

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08634

研究課題名（和文）ゲノム研究に基づく関節リウマチの新規医療の基盤開発

研究課題名（英文）Development of new drug target for rheumatoid arthritis based on GWAS

研究代表者

鈴木 亜香里（Suzuki, Akari）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：00391996

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）：GWASにより同定されたPADI4遺伝子欠損マウスを用い、CIA実験を行ったところ、欠損マウスではスコアの低下、炎症性サイトカインの減少が見られた。PADI4遺伝子を欠損させることでPADI2、PADI6遺伝子が誘導され、PADI4の機能的欠損を補っている可能性が示唆された。PADI4とPADI2を同時に欠損するマウスを作成し、関節炎発症を検証している。また、ヒト関節炎の発症メカニズムを知るために、関節炎モデルマウスの免疫組織の時系列ホールトランスクリプトーム解析を行っている。これらの解析により関節リウマチ関連遺伝子として同定された遺伝子群がどのような挙動を示すかが明らかにすることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GWASによる多因子性疾患の原因またはリスクとなる遺伝子の同定はすでに確立した手法となり、検体数を増やし、より効果の小さい遺伝子の同定を行うことも容易となった。一方で発見された遺伝子がどのようなリスクを及ぼすか明らかになるケースは少ない。本研究ではモデル動物を用いることで疾患の原因となることを証明できたが、非常に時間がかかる。そこでモデル動物の時系列解析データを用い、リスク遺伝子全体の疾患への関与タイミングがわかると考えている。ヒトでは疾患になる前から遺伝子変化をモニターすることはできないため、モデル動物をつかって発症に伴ってリスク遺伝子がどのように変動するか調べることは非常に高い意義がある。

研究成果の概要（英文）：PADI4KO mice were used for CIA as a mouse model of RA. We observed reductions of arthritis score and inflammatory cytokines. In PADI4KO mice, PADI4 gene is functionally compensated by the expression of PADI2 and PADI6. Because PADI2 was also identified as risk gene by GWAS, we used mice lacking the PADI2 gene for CIA experiments and similar reduction of arthritis scores to the PADI4 knockout experiment. However, the induction of other PADI genes observed in PADI4 did not occur, and no clear cytokine effects were observed in CIA using PADI2KO mice. These data suggest that PADI2 may influence the development of rheumatoid arthritis not only by itself but also in conjunction with PADI4. It is supposed that double knockout of PADI2 and PADI4 genes may be more strongly suppressed arthritis. Furthermore, to clarify the relationship between GWAS-related genes in arthritis, we perform a time-series whole transcriptome analysis of tissues related with arthritis of SKG mice.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：関節リウマチ 抗シトルリン化抗体 関節炎マウス GWAS リスク遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は多因子性疾患として知られており、その発症機序は、遺伝的要因、環境要因が複雑に絡み合うと考えられている。そのひとつである関節リウマチは免疫システムの異常により関節の炎症が引き起こされ、関節痛や関節の変形が生じる高齢者に多く見られる代表的な膠原病である。近年は生物学的製剤により寛解状態を得られるようになっては来ているが、中には治療効果の得られない患者も3割ほどみられ、完全な治癒はいまだに難しいのが実情であり、長期間の治療を余儀なくされているケースが多い。我々は、これまで国際連携の上、行われた大規模ゲノムワイド関連解析法(GWAS)により、関節リウマチ患者のゲノム解析し、101個の原因遺伝子の同定に大きく寄与してきた。その結果、GWASにより、人種特異性や自己免疫疾患の原因遺伝子の共通性など多くのことがわかったが、どのような遺伝子がどのように生体内で作用することで関節リウマチ発症にいたるのかについては、依然として不明のままである。疾患発症メカニズムの解明は治療法の開発においてもっとも必要なものであり、そのためにも遺伝的要因の発症における関与を解明する必要がある。GWASによって同定された疾患関連遺伝子のノックアウトマウス解析や培養細胞を用いた遺伝子発現解析実験を通じ、GWASによって同定される一つ一つの遺伝子の効果は量的に小さく、疾患発症の全体を説明することが難しいことがわかった。疾患の発症メカニズムを解明するためには、これらの疾患関連遺伝子群が全体としてどのようにコントロールされ、発現し、量的に変化していくのかを知る必要がある。それと同時に、一つ一つの量的な変化が、最終的には質的な変化としての疾患発症につながっていく機序を明らかにするためには経時的な変化を観察する必要がある。しかしながらヒトの組織を用いた解析は制約が多く、得られる組織についても、進行が進み、炎症後期に得られるものしかなく、発症や進行に伴う変化を同定することは不可能である。進行に伴う遺伝子の変化を知るためにはモデル動物を用いる実験が必要である。モデル動物を用いた発症実験で、経時的な変化を各タイムポイントにおいてサンプリングし、各関連組織について遺伝子発現量解析し、発症までに発現の変化している遺伝子を同定する。また公共データベース上の転写因子の結合情報や、クロマチン免疫沈降によるエピゲノム情報を統合することで、対象となる遺伝子群がどのような転写因子によってコントロールされているかを明らかにできる。マウスの組織における遺伝子発現量は最終的にタンパク量、シグナル強度の測定のためのサンプリングも可能であるため、量的な変化が質としての変化に変わるかどうかを検証することが可能である。また、マウスのデータとGWASデータを最終的に統合し、ヒト疾患関連遺伝子がどのような遺伝子発現量変化によりコントロールされるかを比較推定する。本手法により、関節リウマチ治療薬の開発は関節リウマチだけではなく、様々な疾患モデルマウスを解析対象とすることによって、多因子性疾患全体の克服のために役立つと考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではポストゲノムワイド関連解析(GWAS)の研究の一環として、自己免疫疾患のひとつである関節リウマチ(rheumatoid arthritis; RA)発症、進行に関連する遺伝子要因の関与を解明し、その成果に基づく自己免疫疾患の新たな治療薬候補の創出を目的とする。この目的に向け、これまでに同定された関節リウマチ関連遺伝子に関する機能解析のため、モデルマウスを使って検証し、GWASで同定される遺伝子が関節リウマチの原因となりうるかを証明する。関節リウマチのモデル動物を用いた時系列ホールトランスクリプトーム解析を実施する。関節リウマチ発症に伴い変動する新規遺伝子の同定とともに、関節リウマチ関連遺伝子として同定された遺伝子群がどのような変動をするか、詳細に調べる。対象組織としては、関節リウマチ疾患発症に関与するリンパ球細胞や主要病変組織である関節滑膜とし、疾患の発症と進行に伴って生じる経時的変化を遺伝子発現レベルで追跡する。また炎症にかかわるサイトカイン量やスコアとの相関を解析する。

3. 研究の方法

1) GWASにより同定された関節リウマチ関連遺伝子のノックアウトマウスの作成

GWAS関連遺伝子として同定された Padi4 遺伝子をノックアウトし、コラーゲン誘導モデルマウス実験を行なう。GWASでは Padi4 遺伝子以外にも Padi 遺伝子ファミリーの一つである Padi2 の関与を示唆するデータも得られているため、Padi2 遺伝子ノックアウトマウスも作成し、同様にコラーゲン誘導モデルマウス実験を行う。これらの遺伝子に関するダブルノックアウトマウスを作成し、関節リウマチと Padi 遺伝子群の関係をしらべる。

2) 関節リウマチモデルマウスにおける時系列解析による、疾患発症メカニズムの解明

関節リウマチモデルマウスにはいくつかの種類が知られており、一つは自然発症モデルマウス、もう一つは疾患誘導モデルマウスである。まずは自然発症モデルマウスの一つである、SKG マウスの時系列解析を行い、疾患発症に伴い変化する遺伝子群を同定する。GWASによって同定された関節リウマチ関連遺伝子群との比較、統合解析を行うことで、ヒト関節リウマチ関連遺伝子がヒトの関節リウマチ発症に伴い、生じるであろう遺伝子変動を推定することが可能になると考えている。

4. 研究成果

1) Padi4 ノックアウトマウスの解析

GWAS により関節リウマチ関連遺伝子として同定された遺伝子の一つである、PADI4 遺伝子のマウスホモログである Padi4 遺伝子をノックアウトし、関節炎誘導を行った。GWAS やヒト関節リウマチから推定される Padi4 の関節リウマチにおける機能は、Padi4 の亢進により、体内のシトルリン化タンパクが増え、それが抗原となり、抗シトルリン化ペプチド抗体 (ACPA) が生じるのではないかと考えられている。しかしながら、マウスにおける ACPA の存在ははっきりせず、関節炎の前後においてヒトで観察されるような明確な上昇は見られない。マウスでは ACPA の微弱な上昇はあるが、それがシトルリン化タンパクに対する抗体なのか、ほかのタンパクに対してできた抗体の交差反応であるか、定かではない。Padi4 マウスのバックグラウンドを関節リウマチ誘導実験に適した DBA1J に変更し、コラーゲンによる関節炎誘導を行い、野生型のマウスと比較し、検証をしたところ、1) 関節炎スコアの低下 (図 1A)、2) 炎症性サイトカインの減少 (図 1B, C)、3) CII 抗体価の低下 (図 1D) が認められた。しかしながら 4) CCP 抗体価の有意な上昇は観察されなかった。また、Padi4 ノックアウトマウスでは Padi2 と Padi6 の相補的な誘導が生じており (図 2)、Padi4 が失われると、その機能を Padi2 (図 2A) あるいは Padi6 (図 2B) が補っている、と考えられる。Padi1 と Padi3 については変化がみられなかった。Padi4 遺伝子はほかの Padi 遺伝子と異なり、核移行シグナルをもっており、ヒストンメチル化を脱メチル化する機能があることも知られている。また、転写活性化に直接影響していることがわかっている。Padi4 により転写調節を受けるとされる遺伝子群ははっきりしておらず、シトルリン化により直接様々な関節炎にかかわる遺伝子を調節している可能性が考えられる。

図 1 A

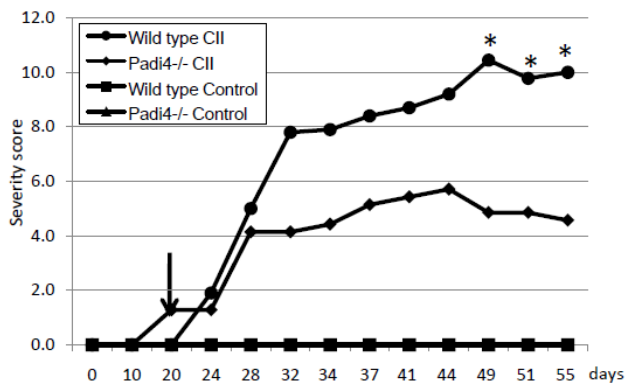


図 1 B

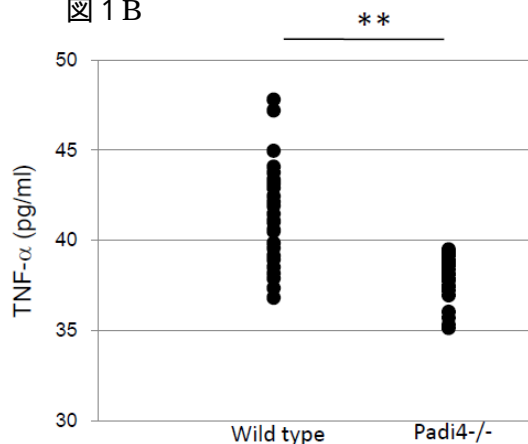


図 1 C

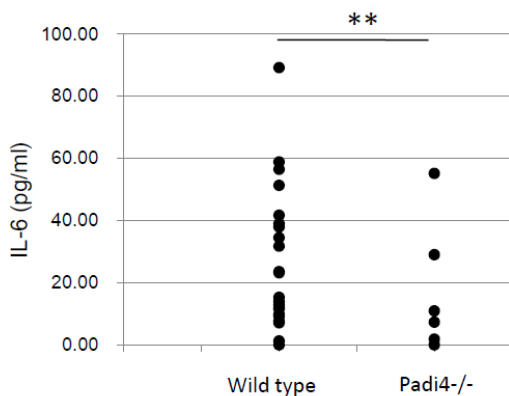


図 1 D

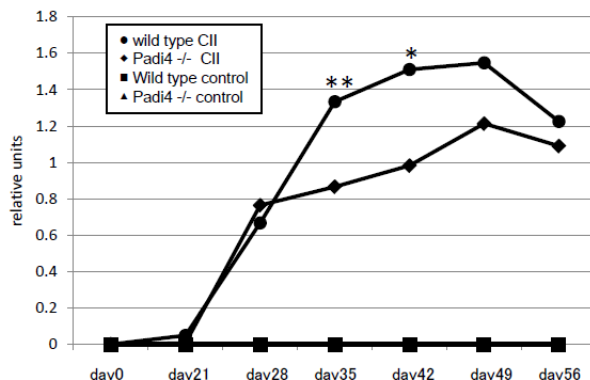


図 2A (Padi2)

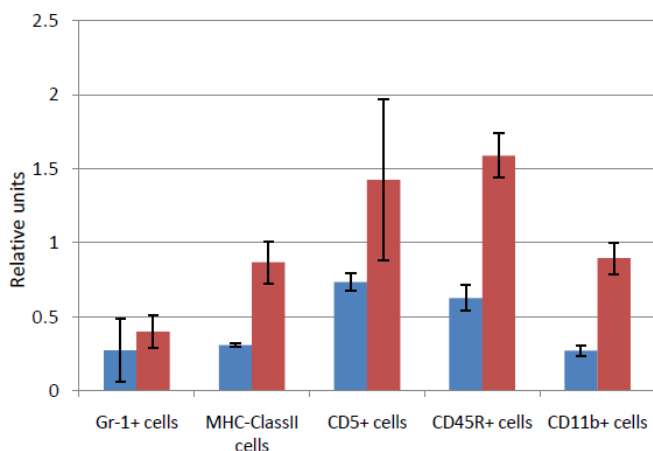
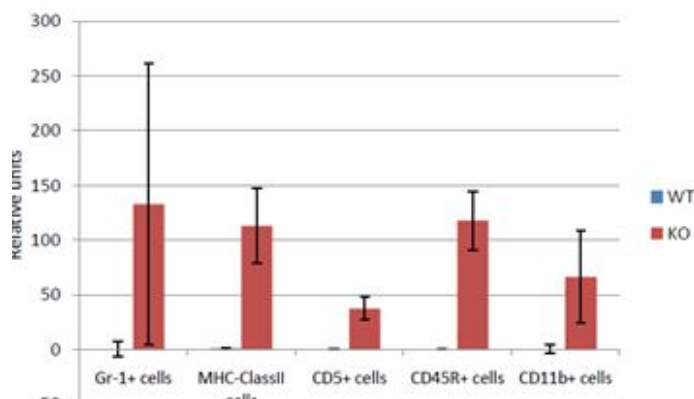


図 2B (Padi6)



2) Padi2 ノックアウトマウスの解析

Padi2 ノックアウトマウスを作成し、コラーゲン誘導モデルマウス解析を行ったところ、関節炎スコアの低下が観察された。しかしながら Padi4 ノックアウトマウスとは異なり、他の Padi 遺伝子の誘導は観察されなかったことから、Padi4 と相互的に機能を補完しているわけではないことが判明した。サイトカインの誘導についても遺伝子発現量レベルでは観察されなかった。関節炎スコアの低下以外に明確な関節炎との関連は発見されなかった。

3) Padi4 Padi2 ダブルノックアウトマウスの作成

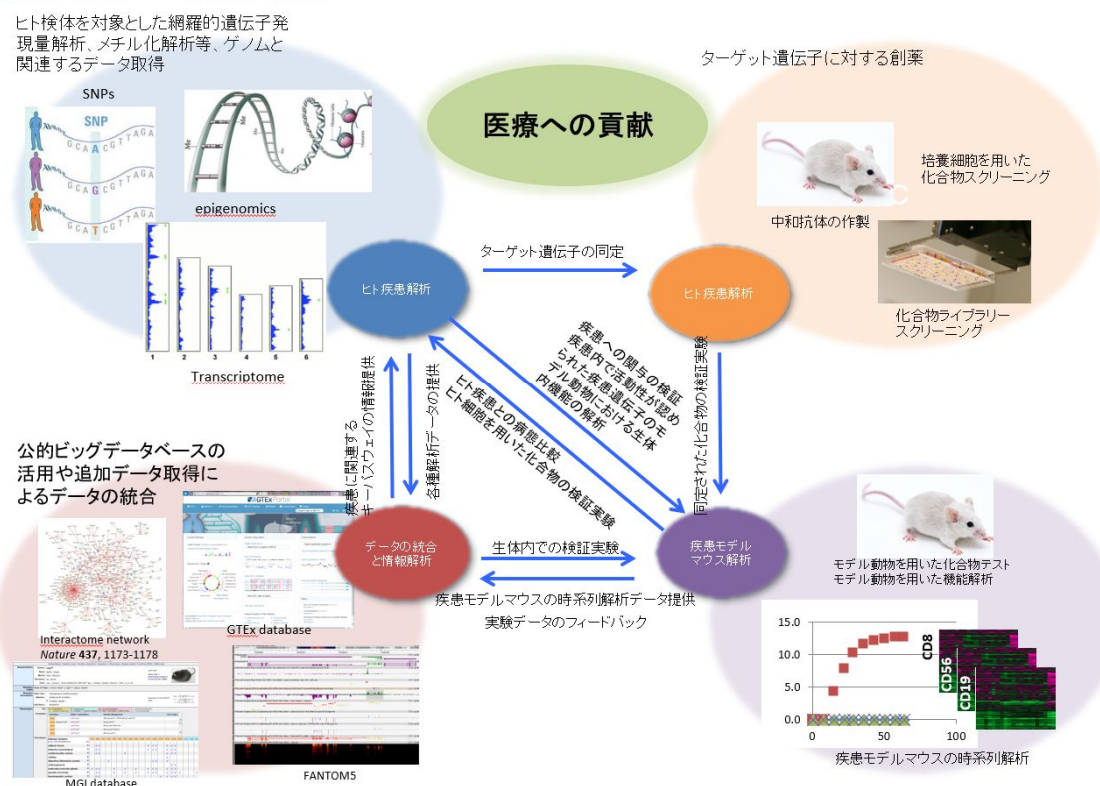
Padi4 は Padi2 により機能的な補完が見られるのであれば、Padi2 をダブルノックアウトすることによりさらに関節炎の低下がみられる可能性がある。しかしながら、Padi6 のノックアウトマウスが胎生致死であったことよりダブルノックアウトマウスは胎生致死の可能性があるため、Padi4 ノックアウトマウスを Cre-Conditional ノックアウトマウスとして作成し、ダブルノックアウト作成後にそれぞれ関連のある血球組織（マクロファージや CD4T 細胞、好中球）で特異的に発現する遺伝子のプロモーターに Cre をつないだマウスと掛け合わせることで組織特異的なノックアウトマウスを作成し、Padi4 と Padi2 のダブルノックアウトマウスの関節炎発症を観察する。それにより関節リウマチの創薬ターゲットとして、Padi4 と Padi2 を同時に抑制することが重要である可能性を明らかにできる。

4) 関節炎モデルマウスを用いた時系列解析

ヒト検体を用いて発症前の様々な関連組織のステイタスを観察することは不可能であるが、モデルマウスの場合には発症前から発症後の経過に至るまで、すべて観察することが可能である。主要な関節炎モデルマウスとしては自然発症モデルマウスと関節炎誘導型モデルマウスが存在しているが、前者としてはよく使われている SKG マウスを解析対象とし、後者はコラーゲン誘導モデルマウス、ないしはコラーゲン抗体誘導モデルマウスの利用を検討している。SKG マウスで実験をしたところ DBA1J マウスを用いて関節炎を引き起こし、発症前、発症初期（day7）、発症中期（day21）、発症後期（day35）の 4 点をタイムコースとして、サンプルを収集し、ホールトランスクリプトミクス解析を行った。しかしながら、マウスの遺伝的背景が Balb/c の場合、レファレンスデータが B6 以外のマウスでは十分ではないこと、また、リード長が短いとマッピング率が下がり、十分なデータを取ることができないことから、B6 バックグラウンドにバッククロスで遺伝的背景を変更し、再度実験を行っている。これらのデータはヒト GWAS などのマルチオミクスデータと統合し、ビッグデータを用いた解析により、これまで解析することができなかった発症前に生体内で生じる分子生物学的イベントを明確にし、より早い段階での診断、より正確な診断、治療を目指した基盤解析研究の一環として今後も継続して実施をしたい（図 3）。

図 3

創薬・診断への橋渡し研究



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okubo Koshu, Kurosawa Miho, Kamiya Mako, Urano Yasuteru, Suzuki Akari, Yamamoto Kazuhiko, Hase Koji, Homma Koichiro, Sasaki Junichi, Miyauchi Hiroaki, Hoshino Tatsuo, Hayashi Matsuhiko, Mayadas Tanya N, Hirahashi Junichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 232 ~ 238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/nm.4462	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 Okada Yukinori, Eyre Stephen, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Yamamoto Kazuhiko	4. 巻 78
2. 論文標題 Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 446 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213678	査読の有無 無
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 Koshu Okubo, Miho Kurosawa, Mako Kamiya, Yasuteru Urano, Akari Suzuki, Kazuhiko Yamamoto, Koji Hase, Koichiro Homma, Junichi Sasaki, Hiroaki Miyauchi, Tatsuo Hoshino, Matsuhiko Hayashi, Tanya N. Mayadas, Junichi Hirahashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Macrophage extracellular chromatin release induced by Mac-1 mediated platelet-macrophage interactions triggers acute kidney injury in rhabdomyolysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat. Med.	6. 最初と最後の頁 232-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4462	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 Chizu Tanikawa, Koji Ueda, Akari Suzuki, Aritoshi Iida, Ryoichi Nakamura, Naoki Atsuta, Genki Tohnai, Gen Sobue, Naomi Saichi, Yukihide Momozawa, Yoichiro Kamatani, Michiaki Kubo, Kazuhiko Yamamoto, Yusuke Nakamura, Koichi Matsuda	4. 巻 22
2. 論文標題 Citrullination of RGG motifs in FET proteins by PAD4 regulates protein aggregation and ALS susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1473-1483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.031	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 Akari Suzuki, Yuta Kochi, Hirofumi Shoda, Yu Seri, Keishi Fujio, Tetsuji Sawada, Ryo Yamada and Kazuhiko Yamamoto	4. 巻 17
2. 論文標題 Decreased Severity of Experimental Autoimmune Arthritis in Peptidylarginine Deiminase Type 4 Knockout Mice.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 205-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-016-1055-2	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

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Akari Suzuki, Yuta Kochi, Hirofumi Shoda, Keishi Fujio, and Kazuhiko Yamamoto
2. 発表標題 Functional study of Peptidylarginine Deiminase genes in arthritis model mice
3. 学会等名 ASHG 68th Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akari Suzuki, Yuta Kochi, Hirofumi Shoda, Keishi Fujio, and Kazuhiko Yamamoto
2. 発表標題 Functional study of Peptidylarginine Deiminase genes in arthritis model mice
3. 学会等名 ESHG 51th Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akari Suzuki
2. 発表標題 Reduced Severity of Collagen-induced Arthritis in Peptidylarginine Deiminase Type 4 Knockout Mice
3. 学会等名 American Society of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akari Suzuki
2. 発表標題 Decreased Severity of Experimental Arthritis in Peptidylarginine Deiminase Type 4 Knockout Mice
3. 学会等名 European Society of Human Genetics (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akari Suzuki
2. 発表標題 Phenotypic analysis of Peptidylarginine deiminase type 4 knock-out mice
3. 学会等名 Human Genome Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 亜香里
2. 発表標題 Decreased Severity of Experimental Autoimmune Arthritis in Peptidylarginine Deiminase Type 4 Knockout Mice
3. 学会等名 ESHG 49th Annual Meeting 2016, Barcelona, Spain (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木 亜香里
2. 発表標題 Decreased Severity of Experimental Autoimmune Arthritis in Peptidylarginine Deiminase Type 4 Knockout Mice
3. 学会等名 ASHG2016, Vancouver, Canada (国際学会)
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----