

## 論文の内容の要旨

論文題目 関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞の炎症性フェノタイプに対する JAK 阻害剤の影響

氏名 小川 萌

滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts; SFs)は関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)における炎症滑膜の主要な構成因子である。SFs は関節内の複合的なサイトカインネットワークに応答して、炎症性サイトカイン・接着分子・蛋白分解酵素等を発現し、炎症細胞動員・骨軟骨破壊に中心的役割を果たす。近年、RA の病態における JAK-STAT signaling pathway の寄与が明らかとなり、tofacitinib (TOFA)をはじめとする JAK 阻害剤が臨床応用・開発されている。しかし、汎 JAK 阻害剤である TOFA の臨床試験の結果から、臨床的有効性は先行の biological disease modified anti-rheumatic-drugs (bDMARDs)と同等と評価され、有害事象の観点からも、より選択的に JAK を阻害する薬剤の開発が求められてきた。新規 JAK 阻害剤として開発された baricitinib (BARI)は JAK1・JAK2 を選択的に阻害し、臨床試験では bDMARDs を超える臨床的有効性が示唆された。しかし、これら JAK 阻害剤が RASFs の炎症性フェノタイプに与える影響は十分に解明されていない。

本研究の目的は、選択的 JAK 阻害剤 (BARI)が RASFs の病的形質に与える免疫学的作用の特性を、汎 JAK 阻害剤 (TOFA)や他の抗リウマチ薬 (methotrexate; MTX・iguratimod; IGU・adalimumab; ADA)との比較により、トランスクリプトーム・エピゲノムレベルで解明することである。この研究にあたり、トランスクリプトーム解析には RNA sequencing を、エピゲノム解析には Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC) sequencing (Omni-ATAC)を用いた。

まず始めに、RASFs を *in vitro* で刺激するために、関節内の炎症環境の中核を構成するサイトカインの組み合わせを選定した。これまでに当研究室は、SFs を RA の炎症関節内に高濃度で存在する 8 種のサイトカインの mixture (TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$ ・IL-17・IFN- $\gamma$ ・IL-18・IFN- $\alpha$ ・TGF- $\beta$ ・IL-6/sIL-6R; 8-mix)で刺激すると、1) IL-6 や CCL5 に代表される関節内の炎症メディエーターが高発現し、2) クロマチン構造がリモデリングすることで長大な活性化エンハンサー領域 (Super-enhancer; SE)が構成され、ここに RA の疾患感受性多型が濃縮されることを報告している。今回、この 8-mix の中核となるサイトカインを絞り込むため、RASFs を 1-4 種のサイトカインの組み合わせで刺激し、RNA sequencing で解析した網羅的トランスクリプトーム発現を 8-mix 刺激下の RASFs と比較した。その結果、TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$ ・IFN- $\gamma$  の mixture (3-mix)が RA の遺伝的リスクと関連する炎症環境の中核を構成すると考えられ、このサイトカイン条件を RASFs の刺激に用いることとした。

また、添加する薬剤の濃度は、ヒトでの最大血中濃度や基礎研究の既報を参照し、TOFA および BARI は Western Blotting で STAT1・STAT3 のリン酸化抑制を、ADA は

Western Blotting で NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化抑制を評価し、添加濃度を決定した。また、IGU および MTX については、前者は *CCL5*・*CCL8*、後者は *TYMS* の相対的遺伝子発現量を real-time polymerase chain reaction (PCR) で評価し、添加濃度を決定した。

以上の予備検討を経て、RASFs をサイトカイン (3-mix) で 12 時間刺激し、各薬剤を添加 24 時間後に回収したサンプルを用いて、RNA sequencing および ATAC sequencing を施行した。

まず、RNA sequencing により得られたトランスクリプトームデータを主成分分析 (principal component analysis; PCA) を用いて俯瞰したところ、JAK 阻害剤 (TOFA・BARI) は他の DMARDs と比較し、炎症環境下の RASFs に特徴的なトランスクリプトーム変化をもたらすと考えられた。更に JAK 阻害剤の製剤間にも作用の違いが存在することが示唆された。non-treatment 条件と各薬剤添加条件の発現変動遺伝子 (DEG) を比較すると、BARI 添加条件で DEG 数が最も多く、BARI でのみ発現が有意に変動する 535 遺伝子の中には、*colony stimulating factor 1 (CSF1)* や *C-X-C Motif Chemokine Ligand 16 (CXCL16)* に代表される RA の炎症性メディエーターが多く含まれた。

更に、ATAC sequencing により得られたエピゲノムデータから、non-treatment 条件と各薬剤添加条件の比較によるオープンクロマチン領域の変動ピーク (differential peak; diffPeak) を解析したところ、BARI で最多の diffPeak を認め、BARI が炎症環境下の RASFs のエピゲノム構造をより広範に修飾する可能性が示唆された。実際に、BARI でのみ発現が有意に変動する 535 遺伝子のうち、92 遺伝子でプロモーター領域のエピゲノム構造に有意な変化が確認された。

次に、JAK 阻害剤間 (TOFA・BARI) における、RASFs の炎症性フェノタイプに与える影響の違いに着目し、これら薬剤添加下のトランスクリプトームとオープンクロマチン領域の情報を統合的に比較解析した。RNA sequencing での各遺伝子発現の倍率変化 (fold change; FC) の情報と ATAC sequencing で各遺伝子のプロモーター領域にある diffPeak の FC の情報を統合することにより、プロモーター領域のオープンクロマチン構造の変化を伴い、TOFA と比較し BARI で有意に発現が抑制される 18 遺伝子が同定された。この中には、インターフェロンのシグナル伝達に必須の転写因子である *STAT1* と、その標的遺伝子として知られ、主に T 細胞の遊走にかかわるケモカインである *CCL8*、RA の炎症滑膜で高発現し治療抵抗性の予測因子として知られる *IL7R* などが含まれた。BARI 添加条件では、*CCL8*、*IL7R* における既知の *STAT1* 結合領域と一致してオープンクロマチンピークが消失し、これらの遺伝子発現が有意に抑制されていた。また、TOFA と BARI の比較による diffPeak のモチーフ解析から *STAT1* の発現を制御する転写因子を予測し、データベース (ChIP-Atlas) 上の既知の結合領域と照合したところ、*RUNX3* が候補に挙げられた。

GWAS では *RUNX3* 近傍の SNPs が複数の自己免疫疾患の感受性多型として報告されており、ゲノムレベルで疾患発症に寄与すると考えられる。また、RA 発症が不一致の一卵性双生児において、RA 症例と非 RA 症例の末梢血 DNA メチル化をゲノムワイドに比較し

た研究では、DNAメチル化に差異を認めた領域に、RUNX3の結合モチーフが存在したことから、RUNX3がエピゲノムレベルにおいて、RAの病態形成を担う可能性が示唆されている。炎症環境下のSFsにおけるRUNX3の機能や、STAT1に対する発現制御メカニズムを追求することは、JAK阻害剤間の作用特性を探索するうえで重要と考えられる。

また、CCL8はOAと比較しRAの炎症滑膜や関節液中で高発現することや、ケモカインはRA患者において、DMARDsによる炎症の鎮静化後も持続する慢性疼痛と密接に関連することが報告されている。MTX不応性のRA患者に対するBARIの臨床試験では、BARI投与群でプラセボ群やADA投与群と比較し、関節炎所見のみならず、疼痛や疲労感といった患者による主観的症状の直接評価 (Patient-reported outcomes: PRO)が有意に改善した。TOFAとBARIの臨床的有効性を直接比較した研究は乏しいが、BARIが患者QOLの改善に寄与する基礎免疫学的メカニズムの一部として、SFsにおけるケモカイン発現の抑制が考えられる。

更にcase-control studyにて、*IL7R* 遺伝子内のSNPsとRA発症の関連が報告されており、*IL7R*はゲノムレベルでRAの病態形成に寄与する可能性がある。BARIは、炎症環境下のSFsにおける*IL7R*発現を抑制することにより、疾患感受性の遺伝子が形成する病態ネットワークを遮断する可能性がある。

以上の結果から、TOFAと比較しBARIでは、RUNX3の転写活性の抑制を介して、エピゲノム・トランスクリプトームレベルでSTAT1の発現を高度に抑制し、STAT1の標的遺伝子である*CCL8*や*IL7R*、*SAAI*、*SLAMF8*といったRAの病態関連遺伝子の発現がトランスクリプトームレベル・エピゲノムレベルで抑制されることで、製剤間の臨床的効果の違いにつながる可能性があると考えられた。