

審査の結果の要旨

氏名 土屋 遥香

本研究は、関節リウマチ (Rheumatoid arthritis; RA)において安全性と有効性を兼ね備えた新規治療標的となる候補経路を探索するため、関節局所に存在する fibroblast like synoviocytes (FLS)に着目した。RA 患者の滑膜から分離培養した FLS (n=30)を、代表的サイトカイン (IFN- $\alpha$ ・IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$ ・IL-1 $\beta$ ・IL-6/sIL-6R・TGF- $\beta$ 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 (histone H3 mono-methylated at lysine 4 [H3K4me1]・histone H3 tri-methylated at lysine 4 [H3K4me3]・histone H3 acetylated at lysine 27 [H3K27ac])に対する chromatin immunoprecipitation (ChIP)-sequencing を実施することで、下記の結果を得ている。

1. 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。
2. 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。

3. 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され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)に結合しているか検討した。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。
4. *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。

以上、本論文はサイトカイン刺激下 RA-FLS のトランスクリプトーム解析・エピゲノム解析を通じ、複合サイトカイン刺激 (8-mix)下で特異的に発現が亢進し、RA における病態関連遺伝子 (例: IL-6)の 8-mix 刺激特異的エンハンサーに対する結合が示唆される転写調節因子 (EP300)を同定した。*In silico* で同定された 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、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可能性を内包しており、学位の授与に値すると考えられる。