

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461479

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるDNAメチル化ダイナミクスとその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Dynamism of DNA methylation in Rheumatoid Arthritis

研究代表者

中野 和久 (Nakano, Kazuhisa)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：50406500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Ten-Eleven translocation (TET) タンパク質による能動的脱メチル化の機構の発見により、DNAメチル化ダイナミクスについての理解が急速に進んでいる。今回、我々は、TNF等の持続的な炎症性サイトカイン曝露が、TET3依存性に炎症記憶として関節リウマチ(RA)患者由来線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)にCCL2やICAM-1などの発現を高いままで残し、パヌス形成を促進することで関節破壊をきたしやすくしていることを、K/BxN血清誘導性関節炎を用いたin vivoの実験系、RA患者由来FLSを用いたin vitroの実験系から明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Discovery of the mechanism of active demethylation by TET proteins has rapidly advanced understanding of DNA methylation dynamism. Here, we demonstrate that TET3 is induced by inflammatory cytokine stimulation, and plays an important role in joint destruction in rheumatoid arthritis (RA). Arthritis was induced in C57BL/6 wild type and TET3 heterozygous-deficient (TET3+/-) mice with K/BxN serum. The arthritis score and bone erosion score were significantly decreased in the TET3+/- mice. In RA patient-derived fibroblast-like synoviocytes (FLS), the TET3 expression and 5-hydroxymethylcytosine levels were significantly increased by TNF stimulation. In addition, TET3 knockdown inhibited the TNF-induced production of CCL2 and ICAM-1 in RA FLS. These results suggest that continuous exposure to inflammatory cytokines results in leaving an inflammatory memory in FLS in a TET3-dependent manner, thereby promoting pannus formation and increasing the probability of joint destruction.

研究分野：リウマチ学

キーワード：関節リウマチ エピジェネティクス DNAメチル化 滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は関節滑膜を炎症の主座とする自己免疫性疾患であり、骨・軟骨を破壊して関節機能障害をもたらすのみならず、全身の諸臓器に障害をもたらす。TNF 阻害剤などの生物学的製剤により治療成績は急速に進歩したものの、発症及び疾患増悪の分子機構は未解明な部分が多く、更なる治療法の開発も望まれている。

ゲノム医学の進展により種々の遺伝多型が RA の罹患率、重症度などに関与することが報告されたが、一卵性双生児における RA 発症の一致率は 12-15% 程度であり、エピジェネティックな遺伝子発現の制御が重要な研究課題となりつつある。

RA において滑膜線維芽細胞 (FLS) は、鍵となる炎症性サイトカイン、メディエーター、プロテアーゼなどの産生能を有し、関節破壊に寄与する。また、SCID マウスを用いた検討では、RA 患者由来 FLS (RA FLS) が遊走により、離れた関節に移動して軟骨破壊をもたらすことが示されている。しかしながら、斯様な RA FLS に特異な攻撃的表現型が如何にして獲得されるかは不明である。

エピジェネティクスによる遺伝子発現の制御に関しては、プロモーター領域の DNA メチル化異常とガンや自己免疫疾患の発症との関連が集中的に検討されてきたが、RA では FLS における全般的なメチル化レベルの低下や数種の遺伝子 (CXCL12, ephrinB1, DR3 など) の DNA メチル化異常とその機能解析の報告にとどまっていた。我々は 2013 年、RA 患者由来と対照患者由来の FLS を用いてゲノム網羅的な DNA メチル化解析を行い、RAFLS は全く特異的な DNA メチル化パターンを示し、約 200 遺伝子、約 2000 遺伝子座のメチル化レベルが有意に異なることを明らかにした (Nakano K et al. Ann Rheum Dis 2013)。また同時に FLS においては、IL-1 や TNF などの炎症性サイトカインが DNA メチル化酵素の発現及び酵素活

性を低下させることも明らかにしてきた (Nakano K et al. J Immunol 2013)。しかしながら、これまでは能動的な DNA 脱メチル化の機構が不詳であったため、DNA メチル化・脱メチル化のダイナミズムとその異常を誘発する機構の全貌は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、新規に DNA 脱メチル化酵素として同定された Tet (Ten-Eleven translocation) による脱メチル化にも着目し、滑膜における DNA メチル化のダイナミズムとその分子基盤を明らかにし、FLS の DNA メチル化と遺伝子発現データベースをもとに、RA ならびに OA の新規疾患バイオマーカーの同定、治療応用への展開を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 患者由来滑膜組織・培養滑膜細胞 (FLS) における Tet タンパク質ファミリー、水酸化メチルシトシン等の発現状況、炎症性サイトカインによる誘導とその発現調節機構
 - (2) Tet タンパク質阻害による RA 滑膜細胞の攻撃的表現型の是正の有無
 - (3) 炎症性サイトカイン-Tet axis による標的分子の同定
- の 3 つの研究を並行して行う。

4. 研究成果

- (1) ヒトの RA 滑膜における TET ファミリータンパク質の役割を評価するため、RA 患者滑膜組織での 5mC, 5hmC 及び TET1,2,3 の発現を免疫染色で OA 患者由来滑膜と比較評価した。RA 滑膜において 5hmC の発現が高く、TET1 の発現は OA より低いのに対して、TET2/3 は RA で高い発現が観察された。TET2 の発現が単核球で強いのに対して、TET3 は滑膜表層下で強く染色され、FLS のマーカーの一つとされる CD55 と共局在しており、TET3 は主に RA の FLS で高発現することが示唆された。
- (2) 培養 FLS における TET1-3 の mRNA 発現を

OA、RA で比較したところ、TET3 発現は RA でやや高い傾向にあったが、有意差は認めなかった。RA 滑膜組織では常に種々の高サイトカイン環境下にあることから、どのサイトカインが TET ファミリー遺伝子発現に影響を与えるかを検討した。2 時間の刺激で、TET1 発現は、多くのサイトカインで発現が低下したが、TET2 発現は、全ての刺激において発現の変化はなかった。TET3 は、TNF、IL-1、IL-17 の刺激で有意に発現が増加した (Figure 3b)。以降の刺激は RA の病態形成において代表的な炎症性サイトカインである TNF で代表して行った。half-life assay では、Actinomycin D 処理の有無で TNF 誘導性の TET3 mRNA 発現レベルに差はなく、mRNA の安定性ではなく、transcriptional な調整によるものであることが示唆された。FLS の核内タンパクを抽出して TNF 刺激後の TET3 蛋白発現を評価したが、TET3 蛋白発現は継時的に増強した。また、同様に TNF 刺激後には 5hmC 発現も増強した。

(3) 次に siRNA で FLS の TET3 をノックダウンし、TNF 刺激を行って、FLS において TET3 が担う RA-like な function を調べた。RA-FLS の最大の特徴である浸潤性をスクラッチアッセイで評価したところ、TNF 依存性の FLS の浸潤性は TET3-ko により完全に抑制された。各種炎症性メディエーターの分泌を評価したところ、IL-6、IL-8、VEGF、CCL2、MMP-3 などは TNF で強く誘導されたが、この中で TET3-ko で抑制されたのは CCL2 のみであった。また、代表的な接着分子である VCAM-1、ICAM-1 発現をフローサイトメトリーで評価したところ、TNF 誘導性の ICAM-1 発現は TET3-ko によって抑制された。FLS における TNF 誘導性の RANKL は TET3-ko で抑制されなかった。TNF 依存性の CCL2、ICAM-1 発現誘導は mRNA レベルでも同様の結果を示した。

(4) 関節炎における TET タンパク質の役割を評価するため、CL57BL/6 マウスにおいて K/BxN 血清による関節炎誘導の有無で、滑膜

組織における 5mC、5hmC 及び TET1,2,3 の発現を免疫染色で評価した。5mC、5hmC は両群で軟骨細胞に、K/BxN-WT では滑膜組織にも発現した。TET1 の発現は両群でごく軽度で、TET2 は K/BxN-WT で様々な細胞に発現し、TET3 は K/BxN-WT において特に浸潤性の強い滑膜部位で発現を認めた。この炎症性パルスにおける TET3 の役割を評価するため、TET3 ヘテロノックアウト (TET3^{-/+}) マウスに K/BxN マウス血清で関節炎を惹起して、K/BxN-WT と比較した。TET3^{-/+} マウスでは初期の関節炎スコアは K/BxN-WT と同等だったが、day8 以降は関節炎スコアの上昇を認めず、chronic-phase での関節炎の悪化を抑えることで重症度を抑制した。組織学的評価でも TET3^{-/+} マウスでは滑膜炎・滑膜増殖、骨破壊は有意に抑制され、軟骨ダメージも軽減傾向であった。マイクロ CT でも、K/BxN-WT では足関節に著明な骨びらんが観察され、TRAP 染色でも同様の部位において、炎症滑膜と骨との境界部分に TRAP 陽性破骨細胞様細胞が散在していたが、TET3^{-/+} マウスではこの様な部位はほとんど観察されなかった。

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 1 件)

中野和久、田中良哉、関節リウマチ滑膜における DNA メチル化と TET 分子、Keynote R・A、査読無、5 巻、2017、9-13

〔学会発表〕(計 6 件)

河邊明男、中野和久、山形薫、阪田圭、中山田真吾、田中良哉、持続的炎症刺激による滑膜細胞の表現型変化における DNA 脱メチル化酵素 TET3 の役割と TET3 阻害による関節炎制御、第 60 回日本リウマチ学会 (2016/4/21-4/24)、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

河邊明男、中野和久、山形薫、阪田圭、中山田真吾、田中良哉、持続的炎症刺激による線維芽細胞様滑膜細胞 (FLS) の表現型変化における DNA 脱メチル化酵素 TET3 の役割と TET3 阻害による関節炎制御、第 37 回日本炎症・再生学会 (2016/6/16-6/17)、みやこめっせ (京都

府京都市)

河邊明男、中野和久、山形薫、阪田圭、中山田真吾、田中良哉、関節リウマチ滑膜細胞は炎症性サイトカイン誘導性のDNA脱メチル化酵素TET3を介して骨・軟骨破壊を促進する、第2回日本骨免疫学会(2016/7/6-7/8)、ホテルモントレ沖縄スパ&リゾート(沖縄県那覇市)

河邊明男、中野和久、山形薫、阪田圭、中山田真吾、田中良哉、炎症性サイトカインはリウマチ滑膜細胞にDNA脱メチル化酵素TET3依存性に骨・軟骨破壊を促進する、第34回日本骨代謝学会(2016/7/20-7/23)、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

河邊明男、中野和久、山形薫、阪田圭、中山田真吾、田中良哉、持続的炎症刺激による線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)の表現型変化におけるDNA脱メチル化酵素TET3の役割とTET3阻害による関節炎制御、第44回日本臨床免疫学会(2016/9/8-9/10)、京王プラザホテル(東京都新宿区)

Kazuhisa Nakano, Akio Kawabe, Kei Sakata, Kaoru Yamagata, Shingo Nakayamada, Yoshiya Tanaka, The epigenetic induction of aggressive phenotype of fibroblast-like synovial cells (FLS) in rheumatoid arthritis (RA), the role of DNA demethylation enzyme TET3, 第8回国際関節リウマチフォーラム, 2016/10/21-10/22, 品川プリンスホテル(東京港区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 和久 (NAKANO, Kazuhisa)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50406500