kayama H, Miyoshi F, Araki Y, Akiyama Y, Takeda K, Mimura T. Combination of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin-6 Induces Mouse Osteoclast-like Cells With Bone Resorption Activity Both In Vitro and In Vivo. *Arthritis Rheumatol*. 査読有. 66(1). 2014. 121-9  
DOI: 10.1002/art.38218

(7) 荒木靖人, 三村俊英, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるヒストンメチル化の異常, 日本臨床免疫学会誌, 査読無, 37(4), 2014, 364

(8) 荒木靖人, 関節リウマチとエピジェネティクス, 生体の科学, 査読無, 65(6), 2014, 601-605

(9) 荒木靖人, 免疫疾患 (リウマチ, 膠原病など) とエピジェネティクス, アレルギー・免疫, 査読無, 21(12), 2014, 1900-1909

(10)Fujimoto K, Arai S, Matsubara M, Du K, Araki Y, Matsushita A, Kurokawa R. Implicated role of liposarcoma related fusion oncoprotein TLS-CHOP in the dysregulation of arginine-specific methylation through PRMT1. *Cell Biology*. 査読有. 1(2). 2013. 18-23  
DOI: 10.11648/j.cb.20130102.11

(11)横田和浩, 佐藤浩二郎, 三由文彦, 荒木靖人, 秋山雄次, 三村俊英, 炎症性サイトカインは骨吸収能を有する破骨細胞様細胞を誘導する, 日本臨床免疫学会誌, 査読無, 36(5), 2013, 338

[学会発表] (計 14 件)

①Yasuto Araki, Takuma Tsuzuki Wada, Yoshimi Aizaki, Hiroshi Kajiyama, Kazuhiro Yokota, Kojiro Sato, Yu Funakubo Asanuma, Yoon-Taek Kim, Hiromi Oda, Toshihide Mimura, The epigenetic mechanism of constitutive and IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016 年 4 月 22 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

②Yoshimi Aizaki, Yasuto Araki, Kojiro Sato, Yuji Akiyama, Toshihide Mimura. Histone methylation profiling in peripheral white blood cells as a candidate biomarker for Behcet's Disease. American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2015. November 8, 2015. San Francisco Convention Center, San Francisco, California, USA

③荒木靖人, 和田琢, 相崎良美, 佐藤浩二郎, 黒川 理樹, 三村俊英, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞における H3K4 ヒストンメチル基転移酵素によるケモカイン遺伝子発現の制御, 第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2015 年 5 月 25 日, 東京一ツ橋学術総合センター (東京都千代田区)

④荒木靖人, 和田琢, 相崎良美, 横田和浩, 梶山浩, 秋葉春彦, 佐藤浩二郎, 秋山雄次, 金潤澤, 織田弘美, 三村俊英, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるヒストン 3 リシン 4 メチル基転移酵素の異常, 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015 年 4 月 23 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

⑤Y. Araki, T. Mimura, Histone methylation and STAT3 regulate IL-6-induced MMPs gene activations in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会, 2014 年 12 月 10 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

⑥Y. Araki, T. Wada, Y. Aizaki, R. Kurokawa, T. Mimura, The disorder of histone lysine methyltransferases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑦荒木靖人, 三村俊英, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるヒストンメチル化の異常, 第 42 回日本臨床免疫学会総会, 2014 年 9 月 26 日, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

⑧和田琢, 荒木靖人, 佐藤浩二郎, 横田和浩, 三由文彦, 梶山浩, 舟久保ゆう, 金潤澤, 織田弘美, 秋山雄次, 三村俊英, ヒストンアセチル化は関節リウマチ滑膜線維芽細胞の IL-6 過剰産生に関与する, 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2014 年 4 月 26 日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京都港区)

⑨荒木靖人, 和田琢, 藤本健太, 黒川理樹, 三村俊英, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞の IL-6 依存性 MMP 遺伝子転写活性化におけるヒストンメチル化の役割, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸ポートピアアイランド (兵庫県神戸市)

⑩Araki Y, Wada TT, Sato K, Yokota K, Miyoshi F, Asanuma YF, Akiyama Y, Mimura T. Altered histone methylation is associated with IL-6 dependent matrix metalloproteinases gene transcriptional activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2013. October 26-30, 2013. San Diego Convention Center, San Diego, California, USA

⑪Wada TT, Araki Y, Yokota K, Miyoshi F, Sato K, Mimura T. Histone modifications in the interleukin-6 gene promoter region of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2013. October 26-30, 2013. San Diego Convention Center, San Diego, California, USA

⑫荒木靖人、和田琢、佐藤浩二郎、織田弘美、黒川理樹、三村俊英、関節リウマチ滑膜線維芽細胞の IL-6 依存性 MMP 遺伝子転写活性化におけるヒストンメチル化の役割、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年05月30日、奈良新公会堂（奈良県奈良市）

⑬和田琢、荒木靖人、横田和浩、三由文彦、佐藤浩二郎、黒川理樹、三村俊英、関節リウマチ滑膜線維芽細胞における IL-6 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、2013年05月30日、奈良新公会堂（奈良県奈良市）

⑭荒木靖人、和田琢、佐藤浩二郎、横田和浩、三由文彦、梶山浩、舟久保ゆう、金潤澤、織田弘美、秋山雄次、三村俊英、関節リウマチ滑膜線維芽細胞の IL-6 依存性 MMP 遺伝子転写活性化におけるヒストンメチル化の役割、第57回日本リウマチ学会総会・学術集会、2013年04月18日、京都国際会議場（京都府京都市）

〔図書〕（計2件）

(1) 荒木靖人、他、医学書院、臨床検査データブック 2015-2016、2015、426、444-445、908

(2) 荒木靖人、他、ヌーヴェルヒロカワ社、臨床病態学2巻、2013、611-614

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ベーチェット病の判定を補助する方法、及びベーチェット病の活動性の評価を補助する方法

発明者：三村俊英、荒木靖人、相崎良美

権利者：同上

種類：特許

番号：2014-200824

出願年月日：2014年9月30日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1) 埼玉医科大学リウマチ膠原病科 研究内容(荒木靖人)

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/Dr.Araki.html>

(2) ゲノム医学研究センタープロジェクト研究部門

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/genome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 靖人 (ARAKI YASUTO)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：10580839

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし