

令和 5 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：2019～2022

課題番号：19K08888

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるヒストンメチル化酵素の機能異常の解明及び治療標的としての確立

研究課題名(英文) Functional abnormality and therapeutic possibility of histone methyltransferases in rheumatoid arthritis

研究代表者

荒木 靖人 (ARAKI, Yasuto)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10580839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はエピジェネティクスの観点から関節リウマチ(RA)の病態を解明し新規治療への足がかりを得る事である。ヒストンH3K4のメチル基転移酵素MLL1の発現がRA滑膜細胞(SFs)において上昇していた。MLL1の発現抑制によりIL-6、IL-15、CCL2、CCL5、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CX3CL1の発現が低下し、プロモーターのH3K4me3も低下した。MLL1阻害剤MM-102にてRASFsを処理したところCCL2、CCL5、CXCL9、CXCL10、CXCL11の発現が低下し、プロモーターのH3K4me3も低下し、MLL1はRAの治療標的に成りうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、完全に治癒する事は難しい。近年、生物学的製剤やJAK阻害薬が開発され、RAの治療に多大な進歩があったが、いまだ一部のRA患者には無効であり、感染症などの重篤な副作用を認め、非常に高価な治療である。そのため、RAのより新たな治療法を開発する事が切望されている。本研究では、エピジェネティクス制御異常の観点からRAの病態を解明し、新規治療への足がかりを得る事を目的とし、ヒストンH3K4のメチル基転移酵素の一つであるMLL1がサイトカインとケモカインの発現を制御しており、阻害剤を用いた実験にてRAの治療標的の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the involvement of epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) and new therapeutic target for RA. A histone H3K4 methyltransferase MLL1 was upregulated in RA synovial fibroblasts (RASFs). Upon inhibiting MLL1 expression, IL-6, IL-15, CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, and CX3CL1 expression was repressed and H3K4me3 levels were decreased in their promoters in RASFs. Treatment of a MLL1 inhibitor MM-102 repressed gene expression and H3K4me3 levels of CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in RASFs. These results suggest that MLL1 is a promising therapeutic target for RA.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：リウマチ学 エピジェネティクス ヒストンメチル化 関節リウマチ 滑膜線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 双生児や家族内における関節リウマチ (RA) 発症の研究、RA と HLA-DRB1 の強い相関、ゲノムワイド関連解析による RA 感受性遺伝子の同定などの報告から、RA の病態における遺伝的要因の関与は明らかとなった。一方、喫煙、ウイルス感染、*Porphyromonas gingivalis* 感染による歯周病などの RA における環境要因の関与も報告されてきた。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、エピジェネティクス制御の異常が近年注目されている。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する。RA において炎症のある関節では滑膜炎が起きており、滑膜線維芽細胞 (SFs) が異常に活性化している。増殖亢進、アポトーシス抵抗性、炎症性サイトカイン産生、Matrix metalloproteinases (MMPs) などの基質分解酵素産生等が認められ、性状は癌細胞と類似していると考えられている。この RASFs の活性化にエピジェネティクス制御異常が関与しているという報告が集積されつつあるが、いまだその全体像は明らかになっていない。

(2) RA などの自己免疫疾患の病態において、エピジェネティクス制御の異常が近年注目されているが、申請者はクロマチンの高次構造の観点から RA の病態解明にアプローチしてきた結果、プロモーターとエンハンサーの相互作用による遺伝子転写の制御をヒストンメチル基転移酵素 (HMTs) が行っている可能性を新たに見出した。エピジェネティクス制御には可塑性があるため、その異常を是正する事により異常な遺伝子発現を正常化しうる。よって、エピジェネティクス制御の操作により遺伝子発現を変化させる事ができれば疾患の治療に応用できる。本研究により HMTs を新たな RA の治療標的として確立できれば、エピジェネティクス制御による RA 治療への道が拓ける。

2. 研究の目的

(1) 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。近年、Tumor Necrosis Factor (TNF) 阻害薬などの生物学的製剤が開発され、RA の治療に多大な進歩があったが、いまだ一部の RA 患者には無効であり、感染症などの重篤な副作用を認める事があり、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 の病態を解明し、より新たな治療法を開発する事が切望されている。本研究では、エピジェネティクス制御異常の観点から RA の病態を解明し、新規治療への足がかりを得る事を目的とする。

(2) 申請者は RA の病態にエピジェネティクス制御異常が深く関わっているという仮説の下に、RASFs におけるエピジェネティクス制御 (主にヒストン修飾) 異常に関して研究を進めてきた。その結果、RASFs においてヒストンメチル化の異常により MMP 遺伝子の発現が亢進している事が判明した。さらに、RASFs におけるヒストンメチル化の異常の原因を明らかにするために HMTs の発現を検討したところ、RASFs において MLL1 の発現が有意に上昇していた。本研究では、これらの MLL1 が RA の病態にどのように関わっているかという事と、さらに MLL1 が RA の治療標的となるのかという事を明らかにする。そのために、RASFs において MLL1 によりエピジェネティクス制御の異常が起きる機構を解析する。その結果、MLL1 が RA の病態に深く関わっている事が判明すれば、MLL1 を標的とした RA への治療応用を確立するために、MLL1 阻害薬の RASFs への効果を調べる。このように新規の RA 治療法の開発に直結する事から、本研究は RA における医療の進歩 (病態の解明、治療の発展) に貢献できると考える。

3. 研究の方法

(1) 埼玉医科大学倫理委員会の承認下に、RA および変形性関節症 (OA) 患者より人工関節置換術時に滑膜組織を採取している。採取した滑膜組織をコラゲナーゼ (1.5 mg/ml) とヒアルロニダーゼ (0.04%) にて 37°C で 2 時間処理した後、継代培養する事により SFs を分離している。4~8 回継代した細胞を SFs として以下の実験に用いる。

(2) MLL1 に対する siRNA およびコントロール用の siRNA を Santa Cruz 社から購入した。RASFs にこれらの siRNA を Lipofectamine RNAi Max を用いて導入した。MLL1 の mRNA および蛋白発現の抑制効率を逆転写酵素反応-リアルタイム PCR (RT-PCR) 法およびウエスタン・ブロッティング (WB) 法にて確認した。WB 法では internal control として Vinculin 蛋白を用いた。RASFs を MLL1 に対する siRNA により処理した後、RA 関連遺伝子 (MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13、CTSK、CTSL、IL-6、IL-8、IL-15、IL-23A、CCL2、CCL3、CCL5、CXCL1、CXCL5、CXCL6、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CX3CL1) における H3K4me3 と mRNA 発現の変化をクロマチン免疫沈降 (ChIP) -リアルタイム PCR (ChIP-PCR) 法および RT-PCR 法にて解析した。

(3) MLL1 は WDR5 分子と複合体を形成して遺伝子のプロモーターの H3K4 をメチル化する。WDR5 阻害剤 (MM-102) は WDR5 と MLL1 の結合部位に作用して MLL1 の機能を抑制する。RASFs を MM-102 にて処理した後、RA 関連遺伝子 (MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-13、CTSK、CTSL、IL-6、IL-8、IL-15、IL-23A、CCL2、CCL3、CCL5、CXCL1、

CXCL5、CXCL6、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CX3CL1) におけるH3K4me3 と mRNA 発現の変化をクロマチン免疫沈降 (ChIP) -リアルタイムPCR (ChIP-PCR) 法およびRT-PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

(1) MLL1 siRNA 実験

RASFs において MLL1 が発現を制御する遺伝子を調べるために、MLL1 の発現を siRNA 法で抑制して実験を行った。MLL1 に対する siRNA 法により、RASFs において MLL1 の mRNA および蛋白発現が低下する事を確認した (図 1)。さらに、MLL1 に対する siRNA 法により、サイトカイン (IL-6、IL-15) とケモカイン (CCL2、CCL5、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CX3CL1) の遺伝子のプロモーターのヒストンメチル化 (H3K4me3) の低下が見られた (図 2)。同時にこれらの遺伝子発現を調べたところ低下していた (図 3)。MLL1 はヒストンメチル化の制御を介して RASFs においてサイトカインとケモカインの活性化を制御する事が示唆された。

図 1.

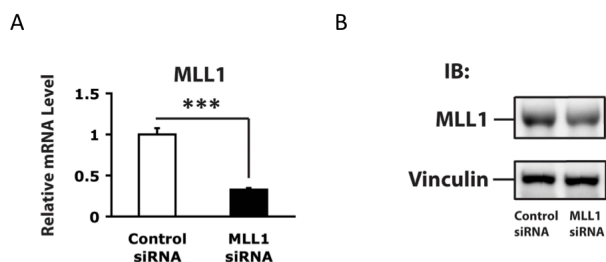


図 2.

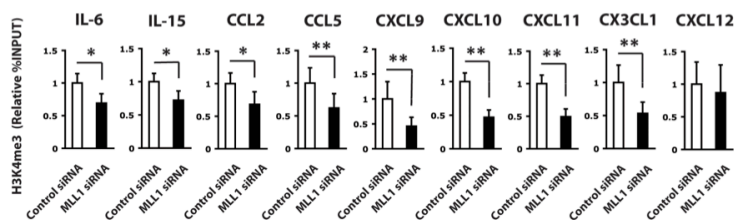
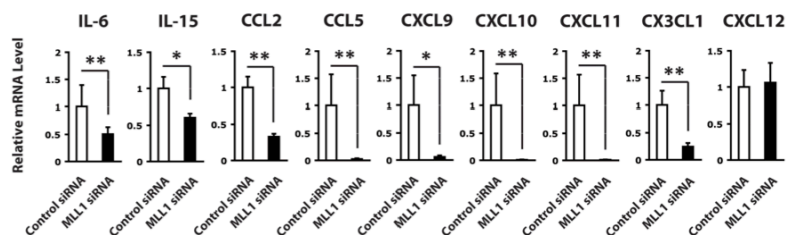


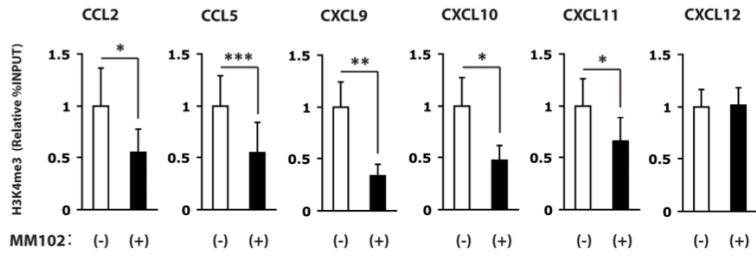
図 3.



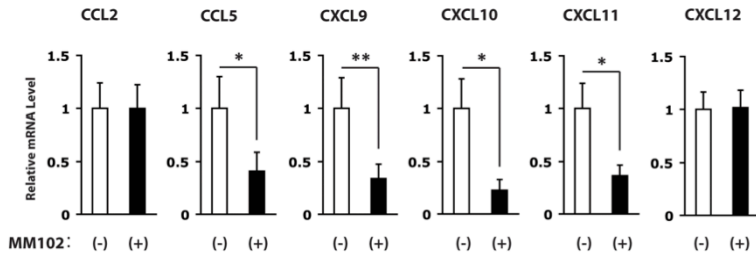
(2) MLL1 阻害剤実験

RASFs を MM-102 にて処理 (100mM, 72 時間) したところ、ケモカイン (CCL2、CCL5、CXCL9、CXCL10、CXCL11) 遺伝子のプロモーターの H3K4me3 および遺伝子発現の低下が見られた (図 4、図 5)。MM-102 はヒストンメチル化の制御を介して RASFs においてケモカインの活性化を抑制する事が示唆された。今後、MM-102 の RA 治療への応用が期待される。

☒ 4.



☒ 5.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Yasuhito Tokumoto, Yasuto Araki, Yusuke Narizuka, Yosuke Mizuno, Susumu Ohshima, Toshihide Mimura | 4. 巻 207 |
| 2. 論文標題 Induction of memory-like CD8+ T cells and CD4+ T cells from human naive T cells in culture | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology | 6. 最初と最後の頁 95-103 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cei/uxab012 | 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 荒木靖人 | 4. 巻 132 |
| 2. 論文標題 関節リウマチの血液検査 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 SSCさくらそう（公益社団法人日本リウマチ友の会埼玉支部会誌） | 6. 最初と最後の頁 9-15 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| 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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡元啓太, 荒木靖人, 相崎良美, 門野夕峰, 舟久保ゆう, 三村俊英 |
| 2. 発表標題 WDR5阻害薬における関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるケモカインの発現抑制 |
| 3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 和田琢, 舟久保ゆう, 菅野温子, 伊澤直広, 吉田佳弘, 横田和浩, 梶山浩, 荒木靖人, 門野夕峰, 三村俊英 |
| 2. 発表標題 乾癬性関節炎が不安, 抑うつに及ぼす影響についての検討 |
| 3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | 梶山浩, 矢島宣幸, 宮脇義亜, 一瀬邦弘, 吉見竜介, 大野滋, 佐藤秀三, 下島恭弘, 藤原道雄, 佐田憲映, 大西輝, 木田節, 松尾祐介, 江本恭平, 酒井左近, 岡元啓太, 松田真弓, 矢澤宏晃, 柳澤麻依子, 丸山崇, 和田琢, 吉田佳弘, 横田和浩, 荒木靖人, 舟久保ゆう, 秋山雄次, 三村俊英 |
| 2. 発表標題 | SLE患者におけるヒドロキシクロロキン内服と3年間の腎機能変化との関連 -LUNAレジストリを用いたコホート観察研究 |
| 3. 学会等名 | 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | 吉田佳弘, 矢澤宏晃, 横田和浩, 梶山浩, 荒木靖人, 舟久保ゆう, 秋山雄次, 三村俊英 |
| 2. 発表標題 | 生物学的製剤治療歴のある関節リウマチ症例へのサリルマブの有効性の検討 |
| 3. 学会等名 | 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | 秋山雄次, 和田琢, 高松真裕子, 柳澤麻依子, 丸山崇, 吉田佳弘, 横田和浩, 神津教倫, 梶山浩, 荒木靖人, 舟久保ゆう, 三村俊英 |
| 2. 発表標題 | 当科における関節リウマチに対するアバタセプト (ABT) とゴリムマブ (GLM) の治療成績 (416週) の比較検討 |
| 3. 学会等名 | 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| | |
|---------|--|
| 1. 発表者名 | 江本恭平, 横田和浩, 酒井左近, 岡元啓太, 松田真弓, 矢澤宏晃, 丸山崇, 和田琢, 吉田佳弘, 梶山浩, 荒木靖人, 舟久保ゆう, 三村俊英 |
| 2. 発表標題 | 炎症性筋疾患との鑑別が困難であった遠位型ミオパチーの1例 |
| 3. 学会等名 | 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 | 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松田真弓, 舟久保ゆう, 江本恭平, 岡元啓太, 矢澤宏晃, 和田琢, 横田和浩, 梶山浩, 荒木靖人, 三村俊英 |
| 2. 発表標題 SARS-CoV-2ワクチン接種後に成人発症スチル病を新規発症した3例 |
| 3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yasuto Araki, Keita Okamoto, Yoshimi Aizaki, Hiromi Oda, Toshihide Mimura |
| 2. 発表標題 Histone methyltransferase MLL1 regulates the expression of cytokines and chemokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts |
| 3. 学会等名 American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2019, Atlanta (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshimi Aizaki, Yasuto Araki, Kojiro Sato, Toshihide Mimura |
| 2. 発表標題 Aberration of histone lysine methylation in Adult-onset Still's disease are novel biomarker candidates associated with the disease activity |
| 3. 学会等名 American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2019, Atlanta (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kazuhiro Yokota, Yoshimi Aizaki, Shinya Tanaka, Kojiro Sato, Yasuto Araki, Noritsune Kouzu, Yuho Kadono, Hiromi Oda, Toshihide Mimura |
| 2. 発表標題 Functional differences between osteoblasts and osteoclast-like cells differentiated from peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis |
| 3. 学会等名 American College of Rheumatology, the Annual Scientific Meeting 2019, Atlanta (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 Trygve O Tollefsbol | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 Elsevier | 5. 総ページ数 41 |
| 3. 書名 Epigenetics in Human Disease | |

〔出願〕 計1件

| | | |
|-------------------------------|---------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 メモリーT細胞の製造方法 | 発明者 徳元康人、三村俊英、荒木靖人、大島晋 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2021-079296 | 出願年 2021年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

| |
|---|
| プロフィール http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/staff/y_araki.html |
|---|

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|