

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

自己免疫性炎症性疾患におけるエピジェネティクス制御の解明

研究代表者 相崎 良美 (医学部 リウマチ膠原病科)

緒 言

ベーチェット病, 成人スティル病, 全身性エリテマトーデスなどの自己免疫性炎症性疾患は, 寛解に至ることもあるが, 一般的には活動期と非活動期を繰り返す慢性再発性の全身性炎症性疾患である。ベーチェット病の原因は未だ不明だが, HLA-B51 抗原陽性率が高い事, 一塩基多型との関連 (IL-10, IL-23R/IL-12RB2) などの遺伝的要因が指摘されている。しかしながら, 発生時期が中年である事, HLA-B51 抗原陽性者のうち発症はわずかなことなどから, 遺伝的要因だけではベーチェット病の発症や疾患活動性の惹起は考え難く, 外因性因子 (細菌・ウイルス感染, 環境) によって誘発されるとされている (Pineton de Chambrun M, et al. Autoimmun Rev 2012)。

近年, ヒストン修飾などのエピジェネティクス変化によりT細胞の活性化が起きることや (Wei G, et al. Immunity 2009), 関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどのリウマチ性疾患におけるエピジェネティクス変化が報告されている (Ballestar E. Nat Rev Rheumatol 2011)。ベーチェット病や成人スティル病などの疾患では好中球機能亢進, マクロファージ活性化が知られているため, 活性化T細胞分画のみならず好中球分画や単球・マクロファージ分画においてもエピジェネティクス異常が起きている可能性があり, 病態解明や新たな指標確立に末梢血白血球におけるエピジェネティクス解析が重要と考えられる。

本研究では, フローサイトメトリー法による末梢血有核細胞亜分画における網羅的ヒストン修飾の解析系を確立し, ベーチェット病患者における末梢血単核細胞と好中球の各分画におけるヒストン修飾の解析を行った。ヒストンアセチル化やヒストンメチル化のヒストン修飾は, 遺伝子転写を活性もしくは抑制する修飾が知られている。その代表的な修飾に対する抗体を用いて, 細胞を染色しフローサイトメトリー解析を行う (Dispirito JR, et al. Immunol 2010, Obier N, et al. Cells Tissues Organs 2010)。ベーチェット病患者の $\gamma\delta$ T細胞においてH3K4me3の平均蛍光強度 (MFI) 値が健常人に比して有意に上昇し, 好中

球においてH3K4me3/H3K27me3のMFI比が有意に低下し, $\gamma\delta$ T細胞においては有意に上昇していた。また活動期のベーチェット病患者では非活動期のベーチェット病患者と比較して, $\gamma\delta$ T細胞におけるH3K4me3のMFI値とH3K4me3/H3K27me3のMFI比がともに有意に上昇していた。以上の結果から, 末梢血白血球におけるヒストン修飾をフローサイトメトリー法にて検出することが可能となり, ベーチェット病の疾患活動性と関係していることが示唆された。本研究の結果を基に, 自己免疫性炎症性疾患の病態解明が進むとともに, 新しい検査・診断法の開発につながる事が期待される。

材料と方法

末梢血有核細胞の調整

埼玉医科大学倫理委員会および埼玉医科大学病院IRBの承認下にて, ベーチェット病患者 (活動期N=6, 非活動期N=7) および陰性対照である健常人 (N=12) から, 書面にて同意を得た後, 末梢血 20 mLの採血を行った。モノ・ポリ分離液 (DS PHARMA社, BNDSBN100) にて末梢血単核細胞と好中球の分画を回収し, 実験に用いた。

フローサイトメトリー法によるヒストン修飾の解析

細胞表面を染色後, 細胞を固定し細胞膜の透過処理を行い, 細胞内内部をAPC標識抗H3K4me3抗体 (Cell Signaling Technology社, 12064S) およびFITC標識抗H3K27me3抗体 (Cell Signaling Technology社, 5499S) で染色し, それぞれの細胞分画内のヒストンメチル化の割合を平均蛍光強度 (MFI) として, フローサイトメーター (BD社製, FACS Calibur HGフローサイトメーター) により測定した。内在性コントロールとして, APC標識抗rabbit IgG抗体 (Cell Signaling Technology社, 2985S) およびFITC標識抗rabbit IgG抗体 (Cell Signaling Technology社, 2975S) を使用した。H3K27me3抗体のMFI値は, 内在性コントロールのrabbit IgGのMFIで除して補正して算出し, H3K4me3抗体についても同様に行った。

統計

Mann-WhitneyのU-testにてP値<0.05を有意差ありと判断した。

結 果

自己免疫性炎症性疾患であるベーチェット病患者の疾患活動性にエピジェネティクス制御の異常が関与しているのではないかと仮定し、その変化をフローサイトメトリー法にて検出できるか、本研究で検証を行った。ベーチェット病および健常人から末梢白血球を分離し、CD4 陽性T細胞、CD8 陽性T細胞、好中球、 $\gamma\delta$ T細胞の4つの分画におけるヒストンメチル化を比較した。H3K4me3は緩んだクロマチン構造部に見られるヒストン修飾であり、遺伝子転写を正に制御すると考えられている。一方、H3K27me3は凝縮したクロマチン構造に存在し、遺伝子転写を負に制御すると考えられている。健常人と比較してベーチェット病においては、H3K27me3のMFIに有意差は見られなかった(図1)。しかしながら、H3K4me3のMFIは $\gamma\delta$ T細胞の分画において、ベーチェット病で有意に高値であり(図2)、H3K4me3/H3K27me3のMFI比は、好中球においては有意に低下し $\gamma\delta$ T細胞の分画においては有意に上昇していた(図3)。

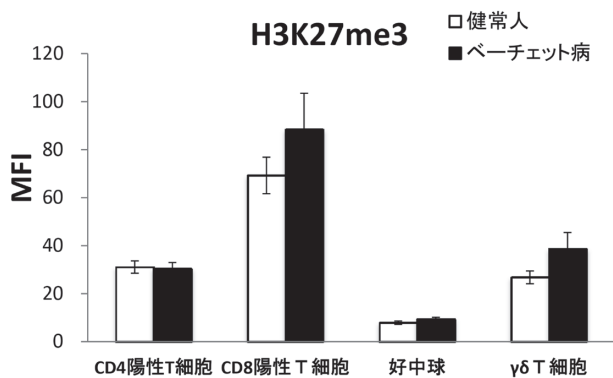


図1. ベーチェット病患者におけるH3K27me3のMFI。(健常人 N=12, ベーチェット病 N=13)

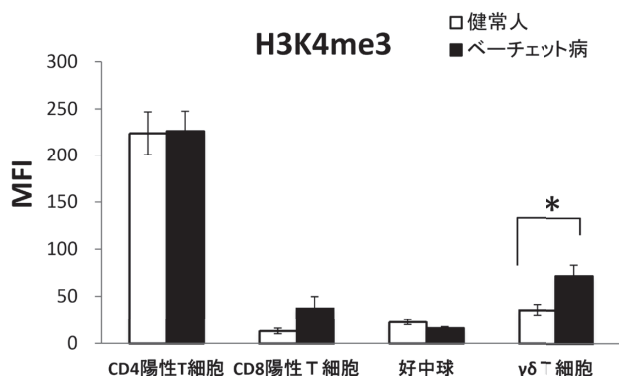


図2. ベーチェット病患者におけるH3K4me3のMFI。(健常人 N=12, ベーチェット病 N=13; * $P<0.05$) $\gamma\delta$ T細胞においてベーチェット病患者では有意に高い。

さらに、眼病変、粘膜病変、皮膚病変などのベーチェット病特有症状のいずれかが認められ、炎症徴候が明らかな活動期と診断されたベーチェット病患者と非活動期のベーチェット病患者で比較したところ、 $\gamma\delta$ T細胞のH3K4me3のMFIおよびH3K4me3/H3K27me3のMFI比がともに有意に上昇していた(図4)。

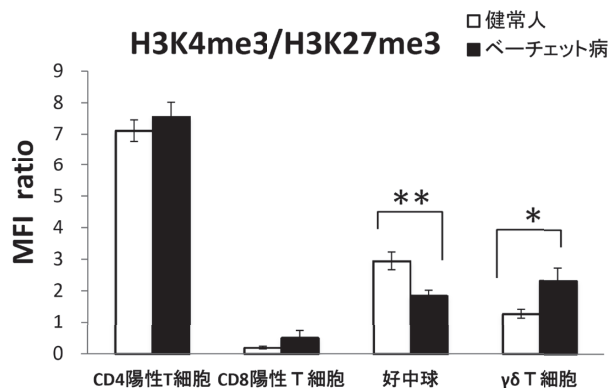


図3. ベーチェット病患者におけるH3K4me3/H3K27me3のMFI ratio。(健常人 N=12, ベーチェット病 N=13; * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

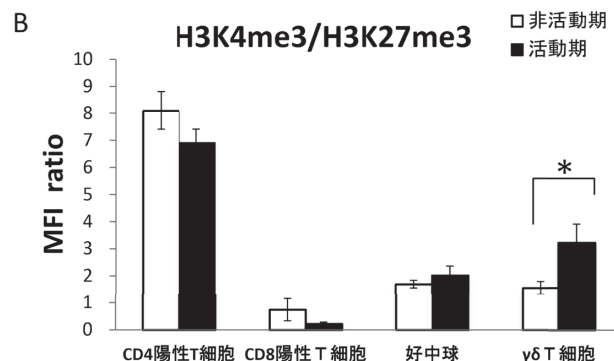
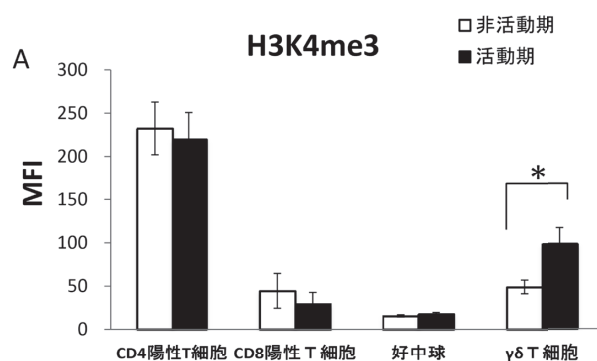


図4. ベーチェット病活動期におけるヒストンメチル化の変化。(活動期 N=6, 非活動期 N=7; * $P<0.05$) A) H3K4me3のMFI. $\gamma\delta$ T細胞においてベーチェット病活動期で有意に高値。B) H3K4me3/H3K27me3のMFI ratio. $\gamma\delta$ T細胞においてベーチェット病活動期で有意に高値。

考 察

ベーチェット病患者の末梢血白血球におけるヒストン修飾の変化をフローサイトメトリー法にて検出が可能であることが示された。ヒストン修飾の変化は、一般的にクロマチン免疫沈降後に標的遺伝子の発現レベルをリアルタイムPCRで見ているが、フローサイトメトリー法の利点は、末梢血からモノ・ポリ分離液で遠心分離後、生細胞のまま解析ができ、迅速かつ一度に複数のヒストン修飾と表面抗原を組み合わせることで末梢血有核細胞重分画におけるヒストン修飾を網羅的に解析できるところであり、機能的重分画毎の変化を検出することが可能となる。健常人と比較してベーチェット病においては好中球と $\gamma\delta$ T細胞のヒストン修飾に変化が見られ、この変化が疾患活動性と関連する可能性が示唆された。さらにベーチェット病患者では、 $\gamma\delta$ T細胞から産生されるIL-17によって好中球が活性化されていると報告がされており、今回の結果よりこれらの機序にヒストン修飾が関与しているのではないかと推測している。現在、ベーチェット病の診断は臨床所見に基づいており、特異的な検査がないため、診断に苦慮する機会が多い事が临床上の問題の一つである。また、ベーチェット病において炎症反応が一般的に疾患活動性の指標に用いられているが、ベーチェット病でみられる白血球機能異常（好中球やリンパ球の活性化）の病態を反映していない。今回の結果より、末梢血白血球のヒストン修飾の変化がベーチェット病患者の疾患活動性と関連していると考え、診断の補助や治療の開発につながる事が期待される。

今後、ベーチェット病以外の疾患でも特異的に検出可能か検討し、このヒストン修飾変化によって制御されている標的分子を明らかにすることで、より病態との関係の解明につながる事が予想される。

謝 辞

本研究の実施にあたり、埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の三村俊英教授と荒木靖人講師には多大なご指導を賜り、深く感謝申し上げます。同意や臨床所見の

取得など本研究の実施にあたり様々なご協力を頂きました。埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の先生方にも深謝いたします。

研究成果リスト

論文

- 1) 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;444:682-6.

学会発表

- 1) 荒木 靖人, 和田 琢, 相崎良美, 黒澤奈津子, 佐藤浩二郎, 横田和浩, 藤本健太, 鈴木志穂, 米田竜馬, 金 潤澤, 織田弘美, 黒川理樹, 三村俊英. 関節リウマチの病態におけるヒストンリシンメチル基転移酵素の役割. 第12回RCGMフロンティア国際シンポジウム, 2014年11月1日, 埼玉県日高市
- 2) Yokota K, Sato K, Aizaki Y, Akiyama Y, Mimura T. Human CD14+ Monocytes Stimulated with a Combination of TNF α and IL-6 Differentiate into Osteoclast-like Cells with Bone-Resorption Activity. 2014 ACR/ARHP Annual Meeting, 2014年11月16日, Boston, USA
- 3) 荒木靖人, 和田 琢, 相崎良美, 黒川理樹, 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リシンメチル基転移酵素の異常, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月27日, パシフィコ横浜

特許出願

特許番号 : 特願 2014-200824

出願日 : 2014年9月30日

発明の名称: 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