学内グラント 報告書

平成 22–23 年度　学内グラント終了時報告書

関節リウマチにおけるエピジェネティクス制御の異常の解明

研究代表者　荒木　靖人（大学病院　リウマチ膠原病科）

緒　言

関節リウマチは，全身の関節に慢性炎症を来す難治性の自己免疫疾患である．関節内の滑膜組織が増生し，進行性に軟骨と骨が破壊される．関節リウマチの多発家系の存在，関節リウマチ患者のHLA-DR4陽性率が高い事，一塩基多型との関連（*PADI4*，*PTPN22*，*CCR6* 遺伝子）が指摘されており，遺伝的要因の関与は明らかである．一方，それだけでは関節リウマチの発症は説明できず，環境的要因（ウイルス感染症，喫煙）などの非遺伝的要因が関与していると推測されている．また，関節リウマチの発症機序を考えると，リウマチ因子や抗CCP抗体などの自己抗体，活性化マクロファージやCD4陽性T細胞の滑膜への浸潤，炎症関節における炎症性サイトカイン産生などの免疫異常が存在しており，これにより関節破壊や滑膜増殖につながっている．このような自己免疫反応と同時に，自然免疫反応（Toll-like receptorを介する反応など）も関与して，関節局所にて炎症が誘導されている．関節リウマチの滑膜線維芽細胞はマクロファージやリンパ球により刺激（TNF α，IL-1 β などの炎症性サイトカイン）されて活性化している．活性化した滑膜線維芽細胞は，炎症性サイトカイン・ケモカイン産生，基質分解酵素分泌により関節破壊を起こす一方，増殖能亢進，アポトーシス感受性低下などの癌細胞と似た形質も持つ．しかしながら，滑膜線維芽細胞の活性化がどのように起こり，維持されているのかは不明である．

エピジェネティクスの機構がクロマチンの構造および遺伝子転写と関連している事から，我々はエピジェネティクス制御の異常が関節リウマチの滑膜炎の病態に関わっているのではないかと考えた．エピジェネティクスとは，遺伝子配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構を意味し，主な機序としてDNAメチル化，ヒストン修飾，クロマチンリモデリング，非コードRNA（micro RNAなど）が挙げられる．エピジェネティクス制御の異常が癌細胞において多数報告されており，腎慢性線維化，統合失調症，神経変性疾患，糖尿病などの様々な後天的疾患においても同様な異常が報告されている．上記に述べたように，関節リウマチの滑膜線維芽細胞は活性化しており，(1) 炎症性サイトカイン・ケモカイン産生（IL-6，IL-8），(2) 骨・軟骨破壊（matrix metalloproteinase：MMP，cathepsin）(3) 細胞増殖（cyclin D1，TGF β 1，VEGF），などの特異的遺伝子発現が報告されている．我々は，これらの遺伝子発現の原因の一つに，エピジェネティクス制御の異常があるのではないかと考えた．

本研究では，関節リウマチの滑膜炎にエピジェネティクス制御の異常が関連しているかを明らかにするために，基質分解酵素である *MMP* 遺伝子に焦点を当ててヒストン修飾の役割を検討した．ヒストン修飾にはヒストンアセチル化やメチル化など多数の修飾があり，正もしくは負に遺伝子転写を制御する修飾がそれぞれ知られている．関節リウマチの滑膜線維芽細胞とその陰性対照である変形性関節症の滑膜線維芽細胞において，*MMP* 遺伝子の発現とヒストン修飾を調べた．*MMP1*，*3*，*9*，*13* 遺伝子発現は，関節リウマチの滑膜線維芽細胞において変形性関節症に比べて有意に高値であった．関節リウマチの滑膜線維芽細胞において，*MMP* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾は，遺伝子発現の亢進を説明できる変化を示していた．さらに，関節リウマチの滑膜線維芽細胞において，*MMP1*，*3*，*13* 遺伝子発現はIL-6反応性であった．以上の結果から，ヒストン修飾は関節リウマチの滑膜線維芽細胞における *MMP* 遺伝子発現と相関しており，関節リウマチの滑膜線維芽細胞の活性化に重要な役割を果たしている事が示唆された．本研究の結果を基に，関節リウマチの新しい検査・診断法及びエピジェネティクスを制御する新しい治療の開発につながる事が期待される．

材料と方法

【抗体と試薬】

抗 H3K4me3 抗体（07-473），抗 H3K27me3 抗体（17-622）はMillipore社より購入した．ヒトリコンビナントIL-6，ヒトリコンビナント可溶性IL-6Rα（sIL-6Rα）はPeproTech社より購入した．

【滑膜線維芽細胞の調製および刺激培養】

埼玉医科大学倫理委員会の承認下に，関節リウマチおよび陰性対照である変形性関節症の患者から，書面によりインフォームド・コンセントを得た後，当院整形外科における人工関節置換術時に滑膜組織を採取した．滑膜組織を細切後，1.5 mg/ml collagenaseと0.04％hyaluronidaseを添加したDMEM溶液に懸濁して，37℃にて2時間震盪した．ナイロンメッシュを通過させた後，10％ FBSと1％ Penicillin/Streptomycinを添加したDMEM溶液中にて，37℃，5% CO2下において培養した．0.25% Trypsin-EDTA溶液を用いて，培養細胞の継代を行った．4-8回継代した細胞を，滑膜線維芽細胞として実験に用いた．

100 ng/μlヒトリコンビナントIL-6，100 ng/μlヒトリコンビナントsIL-6Rαの存在下あるいは非存在下にて滑膜線維芽細胞を4，24時間刺激培養した後，細胞を回収して実験に用いた．

【逆転写反応と定量的PCR】

培養細胞をTRIzol（Invitrogen社）に懸濁した後，付属のプロトコールに従い，mRNAを分離した．SuperScript III（Invitrogen社）とOligo(dT)12-18 primer（Invitrogen社）を用いて逆転写反応を行い，cDNAを作成した．各遺伝子特異的なプライマーを用いて，リアルタイムPCR（Applied Biosystems社のStepOnePlusシステム）を行い，*β-actin*をinternal controlとして各遺伝子発現を数値化して比較検討を行った．

【クロマチン免疫沈降（ChIP）法と定量的PCR】

培養細胞を0.2％ Triton X-100にて溶解し，0.2 U micrococcal nuclease（Sigma社）処理をする事によりモノヌクレオソームとゲノムDNAの複合体の状態にした．各ヒストン修飾特異的抗体を用いて免疫沈降反応を行った後，回収された複合体を洗浄し，1 mg/ml proteinase Kおよび0.3％SDSにて処理を行い，複合体からDNAを分離した．フェノール・クロロホルムにてDNAを抽出し，エタノール沈殿によりDNAを精製した．各遺伝子特異的なプライマーを用いて，リアルタイムPCRを行い，免疫沈降していないDNA（input）に対する免疫沈降にて回収されたDNAの割合を計算して比較検討を行った．

【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

我々は，関節リウマチの滑膜線維芽細胞の活性化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，本研究で検証を行った．*MMP1*，*3*，*9*，*13*は，関節リウマチの病態に関与している事が報告されており，これらの*MMP*遺伝子を対象に，エピジェネティクス制御としてヒストン修飾の程度を調べる事とした．関節リウマチ及びその陰性対照としての変形性関節症の患者から滑膜線維芽細胞を分離し，*MMP1*，*3*，*9*，*13*の4つの遺伝子に関して遺伝子発現を比較した（図1）．予想された通り，これらの4つの*MMP*遺伝子は，関節リウマチの滑膜線維芽細胞において高発現していた．次に，各*MMP*遺伝子のプロモーター領域におけるヒストンメチル化（H3K4me3，H3K27me3）をChIP法及びリアルタイムPCR法にて比較検討した．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ヒストン活性化マーカーと考えられている．一方，H3K27me3は凝縮したクロマチン構造部に存在し，遺伝子転写を負に制御するヒストン抑制性マーカーと考えられている．関節リウマチの滑膜線

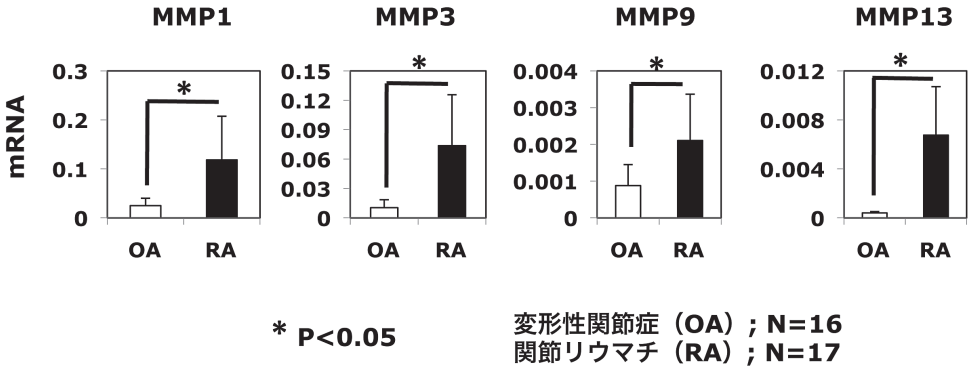

図 1. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞における*MMP*遺伝子発現．

維芽細胞では，*MMP1*，*3*，*9*，*13*遺伝子のプロモーター領域において，H3K4me3は有意に高値を示した（図2）．H3K27me3は*MMP1*，*9*遺伝子において有意に低値であったが，*MMP3*，*13*遺伝子においては低値である傾向はあるものの有意差は認められなかった（図3）．これらの結果から，関節リウマチの滑膜線維芽細胞において，*MMP1*，*3*，*9*，*13*遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造は緩んだ状態であると考えられた．そのために遺伝子転写が亢進していると考えられたが，さらに関節リウマチにおいて炎症性サイトカインなどの刺激に対する反応性が亢進しているのではないかと予想された．IL-6は関節リウマチの病態に関与する炎症性サイトカインの一つであり，ヒト化抗sIL-6Rモノクローナル抗体は関節リウマチの治療にも用いられている．IL-6受容体はgp130分子と膜結合型IL-6Rαから構成されるが，IL-6Rαは可溶性蛋白としても存在しており，gp130分子にIL-6とsIL-6Rαの両者が結合する事によりIL-6刺激が入る経路も存在する．そこで，IL-6のみ，あるいはIL-6とsIL-6Rαにて刺激を行ったところ，関節リウマチ滑膜線維芽細胞において，*MMP1*，*3*，*13*遺伝子の発現が亢進したが，変形性関節症滑膜線維芽細胞においては変化が見られなかった（図4）．一方，*MMP9*遺伝子の発現は，これらの刺激に対して関節リウマチ滑膜線維芽細胞において反応が見られず，*MMP1*，*3*，*13*遺伝子とはIL-6への反応性が異なると考えられた．以上の結果より，*MMP*遺伝子発現制御にはヒストン修飾が重要な役割を果たしていると考えられた．

考　察

本研究の結果から，関節リウマチ滑膜線維芽細胞の活性化にエピジェネティクス制御の異常が関連していることが示された．関節リウマチの滑膜線維芽細胞において，*MMP1*，*3*，*9*，*13*遺伝子発現の亢進がヒストン修飾の変化と相関しており，*MMP*遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造が関節リウマチの滑膜炎の病態において重要な役割を果たしていると考えられた．さらに，*MMP1*，*3*，*13*遺伝子において，緩んだクロマチン構造のために炎症性サイトカインIL-6刺激に対する反応性が亢進している事が示唆された．クロマチン構造の変化により関節リウマチの滑膜線維芽細胞の活性化が起こっていると考えると，これを基に新しい検査・診断，治療の開発につながる事が期待される．

*MMP*遺伝子は炎症性サイトカインのTNF-α，IL-1-βにて活性化される事が知られているが，IL-6にて活性化されるという報告はこれまでにない．皮膚の線維芽細胞にてIL-6刺激にて*MMP*の活性化が起

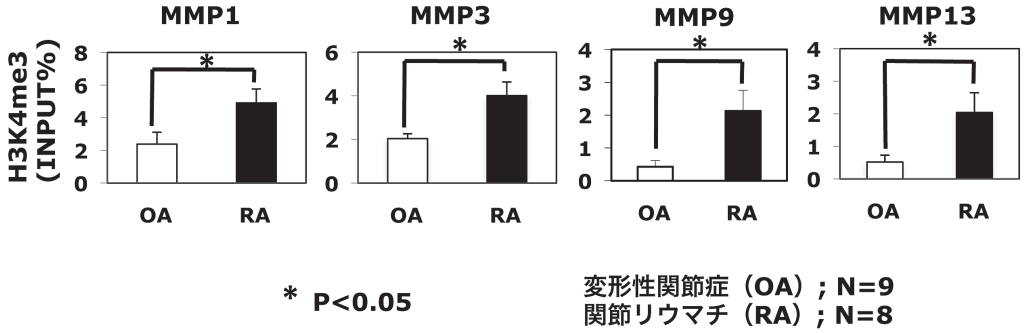

図 2. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるH3K4me3.

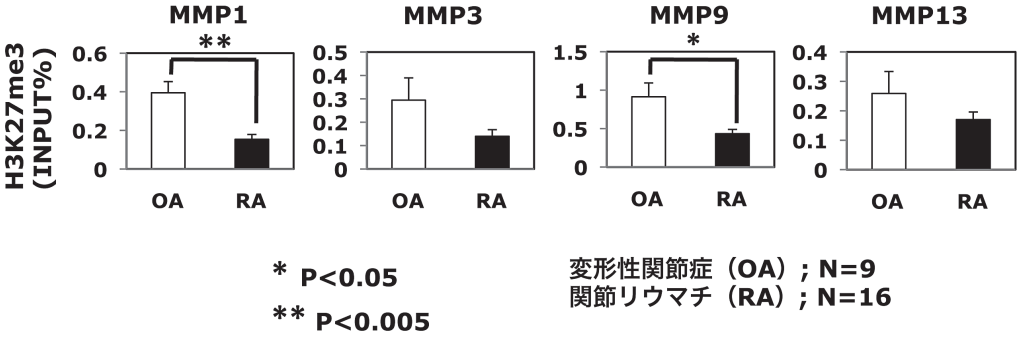

図 3. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるH3K27me3.

こるという事は報告されている．関節リウマチにおいてIL-6は治療の標的分子の一つであり，関節炎の病態に強く関わっていると考えられているが，その機序の一つとして*MMP*分子の活性化があるという事を本研究では示す事が出来た．

興味深い事に，*MMP1*，*3*，*9*，*13*遺伝子のプロモーター領域のクロマチン構造はすべて緩んだ構造であるにもかかわらず，IL-6に対する反応性が異なる事が判明した．*MMP1*，*3*，*13*遺伝子はIL-6反応性であるにもかかわらず，*MMP9*遺伝子ではIL-6に反応性が認められなかった．遺伝子転写の制御に関わる機構として，クロマチン構造以外に転写因子の結合がある事から，おそらく*MMP9*遺伝子では転写因子の結合に関して，他の*MMP*遺伝子と差があるのではないかと推測している．IL-6刺激シグナルの下流において，転写因子のSTAT3が働く事が知られている．今後，各*MMP*遺伝子のプロモーター領域におけるSTAT3の結合に関して検討を進めたいと考えている．

近年，様々な疾患の病因としてエピジェネティクスの異常が判明し，精力的に研究されている．関節リウマチにおいてもまた同様であり，DNAメチル化，microRNAの関与が報告された．我々はヒストン修飾の異常という観点から関節リウマチの病態を解明していきたいと考えている．本研究の成果では，その足がかりとなる結果が得られた．

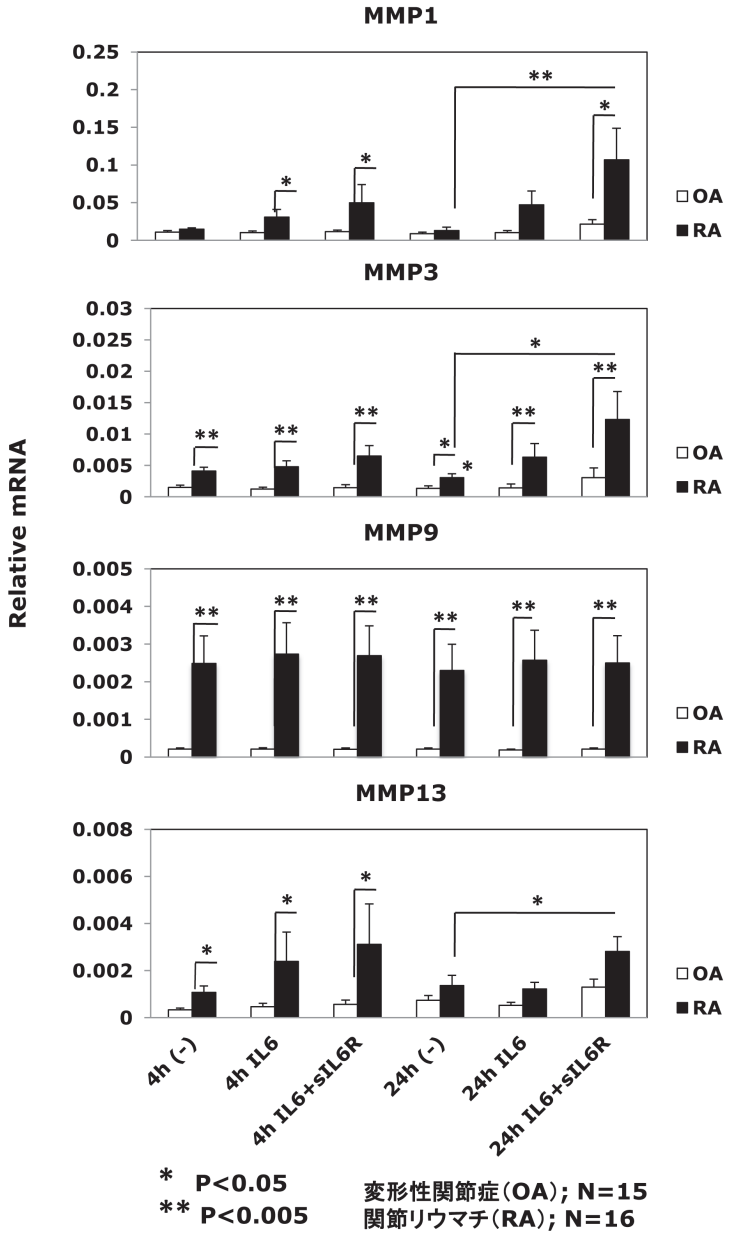

図 4. 関節リウマチ滑膜線維芽細胞におけるIL-6，刺激後の*MMP*遺伝子発現変化．

謝 辞

本研究施行にあたり，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ゲノム医学研究センター遺伝子構造機能部門の黒川教授には多大なご指導を頂き，感謝申し上げます．滑膜組織の採取にご協力いただきました埼玉医科大学医学部整形外科・脊椎外科の織田弘美教授と金潤澤教授に感謝いたします．埼玉医科大学医学部リウマチ膠原病科の医局員および助手の方々には本研究の施行にあたり様々なご協力を頂き，感謝いたします．細胞培養や分子生物学的実験の技術的協力を頂きました黒澤奈津子様にも深謝いたします．

研究成果リスト

論文

1) Weng NP, Araki Y, Subedi K. The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. Nat Rev Immunol 2012;12:306-15.
2) Sato K, Miyoshi F, Yokota K, Araki Y, Asanuma Y, Akiyama Y, et al. Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. J Biol Chem 2011;286:14963-71.
3) 荒木靖人．CD8陽性T細胞の分化・機能におけるヒストン修飾の役割：ゲノムワイドな解析を含めた最新の知見．臨床免疫学会誌 2011;34:131-7.

学会発表

1) Araki Y, Yokota K, Sato K, Miyoshi F, Wada T, Kim YT, Oda H, Mimura T. Histone methylation is associated with MMP gene expressions in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, The 4th East Asian Group of Rheumatology (EAGOR2011), October 15, 2011, Tokyo, Japan
2) 荒木靖人，横田和浩，三由文彦，佐藤浩二郎，金潤澤，織田弘美，三村俊英．関節リウマチの滑膜線維芽細胞におけるヒストンメチル化はMMPs遺伝子発現と関連する，第55回日本リウマチ学会総会・学術集会，平成23年7月，神戸
3) Subedi K, Araki Y, De S, Wood W, Sharov A, Zang C, Schones D, Lhotsky B, Dudekula D, Becker K, Ko M, Peng W, Zhao K, Weng NP. Dynamic changes of gene expression in concordance with histone modifications in CD8 T cells after activation. 98th The American Association of Immunologists Annual Meeting, May 13-17, 2011, San Francisco, California

特許出願

該当なし

© 2012 The Medical Society of Saitama Medical University