

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網羅的解析による炎症増幅機序の解明

氏名 土屋 遥香

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)は、遺伝的素因と環境因子が発症に関わる代表的な炎症性関節炎である。近年、RA の治療は、methotrexate に代表される conventional synthetic DMARDs (csDMARDs)に加え、関節内の炎症性サイトカイン (TNF- α ・IL-1 β ・IL-6・GM-CSF)や B 細胞上の CD20・抗原提示細胞上の CD80/86 に結合する biological DMARDs (bDMARDs)、Janus kinase (JAK)に代表される特定のシグナル伝達経路を阻害する targeted synthetic DMARDs (tsDMARDs)が登場し、大きなパラダイムシフトを遂げた。しかし、依然として臨床的寛解を達成する患者は 50%未満であり、全身的な免疫抑制による重篤な感染の合併や悪性腫瘍の発症、治療の漸減・中止による関節炎の再燃が臨床的問題として残存している。

本研究は、より安全かつ有効な RA の新規治療標的を探索するため、炎症関節局所に存在する滑膜線維芽細胞 (fibroblast-like synoviocyte; FLS)に着目した。FLS は、関節内の複雑な炎症刺激に応答してサイトカイン・ケモカイン産生による血管内皮細胞の活性化や免疫担当細胞の滑膜内への誘導、基質分解酵素 (例: matrix metalloproteinases; MMPs)の発現による軟骨破壊、receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)の発現を通じた破骨細胞誘導による骨破壊をもたらす、RA の病態における主要なエフェクター細胞である。これまでに、特定の単一サイトカイン刺激に対する RA-FLS の応答性は評価されてきたが、実際の炎症関節内には数多くのサイトカインが混在することで複雑な刺激環境を形成し、RA-FLS における病的形質の獲得に寄与すると考えられる。

そこで本研究は、RA-FLS (n=30)を代表的サイトカイン (IFN- α ・IFN- γ ・TNF- α ・IL-1 β ・IL-6/sIL-6R・TGF- β 1・IL-17・IL-18)および関節内におけるサイトカインの混在をシミュレートした 8 種類全ての mixture (8-mix)で刺激し、次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing とヒストン蛋白の翻訳後修飾 (H3K4me1・H3K4me3・H3K27ac)に対する ChIP-sequencing を行った。そして、無刺激および単一サイトカイン刺激サンプルとの比較により、複合サイトカイン刺激 (8-mix)下で特異的に発現する転写調節因子を同定し、新規治療標的の探索を試みた。

まず、RNA-sequencing により得られた遺伝子発現データを、次元圧縮アルゴリズムの 1 つである t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE)により俯瞰すると、複合サイトカイン刺激 (8-mix)を受けた RA-FLS は、他の単独刺激を受けたサンプルと比較し、その遺伝子発現パタ

ーンに明確な特徴を有することが示唆された。また、各刺激条件における RA-FLS を用いて、RA の病態に直接的に関連する代表的遺伝子 (*IL6*・*MMP3*・*CXCL8*・*CCL2*・*TNFSF11*・*VEGF*)の継時的発現 (0・3・10・24・48 時間)を定量的 RT-PCR で評価したところ、8-mix 刺激を受けた RA-FLS では各遺伝子の発現が著明に亢進した。

次に、発現パターンの類似性を基準に遺伝子間のネットワークを抽出する解析手法である Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA)を用いて、複合サイトカイン刺激 (8-mix) による RA の病態関連遺伝子の発現亢進に寄与する因子の同定を試みた。WGCNA の結果、RNA-sequencing により発現解析された 23,710 個の遺伝子は、共発現のパターンから 18 個の遺伝子群 (module)に分類され、うち 7 個 (module No. 11~17)に 8-mix 刺激と強い相関が認められた。これら 7 個の module の発現量を刺激条件別にスコアリングすると、module No. 16 (507 遺伝子)は無刺激と比較して 8-mix 刺激でのみ発現量が亢進し、他の単独刺激では発現量の変動が少ない特徴的な module であることが分かった。更に、Module No. 16 には遺伝子発現を制御する 66 個のエピゲノム調節因子が含まれており、これらを module No. 16 に対する存在確率により順位付けしたところ、クロマチン構造のリモデリングに関わる E1A binding protein P300 (EP300)や lysine demethylase 5B (KDM5B)などが上位に挙げられた。

続いて、ChIP-sequencing データを用い、module No. 16 に含まれる上位エピゲノム調節因子が、複合サイトカイン刺激 (8-mix)下で特徴的に活性化する病態関連遺伝子の発現調節領域 (エンハンサー・プロモーター)に結合しうるか検討した。中でも、FLS が predominant source であり、破骨細胞分化や RANKL 発現などを通じて骨軟骨破壊に関与する *IL6* 領域に着目すると、8-mix 刺激で特異的に出現する活性化エンハンサーマーク (H3K27ac)のピークが認められた。ここに公共データベース (ChIP-Atlas)を参照し、module No. 16 から抽出された上位エピゲノム調節因子の ChIP-sequence データを統合すると、8-mix 刺激特異的な活性化エンハンサーマークと EP300 の結合ピークが一致した。以上の結果から、8-mix 刺激下での RA の病態関連遺伝子の発現亢進に対する、EP300 を介したエピゲノム調節の関与が示唆された。

最後に、*in vitro* および *in vivo* で、化合物による EP300 阻害が RA-FLS の機能に与える影響と、関節炎モデルマウス (collagen-induced arthritis; CIA)に対する効果を検討した。その結果、EP300 阻害薬である chetomin は、*in vitro* で RA-FLS からの *IL-6* 産生や増殖能・遊走能・浸潤能を用量依存性に抑制した。また、関節炎を発症した CIA マウスに対し、14 日間にわたり chetomin を連日腹腔内投与した *in vivo* の治療実験では、control (5% DMSO)群と比較し chetomin (1 mg/kg in 5% DMSO)群で有意に関節炎の増悪が抑制された。

EP300 は、それ自身は DNA 結合能をもたず、プロモーター・エンハンサー領域に結合する配列特異的転写因子 (例: p53・hypoxia-inducible factor [HIF]・signal transducer and activator of transcription [STAT])と基本転写因子 (例: TATA-binding protein [TBP])の間に介在して転写を調節する coactivator のひとつである。EP300 は、その分子構造内に存在する 4 つの transactivation domains (TADs)を介して転写因子を架橋する。また、histone acetyltransferase (HAT) 活性を持ち、

クロマチン構造を弛緩させることで近傍遺伝子の転写を活性化する。更に、K(lysine) acetyltransferase (KAT)活性によりヒストン蛋白のみならず複数の転写因子がアセチル化されることで、転写因子の活性が制御される。

これまでに、EP300は悪性腫瘍における新規治療標的として注目されており、EP300のKAT・HAT活性やアセチル化リジンと結合するbromodomain、転写因子との結合領域であるTADsを阻害することで、動物モデルにおける腫瘍進展が抑制された。中でも、EP300のKAT・HAT活性やbromodomainの阻害は、非選択的で広範な遺伝子発現への影響が懸念されるが、本研究で用いたchetominに代表されるTADs阻害は、標的遺伝子に対するより選択的な作用が期待できる。本研究では、*in silico*で抽出されたEP300による転写調節機構の修飾は、*in vitro*および*in vivo*における検証を経て、腫瘍領域のみならずRAに代表される自己免疫疾患の治療標的として有望であることが示唆された。今後、エピゲノム解析の統合により、複合サイトカイン刺激下でRAの病態関連遺伝子の発現調節領域に誘導され、EP300と複合体を形成するRA-FLS特異的な転写因子の同定を行い、有効性と安全性を兼ね備えた治療開発を目指したい。