

令和元年6月20日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09903

研究課題名(和文) 関節リウマチ滑膜細胞におけるクロマチンの立体的構造に基づく転写制御異常機構の解明

研究課題名(英文) Aberrant gene transcription based on chromatin structure in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)はいまだ原因が完全には解明されていない根治の難しい関節炎疾患である。RAにおけるエピジェネティクス制御異常の全体像を明らかにするために、RAの滑膜線維芽細胞(SFs)においてクロマチン構造と転写因子の相互作用による遺伝子転写異常の機構を調べた。ヒストン修飾の状態をChIP-seq法により検討する事により、RASFsのクロマチン構造の解析を行った。次に、FAIRE-seq法によりオープン・クロマチンな状態である転写制御領域の同定を行った。この転写制御領域に存在する転写因子モチーフの解析を行い、RASFs特異的な転写因子としてSOX11を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチ(RA)特異的な転写因子としてSOX11を同定したが、SOX11はRA線維芽細胞(SF)の活性化に必要な事が示唆される。つまり、SOX11を標的とした治療を行う事によりSOX11の機能を低下させる事ができれば、RASFsの活性化を抑制する事が期待される。このように、今回の結果は新規のRA治療につながる重要なものである。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) is a disease in which the etiology is unknown and the treatment is difficult. To elucidate epigenetic dysregulation in RA, we examined the mechanisms of aberrant gene transcription based on the interaction of chromatin structure and transcription factors (TFs) in RA synovial fibroblasts (SFs). We analyzed chromatin structure by investigating histone modifications with ChIP-seq in RASFs. We examined open chromatin regions that regulate gene transcription by FAIRE-seq. We identified SOX11 as a RASF-specific TF by analyzing TF consensus motifs of the regions.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：関節リウマチ エピジェネティクス クロマチン ヒストンメチル化 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節リウマチ (RA) は、関節に炎症を起こす原因不明の自己免疫疾患であり、進行性に骨破壊を来し、完全に治癒する事は難しい。最近、TNF 阻害薬などの生物学的製剤が開発され、RA の治療にブレイクスルーが起きた。これらは多数の RA 患者に有益である一方、一部の RA 患者には無効であり、また非常に高価な治療であるため医療経済を逼迫する問題を抱えている。そのため、RA の病態の解明、及び新しい治療法の開発が切望されている。

(2) 双生児や家族内発症に関する研究、HLA-DRB1 との関連や shared epitope の同定、genome-wide association studies (GWAS) による RA 疾患感受性遺伝子の同定などから、RA の病態における遺伝的要因の関与は明らかである。一方、喫煙、ウイルス感染、*Porphyromonas gingivalis* 感染などの環境要因も報告されてきた。しかしながら、これらの要因だけでは RA の病態を完全に説明できず、環境要因と関連するエピジェネティクス制御の異常が注目されている。エピジェネティクスとは、遺伝子配列とは無関係に遺伝子転写を制御する機構を意味し、DNA メチル化、ヒストン修飾、ノンコーディング RNA などが知られている。

2. 研究の目的

(1) RA はいまだ原因が完全には解明されていない根治の難しい関節炎疾患である。RA におけるエピジェネティクス制御異常の全体像を明らかにするためには、クロマチン構造と転写因子（複合体）の相互作用による遺伝子転写異常の機構を解明する必要がある。その結果、RA 滑膜線維芽細胞 (SFs) において遺伝子転写が異常となり活性化を来す仕組みが判明する。本研究では、クロマチンの立体的構造という新しい視点から、RA における遺伝子転写の制御異常の病態を解明する事を目的とする。これらの成果により、RA の病態としてエピジェネティクス制御の異常を明らかにし、将来的に新規治療の開発へとつながる事が期待される。

(2) RA においてエピジェネティクス制御異常により遺伝子発現に変化が起きている可能性を考え、申請者らは RA におけるエピジェネティクス制御異常を検討してきた。その結果、RASFs において MMP 遺伝子におけるヒストンメチル化の異常による転写活性化、IL-6 遺伝子におけるヒストンアセチル化の異常による転写活性化をこれまで明らかにしてきた。

(3) RA における異常な遺伝子活性化の原因を明らかにするためには、転写制御に異常を来す機構を解明する必要がある。そのアプローチとして、クロマチン構造の解析と同時に、ゲノム DNA の転写制御領域に結合する転写因子を明らかにする。クロマチン構造にはユークロマチン（緩んだ状態で、遺伝子転写活性化が起きる）とヘテロクロマチン（凝縮した状態で、遺伝子転写抑制につながる）があり、これらはヒストン修飾により調べる事が可能である。転写因子は、転写制御領域（プロモーター領域、エンハンサー領域）を同定する事により既知・未知のものを見つける事ができる。本研究により、RASFs における遺伝子転写制御異常の全体像を解明する。

3. 研究の方法

(1) 抗体と試薬

抗 H3K4me1 抗体は Active Motif 社より購入した。抗 H3K27ac 抗体は Upstate 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、RA および変形性関節症 (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°C 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°C、5% CO₂ 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。

(3) FAIRE-seq 法

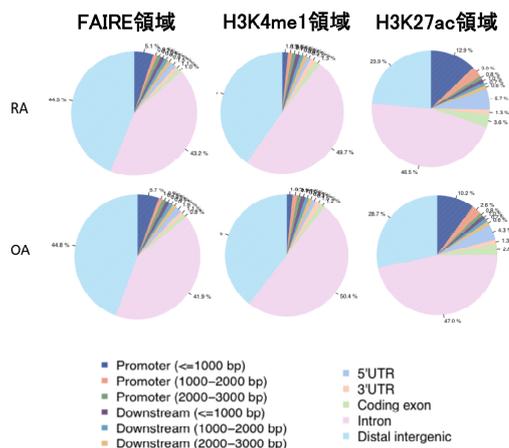
SFs を 0.1% ホルムアルデヒドによる処理後、界面活性剤により細胞を溶解し、核蛋白を抽出した。超音波処理によりゲノム DNA を断片化し、フェノール・クロロホルム処理をして蛋白と結合していない DNA を抽出した。得られた DNA 断片の塩基配列を次世代シーケンサーにより決定した。

(4) クロマチン免疫沈降 (ChIP) -seq 法

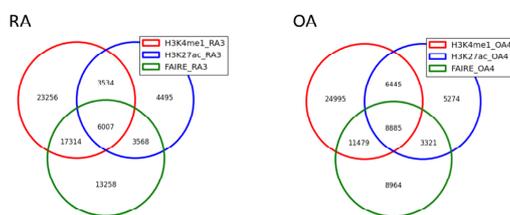
0.1% ホルムアルデヒドによる処理後、ヒストン修飾特異的抗体を用いて免疫沈降反応を行った。回収された複合体を洗浄し、1mg/ml proteinase K および 0.3% SDS にて処理を行い、複合体から DNA を分離した。フェノール・クロロホルムにて DNA を抽出し、エタノール沈殿により DNA を精製した。得られた DNA 断片の塩基配列を次世代シーケンサーにより決定した。

4. 研究成果

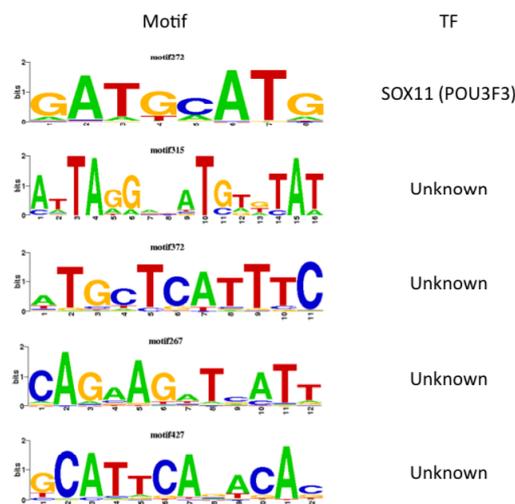
(1) RASFs における転写制御領域の同定：我々は、RASFs における転写制御異常の機構を明らかにするために、クロマチン構造の解析により転写制御領域の同定を行った。転写制御領域とはユークロマチンの領域であり、FAIRE-seq 法によりオープン・クロマチンの領域 (FAIRE 領域) として同定できる。別の手段として、H3K4me1 や H3K27ac のヒストン修飾が濃縮される領域 (エンハンサー) として ChIP-seq 法により同定できる。右図に示す通り、FAIRE 領域、H3K4me1 領域、H3K27ac 領域ともに Intron と Distal intergenic の領域が大半を占めた。転写制御領域は主にこの2つの領域に存在する事が示唆された。OA と RA において FAIRE 領域、H3K4me1 領域、H3K27ac 領域の分布に大きな差異は認められなかった。また、H3K27ac の領域は Promoter にも存在した。



(2) RASFs における FAIRE 領域、H3K4me1 領域、H3K27ac 領域の重なるの解析：(1) で同定した FAIRE 領域、H3K4me1 領域、H3K27ac 領域がどの程度重なるかを解析した結果を、右のベン図に示す。RASFs において、40147 個の FAIRE 領域、50111 個の H3K4me1 領域、17604 個の H3K27ac 領域のすべてが重複する領域として 6007 個が同定された。一方、OASFs において、32649 個の FAIRE 領域、51804 個の H3K4me1 領域、23925 個の H3K27ac 領域のすべてが重複する領域として 8885 個が同定された。



(3) RASFs 特異的な転写因子の同定：RASFs と OASFs で同定した転写制御領域に存在する転写因子のコンセンサス・モチーフの解析を HOMER のソフトを用いて解析した。その結果、RASFs 特異的に存在する既存の転写因子のモチーフとして SOX11 が見つかった (右図)。転写因子 SOX11 は RASFs における遺伝子転写制御の異常に関与している事が推測される。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ikuma D, Hiromura K, Kajiyama H, Suwa J, Ikeuchi H, Sakairi T, Kaneko Y, Maeshima A, Kurosawa H, Hirayama Y, Yokota K, Araki Y, Sato K, Asanuma YF, Akiyama Y, Hara M, Nojima Y, Mimura T. The correlation of urinary podocytes and podocalyxin with histological features of lupus nephritis. *Lupus*. 査読有. 27(3). 2018. 484-93
DOI:10.1177//0961203317734918
- ② Araki Y, Aizaki Y, Sato K, Oda H, Kurokawa R, Mimura T. Altered gene expression of histone lysine methyltransferases and demethylases in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Clin Exp Rheumatol*. 査読有. 36(2). 2018. 314-6
<https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=11175>
- ③ Araki Y, Mimura T. Matrix metalloproteinase gene activation resulting from disordered epigenetic mechanisms in rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci*. 査読有. 18(5). 2017. 905
DOI:10.3390/ijms18050905
- ④ Araki Y, Mimura T. The histone modification code in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Mediators Inflamm*. 査読有. 2017. 2608605

⑤荒木靖人、関節リウマチ滑膜におけるヒストンメチル化と IL-6 誘導による MMP 遺伝子 (特集 関節リウマチ滑膜の biology update)、Keynote R・A、査読無、5(1)、2017、14-18
http://www.sentan.com/products/detail.php?product_id=600

⑥Araki Y, Mimura T. The mechanisms underlying chronic inflammation in rheumatoid arthritis from the perspective of the epigenetic landscape. *J Immunol Res*. 査読有. 2016. 6290682
DOI:10.1155/2016/6290682

⑦Araki 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

[学会発表] (計 11 件)

①荒木靖人、岡元啓太、相崎良美、黒澤奈津子、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における H3K4 メチル基転移酵素によるケモカイン遺伝子活性化の機構、第 15 回 RCGM フロンティアシンポジウム、2017 年 12 月 1 日、埼玉医科大学日高キャンパス 創立 30 周年記念講堂 (埼玉県日高市)

②荒木靖人、和田琢、相崎良美、油谷浩幸、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活性化の機構、第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会、2017 年 5 月 23 日、学術総合センター 一橋講堂 (東京都千代田区)

③荒木靖人、相崎良美、横田和浩、梶山浩、舟久保ゆう、佐藤浩二郎、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 H3 リシン 4 メチル基転移酵素によるケモカイン遺伝子転写制御の異常、第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017 年 4 月 21 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

④Araki Y, Mimura T. Histone lysine methylation and STAT3 differentially regulate constitutive and IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Keystone symposia, Epigenetics and human disease: progress from mechanisms to therapeutics*. January 30, 2017. Sheraton Seattle Hotel, Seattle, Washington, USA

⑤Y. Araki, N. Kurosawa, Y. Aizaki, H. Oda, R. Kurokawa, T. Mimura. H3K4 methyltransferases regulate chemokine gene transcription in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier*. November 12, 2016. Commemoration Hall, Saitama Medical University, Saitama, Japan

⑥Y. Araki, TT. Wada, Y. Aizaki, K. Sato T. Mimura, Histone lysine methylation and STAT3 differentially regulate constitutive and IL-6-induced MMPs gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts、第 45 回日本免疫学会総会・学術集会、2016 年 12 月 6 日、沖縄コンベンションセンター・ラグナガーデンホテル (沖縄県宜野湾市)

⑦Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Yokota K, Kajiyama H, Asanuma YF, Sato K, Oda H, Mimura T. Histone lysine methylation and STAT3 differentially regulate constitutive and IL-6-induced MMPs gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2016*. November 14, 2016. Washington DC Convention Center, Washington DC, USA

⑧Aizaki Y, Araki Y, Sato K, Yokota K, Mimura T. Histone methylation in $\gamma\delta$ T cells as a biomarker of Behcet's disease activity. *American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2016*, November 13, 2016. Washington DC Convention Center, Washington DC, USA

⑨荒木靖人、和田琢、相崎良美、佐藤浩二郎、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メチル化と STAT3 による IL-6 誘導性 MMP 遺伝子活性化、第 2 回日本骨免疫学会、2016 年 7 月 7 日、ホテルモンテ沖縄スパ&リゾート (沖縄県国頭郡)

⑩Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Kajiyama H, Yokota K, Sato K, Asanuma YF, Kim YT, Oda H,

Mimura T. Altered profiles of histone lysine methylation affect MMP gene transcription in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2016. June 10, 2016. ExCel London, London, UK

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）

〔図書〕（計 1 件）

①Araki Y, Mimura T. Chapter 12: Epigenetic Basis of Autoimmune Disorders in Humans. Epigenetics in Human Disease, 2nd edition. Edited by Trygve O. Tollefsbol. Elsevier. 2018. pp353-386

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
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>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：荒木 靖人

ローマ字氏名：(ARAKI, yasuto)

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：10580839

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。