

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461482

研究課題名(和文) Behcet病に關与するエピゲノム制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of epigenome abnormality in Behcet's disease.

研究代表者

三村 俊英 (MIMURA, TOSHIHIDE)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：30260491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Behcet病患者末梢血有核細胞において、健常者には認められない特徴的なヒストン修飾変化を確認出来た。さらに、活動性の高い時期と活動性の低い時期の血液において、高い時期でこの傾向は著明であった。低疾患活動期のヒストン修飾変化は健常者に近かった。変化の強い T細胞に焦点を絞り35名の患者血液から標的細胞をプール出来た。この患者血液を用いてトランスクリプトーム解析を行ったが、RNA量が少なく満足な結果が得られていない。本研究において治療標的遺伝子の解明には至っていないものの、難病であるBehcet病の病態に直結する新規治療戦略の開発への第一歩を踏み出す事が出来、今後の展開が期待出来る。

研究成果の概要(英文)：We analyzed peripheral blood nucleated cell subsets and histone modification by flow cytometry and transcriptome assay on the patients with Behcet's disease (BD). H3K27me3 and H3K4me3 were detected in CD4+ T cells, CD8+ T cells, T cells, and CD16+CD66b+ neutrophils. H3K27me3 MFI levels were not significantly different in those cell types in BD. In contrast, H3K4me3 MFI levels of BD in T cells were significantly increased compared with HC. H3K4me3/H3K27me3 MFI ratio was significantly lower in neutrophils of BD and higher in T cells of BD than that of HC. H3K4me3 MFI and H3K4me3/H3K27me3 MFI ratio of active BD were significantly increased in T cells as compared to inactives. The transcriptome assay is still on going. Aberrant histone methylation may be associated with the pathogenesis of BD. It is suggested that histone methylation could be a new candidate-biomarker for BD.

研究分野：リウマチ膠原病科

キーワード：末梢血有核細胞 エピジェネティクス ヒストンメチル化 活性化マーカー

1. 研究開始当初の背景

Behcet 病は、一部に HLA の関与が知られているが原因不明の全身性慢性炎症性疾患である。眼症(ブドウ膜炎、失明)、粘膜病変(口腔内アフタ、陰部潰瘍)、皮膚病変(結節性紅斑、毛嚢炎様皮疹)がその主たる3病変であり、それに加えて多発関節炎、消化管病変、血管病変、中枢神経病変など特徴的な病状を示す。Behcet 病は、以前から膠原病類縁疾患や自己免疫疾患の範疇に入れられているが、Behcet 病の自己免疫異常に関しては、連鎖球菌関連抗原などの細菌由来の抗原特異的な T 細胞が活性化されており、IL-6 や IFN- γ などのサイトカインを産生している (Zhao C et al. Mol Vis 14:1456-1464,2008; Hirohata S et al. Cell Immunol 140:410-419,1992)。また、CD4 陽性 T 細胞のうち、Th1 細胞と Th17 細胞が増加していることは申請者 (Miyoshi et al. "Annual European Congress of Rheumatology, June 16-19, 2010 にて発表、Paris) やその他の研究者たちが報告している (Frassanito MA et al. Arthritis & Rheumatism 42:1967-1974,1999; Ekincil NS et al. Journal of Investigative Dermatology 130:2136-2138,2010)。T 細胞も Behcet 病患者の末梢血中において増加しており、IFN- γ や TNF- α の産生が見られる (Freysdottir J et al. Clin Exp Immunol 118:451-457,1999)。しかし、自己反応性 T 細胞や自己抗体など自己免疫現象を示すエビデンスには乏しく、むしろ最近では、自己炎症性疾患の範疇に入る可能性が示唆されている。しかし、幼年や若年に認められる遺伝子変異を伴う多くの典型的自己炎症性疾患とは明らかに異なり、Behcet 病の好発年齢は中年で単なる遺伝子異常によって惹起される疾患とは考えがたい。このような病態を考慮すると遺伝子異常には依らない病因として、エピゲノムの関与が推定される。

2. 研究の目的

Behcet 病の病態解明、新規治療開発のために、今までなされていなかった、ヒストン修飾を中心としたエピゲノム異常に焦点を絞って検討する。本研究においては、Behcet 病患者末梢血白血球(好中球とリンパ球に分離してそれぞれ)のヒストン修飾の変化を網羅的に解析する。ヒストン修飾異常は中年以降発症の疾患に置いては重要な病態形成機序と予想される。これにより、新たな治療標的を明らかにすることが可能になり、Behcet 病治療は劇的に進歩すると期待できる。

3. 研究の方法

1. Behcet 病の末梢血中リンパ球・好中球のヒストン修飾の flow cytometry 解析

Behcet 病患者の末梢血中のリンパ球及び好中球は活性化しているため、この活性化の状態を flow cytometry にて解析できないか

検討を行う。ヒストン修飾の中で、ヒストンアセチル化および一部のヒストンメチル化は転写活性化と関連しており、代表的なものとして H3ac、H3K4me3 が挙げられる。これらのヒストン修飾に対する抗体を用いて、細胞を染色し、flow cytometry 解析を行う (Dispirito JR et al. J Immunol 184:4631-4636,2010)。具体的には、ホルムアルデヒド/サポニン膜透過処理により細胞膜に穴を開け、一次抗体が細胞膜を通過して細胞内のヒストン修飾に結合する事が可能となる。蛍光標識した二次抗体を用いる事により、ヒストン修飾が flow cytometry により定量可能となる。ヒストン修飾が、リンパ球及び好中球の活性化の度合いを反映していないか解析を行う。Behcet 病の活動性の評価として、血清の炎症反応(CRP、血沈)がよく用いられるが、必ずしもリンパ球や好中球の活性化の病態を反映していない。Flow cytometry によるヒストン修飾の解析は、Behcet 病の新しい検査法として応用が期待される。

2. Behcet 病における特異的遺伝子発現及びゲノムワイドなヒストン修飾の解析

2-a. トランスクリプトーム解析によるリンパ球・好中球における Behcet 病特異的遺伝子の同定

Behcet 病患者及び健常人の末梢血中の単核球及び好中球を、セルソーターにより CD4 陽性 T 細胞、T 細胞、CD16 陽性好中球に高純度に分離する。続いて、各細胞の mRNA 発現をマイクロアレイ法によりゲノムワイドに解析する。これにより、Behcet 病において特異的に高発現および低発現している遺伝子を同定する。自己炎症症候群の原因遺伝子(MEFV、TNFSF1A、CIAS1、NOD2、MVK、PSTPIP1)が含まれていないか検討する。

2-b. ChIP-Seq 解析

2-a. にて高純度に分離した CD4 陽性 T 細胞、T 細胞、CD16 陽性好中球において、ヒストン修飾(H3K4me3、H3K27me3)プロファイルをゲノム全域にわたり解析する。各細胞からゲノム DNA を抽出し、ヒストン修飾に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)を行う。得られた ChIP-DNA の塩基配列を次世代シーケンサーにて読み取り、ゲノム上にマッピングする。これらの結果により、各遺伝子のヒストン修飾量が定量可能となる。

上記、2-a および b にてヒストン修飾変化を示す遺伝子が得られた場合、患者末梢血好中球および T 細胞などの分画に分けて短期間培養を行う。これら細胞に対して、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカイン、CD3/TCR 刺激、PMA/ionomycin などを添加することにより、これらの細胞の状態に変化が見られるかどうか、健常社由来の細胞と比較する。被刺激性・活性化が亢進している場合には、ヒストン修飾との関係を検討する。酵素的な変更によりヒストンアセチル化の変化などを

起こし、機能の変化が見られるか検討する。

4. 研究成果

全実験計画は当院 IRB および本学倫理委員会にて承認された。その後、患者および健常者に対して口頭及び文書を用いて同意を取得した。

1. Behcet 病患者の末梢血中のリンパ球及び好中球を flow cytometry にて、細胞表面マーカーと核内ヒストン修飾の変化を示すヒストン修飾 (H3K4me3、H3K27me3) 特異的抗体を用いて、末梢血有核細胞亜分画毎のヒストン修飾を認識する事に成功した。そして健常者を対照として、Behcet 病患者末梢血有核細胞において、健常者には認められない特徴的なヒストン修飾変化を確認する事が出来た。さらに、Behcet 病患者において活動性の高い時期に採取した末梢血と活動性の低い時期に採取した血液において、高い時期においてこの傾向は著明に認められた。低疾患活動期のヒストン修飾変化は健常者に近いものであった(図1、2)。以上の事から、Behcet 病における病態の一部にはエピゲノム、特にヒストン修飾変化の関与が認められる可能性が高くなり、治療戦略においても新たな展開が期待出来る事が示された。

2. Behcet 病における特異的遺伝子発現及びゲノムワイドなヒストン修飾の解析

2-a. トランスクリプトーム解析によるリンパ球・好中球における Behcet 病特異的遺伝子の同定

上記検討から Behcet 病における病態との関係が期待出来るヒストン修飾の変化は $\gamma\delta T$ 細胞に存在すると結論した。そこで、このポピュレーションに焦点を絞ってトランスクリプトーム解析を試みた。そのためには、 1×10^7 程度の純粋な細胞が必要であった。通常、患者血液 20 mL から採取出来る PBMC は 1×10^7 オーダーであり、 $\gamma\delta T$ 細胞の頻度は PBMC の 5% 以下であるので回収率 100% であっても 20-30 人以上の患者血液を必要とすることが判明した。そこで、20 人の患者プール $\gamma\delta T$ 細胞を用いると事にした。そのため、活動期 Behcet 病患者から、末梢血を採取し、マグネティックビーズ法にてネガティブセレクションを行い、 $\gamma\delta T$ 細胞を採取した。改良により純度は高まったが採取細胞数は少ないため、20 名の患者血液では不十分であった。そのため、患者リクルートを引き続き行い、35 名の患者血液をプール出来た。この患者血液を用いてトランスクリプトーム解析を行ったが、RNA 量が少なく十分な結果が得られていない。再度患者血液を採取して行う予定である。

以上のことから、治療標的遺伝子の解明には至っていないものの、難病である Behcet 病の病態に直結する新規治療戦略の開発への第一歩を踏み出す事が出来、今後の展開が期待出来る。

図1 患者及び健常者の末梢血ヒストン修飾変化；H3K4me3/H3K27me3

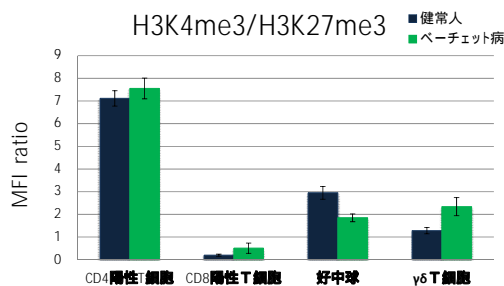
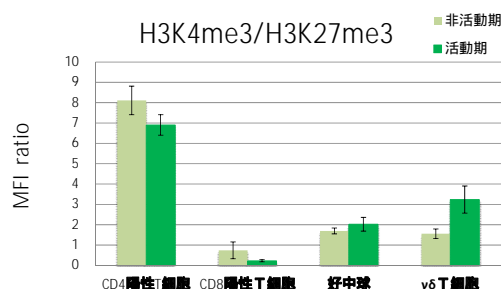


図2 活動期と非活動期の末梢血ヒストン修飾変化；H3K4me3/H3K27me3



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11件)

Araki Y, Wada TT, Aizaki Y, Sato K, Yokota K, Fujimoto K, Yoon-Taek K, Oda H, Kurokawa R, Mimura T, Histone methylation and STAT3 differentially regulate IL-6-induced MMP gene activation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *Arthritis & Rheumatology*, 2015, 68(5), 1111-23, 査読あり, doi: 10.1002/art.39563

Sato T, Enoki Y, Sakamoto Y, Yokota K, Okubo M, Matsumoto M, Hayashi N, Usui M, Kokabu S, Mimura T, Nakazato Y, Araki N, Fukuda T, Okazaki Y, Suda T, Takeda S, Yoda T, Donepezil prevents RANK-induced bone loss via inhibition of osteoclast differentiation by downregulating acetylcholinesterase, *Heliyon*, 2015, e00013, 査読あり, <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00013>

Akiyama Y, Yokota K, Nakajima K, Yoshida Y, Araki Y, Kajiyama H, Asanuma YF, Sato K, Mimura T, Effects of Bosentan on the Skin Temperature of Hands and Feet in

Patients with Connective Tissue Diseases Complicated with Raynaud's Phenomenon: A Prospective, Open-Label, Uncontrolled, Single-Center Study, *Global Journal of Medical Research*, 2015, 15(2-F) ver1.0, 7-15, 査読あり, <http://medicalresearchjournal.org/index.php/GJMR/article/view/900>

Asanuma YF, Mimura T, Tsuboi H, Noma H, Miyoshi F, Yamamoto K, Sumida T, Nationwide epidemiological survey of 169 patients with adult Still's disease in Japan, *Mod Rheumatol*, 2015, 25(3), 393-400, 査読あり, doi: 10.3109/14397595.2014.974881

Ota M, Yanagisawa M, Tachibana H, Yokota K, Araki Y, Sato K, Mimura T, A significant induction of neutrophilic chemoattractants but not RANKL in synovial cells stimulated with interleukin 17, *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2015, 33(1), 40-7, 査読あり, doi: 10.1007/s00774-014-0565-y

Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Kitaura H, Kayama H, Miyoshi F, Araki Y, Akiyama Y, Takeda K, Mimura T, Combination of tumor necrosis factor and interleukin 6 induces mouse osteoclast-like cells with bone-resorption activity both in vitro and in vivo, *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(1), 121-9, 査読あり, doi: 10.1002/art.38218

Yokota K, Inoue T, Akiyama Y, Kajiyama H, Asanuma FY, Arai E, Suzuki H, Mimura T, Acute kidney injury in polyarteritis nodosa and multiple myeloma, *Intern Med*, 2014, 53(3), 263-7, 査読あり, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24492698>

Wada TT, Araki Y, Sato K, Aizaki Y, Yokota K, Kim YT, Oda H, Kurokawa R, Mimura T, Abberant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(4), 682-6, 査読あり, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.195

Akiyama Y, Sakurai Y, Kato Y, Furuta E, Mimura T, Retrospective study of salazosulfapyridine in eight patients with rheumatoid arthritis on hemodialysis, *Mod Rheumatol*, 2014, 24(2), 285-290, 査読あり, doi:

10.3109/14397595.2013.843746

Shimada Y, Asanuma FY, Yokota K, Yoshida Y, Kajiyama H, Sato K, Akiyama Y, Mimura T, Pentraxin 3 is associated with disease activity but not atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus, *Mod Rheumatol*, 2014, 24(1), 78-85, 査読あり, doi: 10.3109/14397595.2013.852837

Asanuma YF, Shimada Y, Kouzu N, Yokota K, Nakajima K, Sato K, Akiyama Y, Isozaki M, Mikami AS, Kobayashi H, Mimura T, Serum osteoprotegerin concentration is associated with carotid atherosclerotic plaque in patients with rheumatoid arthritis, *Mod Rheumatol*, 2013, 23(2), 269-75, 査読あり, doi: 10.1007/s10165-012-0654-5

[学会発表](計7件)

三村俊英, 成人ステイル病の難治例・重症例の予測と対策, 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015年4月23日, 名古屋国際会議場(名古屋)

荒木靖人, 和田琢, 相崎良美, 横田和浩, 梶山浩, 秋葉春彦, 佐藤浩二郎, 秋山雄次, 金潤澤, 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3リシン4メチル基転移酵素の異常, 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015年4月23日, 名古屋国際会議場(名古屋)

Yoshimi Aizaki, Yasuto Araki, Kojiro Sato, Yuji Akiyama, Toshihide Mimura, Histone Methylation Profiling in Peripheral White Blood Cells As a Candidate Biomarker for Behcet's Disease, 2015 ACR/ARHP Annual Meeting, 2015年11月8日, San Francisco (USA)

和田琢, 荒木靖人, 佐藤浩二郎, 横田和浩, 三由文彦, 梶山浩, 舟久保ゆう, 金潤澤, 織田弘美, 秋山雄次, 三村俊英, ヒストンアセチル化関節リウマチ滑膜線維芽細胞のIL-6過剰産生に關与する, 第58回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2014年4月26日, グランドプリンスホテル新高輪(東京)

荒木靖人, 和田琢, 佐藤浩二郎, 横田和浩, 三由文彦, 梶山浩, 舟久保ゆう, 金潤澤, 織田弘美, 秋山雄次, 三村俊英, 関節リウマチ滑膜線維芽細胞のIL-6依存性MMP遺伝子転写活性化におけるヒストンメチル化の役割, 第57回日本リウマチ学

会総会・学術集会 第22回国際リウマチシンポジウム, 2013年4月18日, パシフィコ横浜(神奈川県)

Takuma Tsuzuki Wada, Yasuto Araki, Kazuhiro Yokota, Fumihiko Miyoshi, Kojiro Sato, Toshihide Mimura, Histone Modifications In The Interleukin-6 Gene Promoter Region Of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts, 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, 2013年10月28日, San Diego (USA)

Yasuto Araki, Takuma Tsuzuki Wada, Kojiro Sato, Kazuhiro Yokota, Fumihiko Miyoshi, Yu F. Asanuma, Yuji Akiyama, Toshihide Mimura, Altered Histone Methylation Is Associated With IL-6 Dependent Matrix Metalloproteinases Gene Transcriptional Activation In Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts, 2013 ACR/ARHP Annual Meeting, 2013年10月29日, San Diego (USA)

〔図書〕(計1件)

三村俊英, 医学書院, 疾患編 11. 膠原病・免疫疾患. 成人 Still 病. 今日の診断指針 第7版, 2015, 2103(1324-1326)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ベーチェット病の判定を補助する方法、及びベーチェット病の活動性の評価を補助する方法

発明者: 三村俊英, 荒木靖人, 相崎良美

権利者: 学校法人埼玉医科大学

種類: 特許

番号: 特願2014-200824

出願年月日: 2014年9月30日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/riumachi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 俊英 (MIMURA TOSHIHIDE)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30260491