

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08905

研究課題名(和文) 関節リウマチ滑膜の上皮間葉移行の新規制御分子DIP2Cの解析と治療作用点の検討

研究課題名(英文) Analysis of DIP2C as a novel regulator for epithelial-mesenchymal transition of rheumatoid arthritis synovium and a potential therapeutic target

研究代表者

田中 真生 (Tanaka, Masao)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：10332719

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)：関節リウマチ滑膜の異常増殖(上皮間葉移行, EMT)に関わると考えるDIP2Cについて, そのドメイン構造解析によりエピジェネシスと代謝の2つの制御機構を有することがわかった。前者はSNAI1/2と結合する部位に, 後者はacetyl-CoA活性部位にあった。滑膜細胞ChIP-seqデータ解析では, RAでは変形性関節症にはないIL-6遺伝子のH3K4me3およびH3K27acの活性化ヒストン修飾があり, IL-6産生が誘導的でなく自律的なものに変化していることがわかった。このような変化はEMTマーカーのSNAI1やCOL1A1にも認め, EMT変化とサイトカイン産生変化が連動していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今世紀に入って分子標的薬が導入され, 関節リウマチ(RA)は制御できる疾患となったが, 未だに半数近くの患者が寛解を得ていない。治療抵抗性の患者は, 経時的に治療反応性が低下する傾向を示し, 何らかの非可逆的な形質の変化が背景にあると思われる。本研究の仮説ではそれが滑膜EMTであり, サイトカイン産生異常との連動が判明したことは仮説の正しさを示唆している。RA滑膜の非可逆的な変化を可逆的に戻せば, 治療反応性を取り戻せるかもしれない。滑膜EMTの分子機構を解明することにより, RA滑膜が正常滑膜に戻る可塑性を回復する方法がわかれば, 新規治療アプローチとして難治性のRA患者にも福音をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In rheumatoid arthritis (RA), DIP2C is an important molecule involved in the abnormal proliferation of synovium, which is comparable to epithelial-mesenchymal transition, EMT. Domain structure analysis of DIP2C disclosed that it has two regulatory mechanisms for epigenesis and metabolism. The former was located in the SNAI1/2 binding site and the latter in the acetyl-CoA activating site. Synovial cell ChIP-seq data analysis revealed activating histone modifications of the IL-6 gene H3K4me3 and H3K27ac in RA, which are absent in osteoarthritis, and that IL-6 production is altered to be autonomous rather than induced. These epigenetic changes were also observed in the loci for EMT markers SNAI1 and COL1A1, indicating that the EMT changes were linked to dysregulation of cytokine production.

研究分野：リウマチ学、免疫学

キーワード：関節リウマチ DIP2 上皮間葉転移 関節滑膜 可塑性 エピジェネシス

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、関節の慢性炎症と破壊を特徴とする自己免疫疾患である。病変の主体は滑膜炎であり、典型的には関節滑膜の存在しない組織で炎症は生じない。RA での滑膜は T 細胞, B 細胞, 単球・マクロファージや顆粒球を引き寄せて炎症の環境を形成し、関節や骨を破壊する。この炎症の環境の成立を抑止できれば RA の関節炎・関節破壊を抑えること可能と思われる。RA における滑膜では形態的な異常と機能的な異常の 2 面があると考えられる。すなわち前者については関節腔を包む単一細胞層の形態が損なわれ (上皮間葉移行, EMT), 異常増殖して腫瘍のようなパニスとと呼ばれる組織を形成すること, 後者については DNA のエピジェネティックな変化による炎症関連遺伝子の非可逆的活性化や, 代謝変化による免疫制御反応の低下である。これら機能的な異常は RA の治療耐性の観点で重要である。研究代表者は RA の滑膜自己抗原として 1998 年に FSTL1 を同定<sup>1)</sup>、2010 年にその結合分子である DIP2 を同定<sup>2)</sup>、そして近年 DIP2 が EMT に関わると知られる SNAI と結合することを見出した (投稿準備中)。

## 2. 研究の目的

RA 滑膜の形質転換 (EMT) における FSTL1, DIP2, SNAI, DNMT 分子間の相互作用を明らかにし、それら分子の治療耐性につながるエピジェネティックな変化や代謝の変化との関与を解析する。そうして RA における関節滑膜の形態的および機能的異常をきたす機序を分子生物学的に解明することによって、慢性炎症をリセットするような難治性 RA のための新規な治療作用点を探求することを目指して研究を進めていく。

## 3. 研究の方法

滑膜細胞に発現している DIP2C, SNAI2, DNMT3A の 3 分子について、BIACORE による分子間相互作用解析を行う (DIP2C のリコンビナント蛋白が用意できず未実施)。滑膜肉腫細胞株 SW982(ATCC HTB-93)への DIP2C 遺伝子を導入し、腫瘍性の変化を観察した。DNA マイクロアレイや ChIP-seq のパブリックデータで、RA と変形性関節症 (OA) を対比したものの、またヒト肺癌細胞株 A549 の EMT 前後のものを入手し解析した。

## 4. 研究成果

ドメイン構造解析の結果、DIP2 は上述のエピジェネシスと代謝の 2 つの機構に関与するハイブリッド分子と考えられた。すなわち DMAP 結合ドメインには SNAI を介した DNA メチル化分子 DNMT を制御する機構があり、Ca<sup>2+</sup>-AMP 結合ドメインには acetyl-CoA 活性によりカルニチン代謝を制御する機構がある (図 1)。カルニチンはセラミドの産生を阻害することにより細胞内シグナル伝達を低下させる報告があった<sup>3)</sup>。

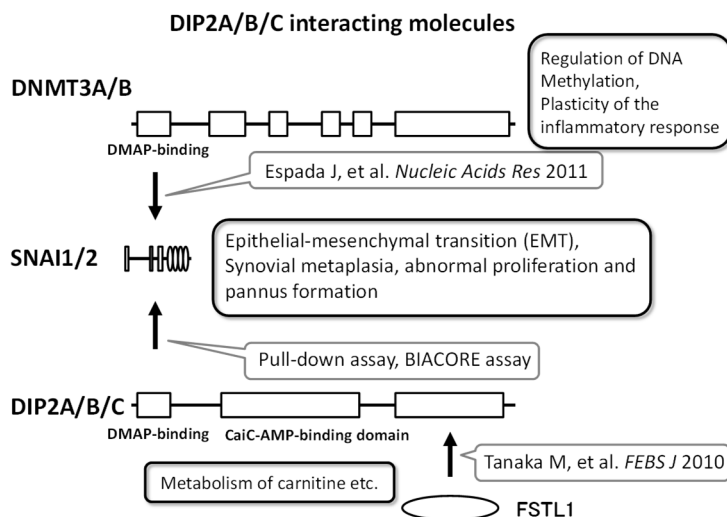


図 1 DMAP 結合ドメインを介した DNMT および DIP2 の SNAI との結合

滑膜細胞では 3 つある DIP2 遺伝子 (DIP2A, DIP2B, DIP2C) のうち DIP2C が優位に発現し、RA では OA に比し発現が低下していた。これは Zhang らが公開した RNA-seq データベースでも確認された<sup>4)</sup> (図 2)。実験資源節約のため RA 患者滑膜を使用する前に、滑膜肉腫細胞株 SW982(ATCC HTB-93)への DIP2C 遺伝子導入実験を行ったが、期待された腫瘍性の喪失の観

察が困難であった。そこで EMT 実験についてはまず確立されたプロトコルのある A549 ヒト肺癌細胞株を使用することを検討した。A549 細胞の TGF- $\beta$  刺激による EMT 実験のマイクロアレイデータ (GSM3149770 vs GSM3149774) を解析したところ、EMT マーカーの SNAI1/2, COL1A1 の発現亢進が確認された。

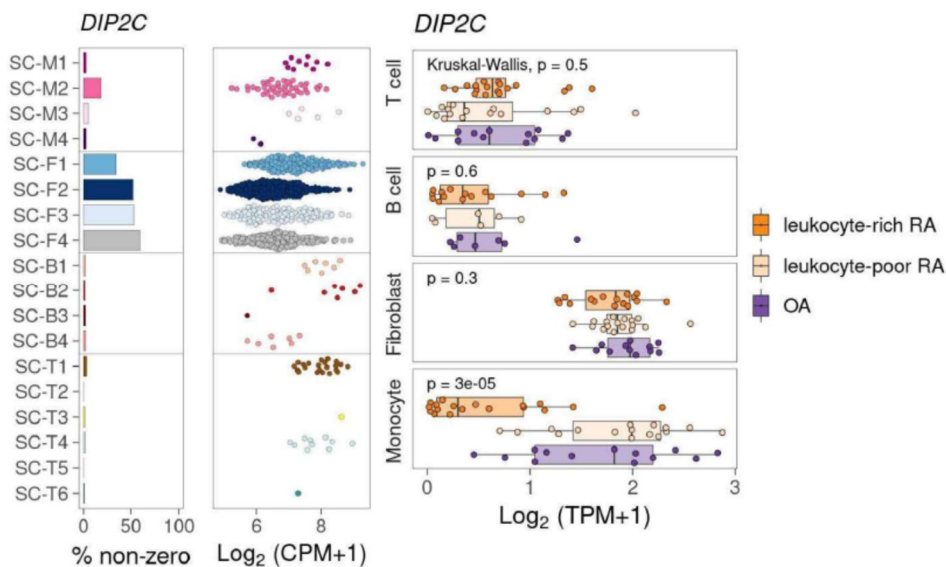


図 2 DIP2C の滑膜繊維芽細胞 (SC-F1 ~ 4) での選択的発現

エピジェネティックな変化も検討した。Ai ら (2018) が公開した滑膜細胞 ChIP-seq データを解析したところ<sup>5)</sup>, RA では変形性関節症(OA)に比し IL-6 遺伝子座の H3K4me3 および H3K27ac の活性化ヒストン修飾がみられ, IL-6 の分泌が誘導的でなく自律的なものに変化していた。このような変化は EMT マーカーの SNAI1 や COL1A1 に認められたほか, DNA メチル化酵素 DNMT3A にも認め, EMT 変化とサイトカイン産生変化が連動していることがわかった (図 3)。興味深いことに, 類似したエピジェネティックな変化が, Qiao ら(2020)の A549 細胞 ChIP-seq データにも認められ<sup>6)</sup>, EMT 後の IL-6, SNAI1/2, COL1A1 の活性化ヒストン修飾の増加が認められた。DNMT3A については既に癌化細胞のためか変化がなかった (図 4)。このことは, RA 滑膜変化における分子解析について A549 細胞の EMT 変化を多いに参考にできることを示唆するものであった。

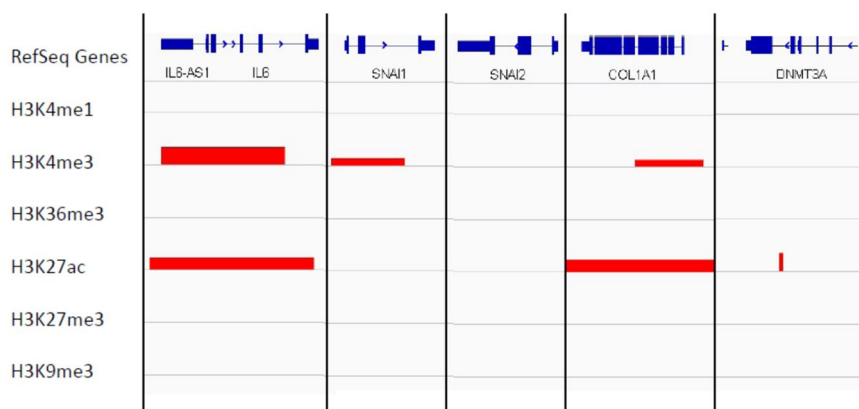


図 3 滑膜細胞の ChIP-seq。ピーク値は差分を表示。RA が正 (赤) で OA が負 (青)。ここで活性化マーカーは認めないが滑膜細胞では SNAI1 より SNAI2 が優位に発現している。

SNAI2 は DNMT3A をリクルートし DNA メチル化制御に関わると考えられる。滑膜細胞における DIP2C, SNAI2, DNMT3A の 3 分子について, BIACORE による分子間相互作用解析を予定していた。そのため各々リコンビナント蛋白を用意する必要があった。SNAI2, DNMT3A は市販品があったが, DIP2C は市販品が無かったため, 大腸菌発現系にて作製を進めていた。人的資源不足もあり遅々として進行せず, そうこうするうちに米国 MyBioSource 社より真核細胞発現の DIP2C リコンビナント蛋白が発売されたため, それを購入した。BIACORE 解析はこれから実施するところである。

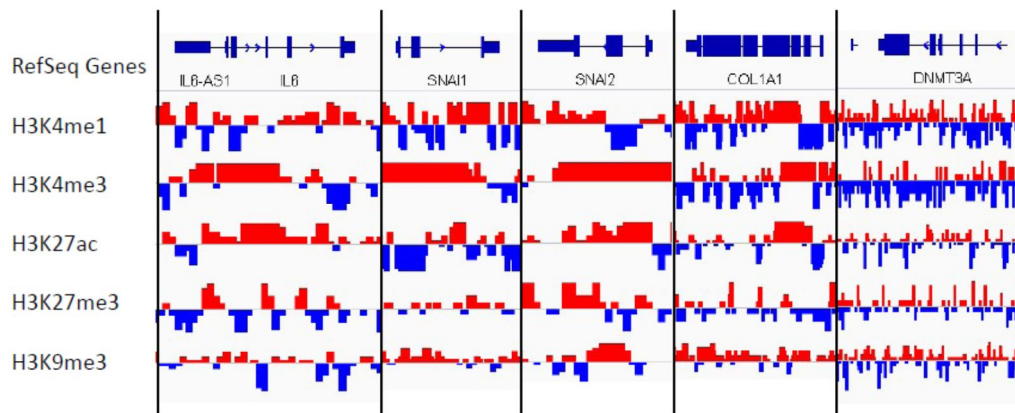


図4 EMT 前後の A549 細胞の ChIP-seq . ピーク値は差分を表示 . EMT 後が正 (赤) で前が負 (青) .

今後は、まず A549 において DIP2 , SNAI1/2 と , DNMT3A などの細胞内局在および相互作用・形態変化を含む EMT 変化を FACS および共焦点顕微鏡による解析する . そして RA および OA 患者から採取した滑膜細胞を使用するが、継代が困難であるため YAP 遺伝子による不死化も試みる . DIP2 分子はミトコンドリアに多い報告があり<sup>7)</sup> , 外部から FSTL1 を加えると局在が変わる可能性がある . また DIP2C のカルニチン代謝制御とその代謝の役割も解析し、RA における関節滑膜の形態的および機能的異常をきたす機序を分子生物学的に解明すること、そして慢性炎症をリセットするような難治性 RA のための新規な治療作用点を探求することを目標に研究を進めていく .

#### <引用文献>

- 1) Tanaka M, et al. Int Immunol. 10:1305-1314, 1998
- 2) Tanaka M, et al. FEBS J. 277:4278-4289, 2010
- 3) Bai A, et al. Cell Death and Disease 6: e1828, 2015
- 4) Zhang F, et al. Nat Immunol. 20: 928-942, 2019
- 5) Ai R, et al. Nature Communications 9:1921, 2018
- 6) Qiao Y, et al. Molecular Therapy 28:2083-2095, 2020
- 7) Ma J, et al. Cell Biol Int. 43:421-428, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Masao Tanaka	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Science Impact Ltd	5. 総ページ数 3
3. 書名 Impact (ISSN 2398-7073)	

1. 著者名 Masao Tanaka	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Science Impact Ltd	5. 総ページ数 3
3. 書名 Impact (ISSN 2398-7073)	

〔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
研究分担者	高橋 智聡 (Takahashi Chiaki)  (50283619)	金沢大学・がん進展制御研究所・教授  (13301)	
研究分担者	杉本 直俊 (Sugimoto Naotoshi)  (80272954)	金沢大学・医学系・准教授  (13301)	

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
---------	---------