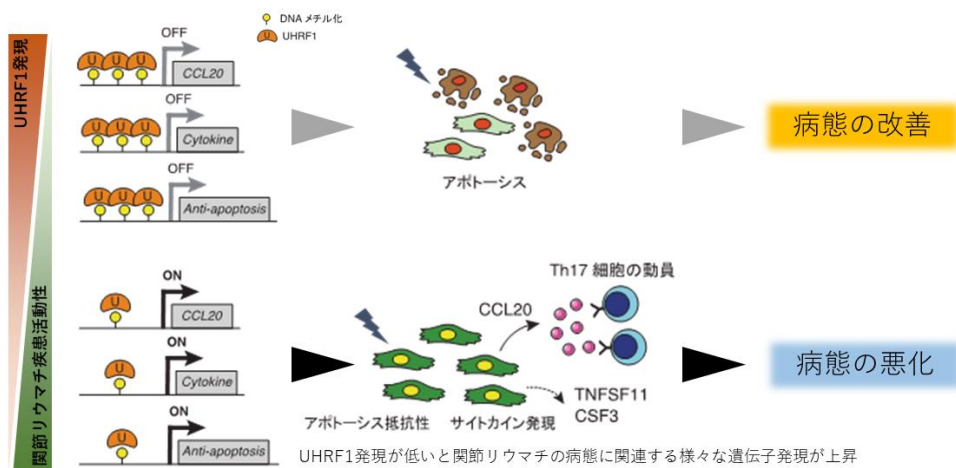


令和 4 年 4 月 27 日
愛 媛 大 学

関節リウマチの病態を網羅的に制御する分子を発見 -新規治療標的および診断マーカーの開発に貢献-



本研究成果の今後の
展開・期待

- ・ UHRF1発現レベルを高く保つ、関節リウマチの新たな治療戦略
- ・ 現在治療抵抗性の関節リウマチ患者の診療マーカー開発

愛媛大学の佐伯法学講師（学術支援センター医科学研究支援部門、プロテオサイエンスセンター病態生理解析部門兼任）、今井祐記教授（プロテオサイエンスセンター病態生理解析部門）、星薬科大学の五十嵐勝秀教授（生命機能創成科学研究室）らの研究グループは、関節リウマチの滑膜で発現が上昇し、様々な病態を網羅的に抑制するエピジェネティック制御分子 UHRF1 を同定しました。臨床サンプルを解析すると UHRF1 の発現が低い患者が一定数存在し、UHRF1 発現レベルと疾患活動性に負の相関が認められました。また、UHRF1 の発現を維持する薬剤の投与で関節炎病態が改善することをマウスモデル等で明らかにしました。今後、関節リウマチ患者の UHRF1 の発現維持が新しい治療戦略になることが期待されます。

本研究は、米国医学系国際雑誌「The Journal of Clinical Investigation」に 2022 年 4 月 26 日 12 時（米国東部時間）に掲載されました。

研究に関する問い合わせ先

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター
病態生理解析部門
教授 今井 祐記（いまい ゆうき）
TEL：089-960-5925
E-mail：y-imai@m.ehime-u.ac.jp

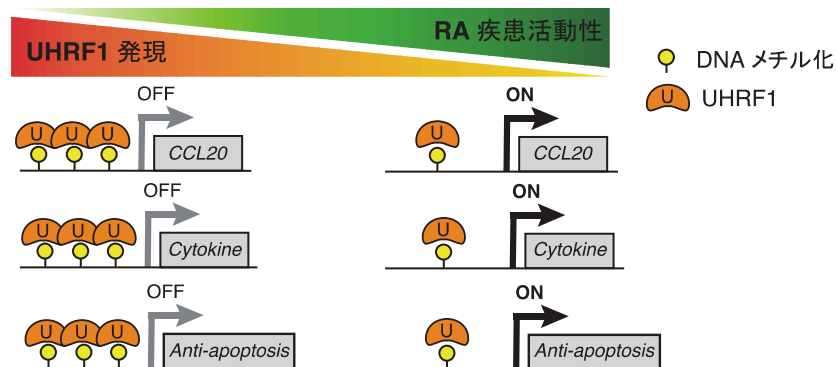


関節リウマチの病態を網羅的に制御する分子を発見 -新規治療標的および診断マーカーの開発に貢献-

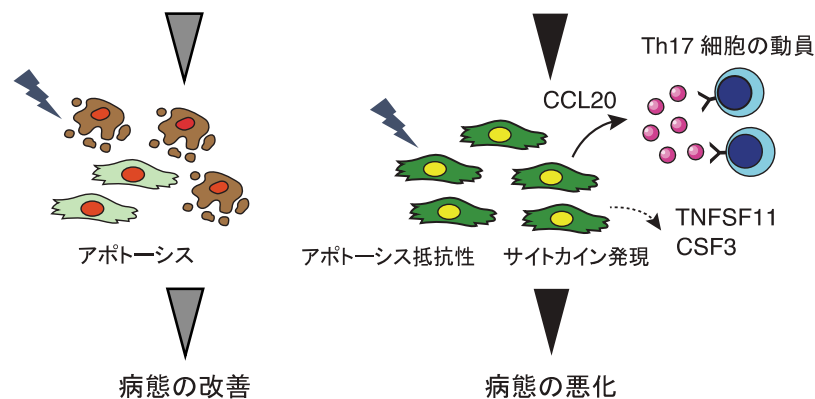
1. 概要

佐伯法学講師(愛媛大学学術支援センター医科学研究支援部門, プロテオサイエンスセンター病態生理解析部門兼任), 今井祐記教授(同プロテオサイエンスセンター病態生理解析部門), 五十嵐勝秀教授(星薬科大学)らの研究グループは, 関節リウマチの滑膜で発現が上昇し, 様々な病態を網羅的に抑制するエピジェネティック制御分子 UHRF1 を同定しました。臨床サンプルを解析すると UHRF1 の発現が低い患者が一定数存在し, UHRF1 発現レベルと疾患活動性に負の相関が認められました。また, UHRF1 の発現を維持することで関節炎病態が改善することをマウスモデル等で明らかにしました。今後, 関節リウマチ患者の UHRF1 の発現維持が新しい治療戦略になることが期待されます。本研究は, 米国医学系国際雑誌「The Journal of Clinical Investigation」に 2022 年 4 月 26 日 12 時(米国東部時間)に掲載されました。

RA患者のUHRF1発現レベルと疾患活動性とは負の相関がある



UHRF1発現が低いとRA病態に関連した様々な遺伝子発現が上昇する



- ・UHRF1発現レベルを高く保つことはRAの新たな治療戦略となる
- ・現在治療抵抗性のRA患者の診断マーカーになる可能性

本研究の概略図

研究のポイント

- ・関節リウマチ病態で発現上昇するエピジェネティック制御分子 UHRF1 を同定しました。
- ・関節リウマチ病態における UHRF1 の機能は様々な病態の抑制であることを明らかにしました。
- ・UHRF1 の発現を維持することで関節炎病態を抑制できることを明らかにしました。
- ・UHRF1 発現維持は関節リウマチの新規治療戦略になることが期待されます。

2. 背景

関節リウマチは、滑膜(注 1)の慢性炎症をはじめとする複合的な病態により関節破壊を引き起こす代表的な自己免疫疾患です。世界的に罹患率の高い疾患であり、国内でも 80 万人以上の関節リウマチ患者がいると考えられています。近年、生物学的製剤(注 2)や分子標的薬(注 3)が使用されるようになり、関節リウマチ治療は大きく改善しました。しかしながら、これらの薬剤は高額のため社会的負担が大きいこと、免疫抑制の副作用があること、約 20%の患者には十分な効果が認められないことなどの様々な問題点あり、今後の課題となっています。

関節リウマチの発症や増悪には、先天のおよび後天的な要因が考えられています。これまで後天的な要因のうち、エピジェネティック(注 4)異常、特に滑膜細胞の DNA 低メチル化(注 5)が病態の増悪に関わっていることが示唆されてきましたが、DNA 低メチル化状態になるメカニズムはほとんど分かっていませんでした。また、関節リウマチに関して、これまでエピジェネティック異常を対象とした有効な治療法は確立されていません。

我々は、関節炎モデルマウスおよび臨床サンプルを用いて、関節リウマチ病態に寄与するエピジェネティック制御分子の同定とその分子メカニズムの解析を行い、同定された分子が新規治療標的となり得るか評価しました。

3. 研究手法と成果

関節リウマチ研究に汎用される関節炎モデルマウスを作出し、関節炎組織から採取した mRNA を用いて DNA マイクロアレイ(注 6)を行い、網羅的な遺伝子発現パターンを解析しました。正常組織と比較して、発現変動の見られた遺伝子のうち、エピジェネティクス制御に関わるものを抽出したところ、UHRF1 が関節炎組織で最も発現上昇していることが明らかとなりました。UHRF1 は細胞分裂時に DNA メチル化の維持に必須の分子として知られていましたが、関節リウマチ病態における機能は不明でした。そこで、我々は、「関節炎に伴い発現上昇する UHRF1 は DNA メチル化を介して関節リウマチ病態を制御しているのではないか?」「UHRF1 の制御は関節リウマチの新規治療法に繋がるのではないか?」と仮説を立て、研究を進めることにしました。

次に、免疫組織染色により、UHRF1 が滑膜炎組織の滑膜線維芽細胞に発現していることが判明したため、滑膜線維芽細胞特異的 UHRF1 欠損(cKO)マウスを作出し、関節炎を誘導しました。その結果、対照(Control)マウスと比較して cKO マウスでは滑膜増生、関節破壊、アポトーシス抵抗性(注 7)など様々な病態が有意に悪化しました(図1)。

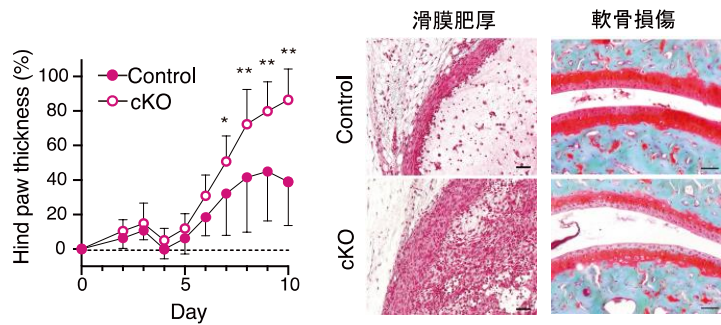


図1 滑膜線維芽細胞特異的UHRF1欠損(cKO)マウスは対象マウス(Control)と比較して足の腫脹(左グラフ)、滑膜肥厚(中央)、軟骨損傷(右)など様々な病態が悪化する。

UHRF1の分子メカニズムを明らかにするため、ControlマウスとcKOマウスから滑膜線維芽細胞を採取し、RNAシーケンス(注8)とMBD2シーケンス(注9)を実施しゲノムワイドな統合解析を行いました。その結果、cKOマウス由来の滑膜線維芽細胞はサイトカイン関連や関節リウマチ関連の遺伝子(CCL20, TNFSF11, CCL5など)をコードする遺伝子座近傍のDNAのメチル化が減少し、遺伝子発現レベルが上昇していることが明らかとなりました(図2)。

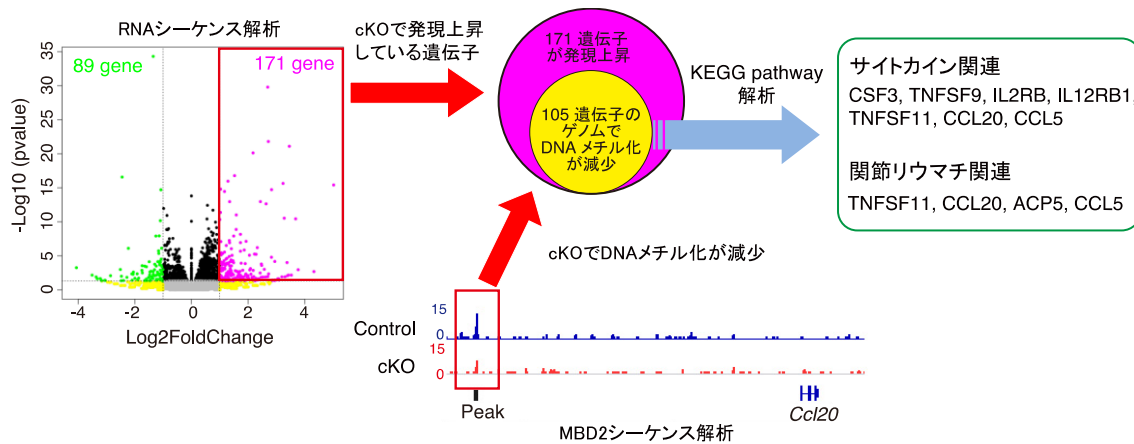


図2 RNAシーケンス解析とMBD2シーケンス解析による統合解析の概略図。
UHRF1を欠損した滑膜線維芽細胞では関節リウマチに関連した様々な遺伝子発現が上昇している。

中でもCCL20は自己免疫疾患の増悪に関わるTh17細胞をリクルートする分子として知られてきたため、解析を進めたところ、Th17細胞はcKOの関節組織内で有意に増加していることが明らかとなりました。以上より、滑膜線維芽細胞に発現するUHRF1は、様々な関節リウマチ関連遺伝子のDNAメチル化を誘導することで発現を抑制する保護的な役割があることが示唆されました。

さらに、マウスで得られた知見がヒトに応用されるか検証するため、関節リウマチ患者および変形性関節症患者(対照群)から得られた臨床サンプルを用いて解析しました。滑膜組織のUHRF1発現は関節リウマチ患者で有意に上昇していましたが、発現レベルは患者によってばらつきが認められました。そこで、関節リウマチの疾患活動性(注10)とUHRF1発現レベルの相関を調べたところ、

UHRF1 発現は DAS28(注 11)と有意な負の相関が認められました(図 3)。

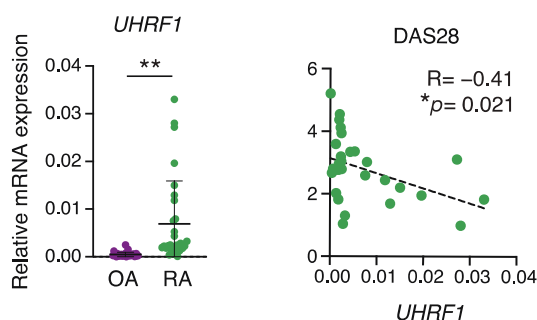


図3 変形性関節症(OA)と比べて関節リウマチ(RA)患者の滑膜組織におけるUHRF1発現は高い(左)。RA患者のUHRF1発現は疾患活動性の指標であるDAS28と負の相関を示す(右)。

また、データベースを再解析すると、既存の抗リウマチ薬による疾患活動性の減少と UHRF1 発現レベルに負の相関がある(UHRF1 が高いほど改善効果が見られる)ことも判明しました。さらに、関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞の UHRF1 発現はマウスと同様に、CCL20 の発現および滑膜組織内の Th17 細胞数、アポトーシス抵抗性と負の相関があることが明らかとなりました。以上の結果から、関節リウマチの滑膜線維芽細胞に発現する UHRF1 はマウスと同様に関節炎病態に対する保護的な役割があることが明らかとなり、何らかの理由で UHRF1 発現上昇が不十分な場合に関節リウマチ病態が悪化することが示唆されました。

これまでの結果から、我々は滑膜線維芽細胞の UHRF1 発現を十分に維持することが新たな関節リウマチ治療につながるのではないかと考えました。過去の報告によると、SET8 というタンパク質メチル化酵素の標的の一つが UHRF1 であり、そのメチル化修飾が UHRF1 タンパク質の分解に働くことが報告されていました。また、SET8 に対する低分子阻害剤はすでにいくつか報告されていました。そこで、SET8 阻害剤が UHRF1 発現を維持するか HEK293 細胞を用いて解析したところ、Ryuidine という阻害剤が最も UHRF1 発現維持に効果的であることが明らかとなりました。Ryuidine を関節炎モデルマウスに投与したところ、滑膜線維芽細胞での UHRF1 発現維持が認められ、滑膜増生、アポトーシス抵抗性、血中 CCL20 レベルの全てが改善された。また、Ryuidine の効果をヒト滑膜で検証するため、関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞を用いたオルガノイド培養(注 12)を実施しました。その結果、オルガノイドに Ryuidine 添加すると、滑膜様構造の減少とアポトーシス誘導が認められました(図 4)。

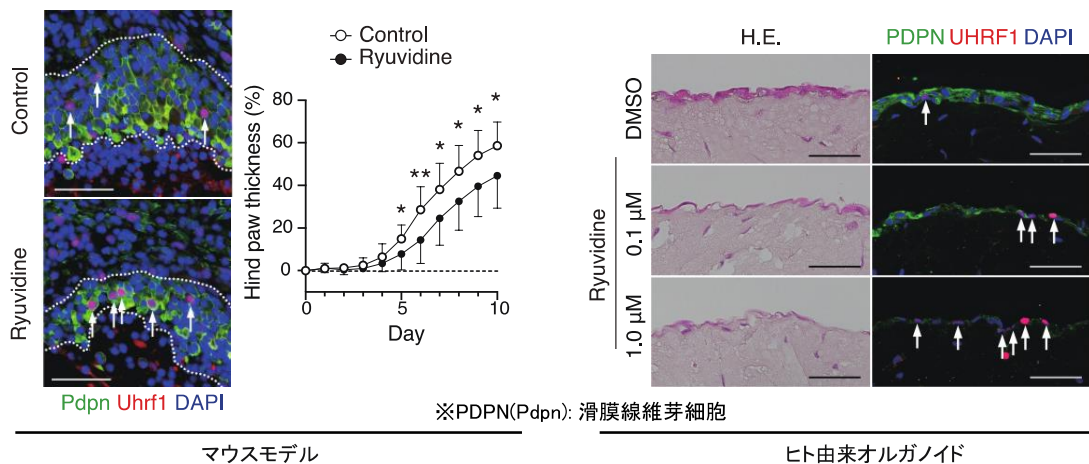


図4 UHRF1発現維持化合物としてRyuvidineを同定した。Ryuvidineを投与するとマウスモデルとヒト由来オルガノイドの両方の滑膜線維芽細胞でUHRF1発現陽性率が上昇し(矢印)、足の腫れ(左グラフ)や滑膜肥厚が抑制される(右図)。

以上の結果から、UHRF1 発現の維持は、様々な関節リウマチ病態を網羅的に抑制する新規治療戦略になる可能性が示唆されます。

4. 波及効果

我々の研究結果から、UHRF1 の発現を維持することで関節リウマチ病態を改善することが期待されます。また、UHRF1 発現維持による効果は、異常な発現状態を呈する様々な遺伝子の網羅的な抑制(正常な状態に近づける)であると考えられるため、副作用、特に免疫抑制が少ない可能性があります。さらに、既存薬に対して治療抵抗性の関節リウマチ患者に有効な効果を与える可能性や、そのような患者を判別する診断マーカーになる可能性も包含していると考えています。一方で、我々の同定した Ryuvidine はあくまでも UHRF1 タンパク分解を仲介する SET8 の阻害剤であり(実際に UHRF1 以外のタンパクのメチル化修飾にも働く)、副作用出現の可能性が考えられます。今後、UHRF1 のタンパク分解に直接的に働く特異的な分子を同定し、その阻害剤を見つけ、UHRF1 をターゲットとした関節リウマチの創薬基盤を確立したいと考えています。

5. 発表者(投稿時の所属を記載)

- 佐伯 法学 (愛媛大学, 学術支援センター動物実験部門)
井上 和樹 (Nankai university, Nankai International Advanced Research Institute)
大塚 まき (星薬科大学, 機器分析学研究室)
渡森 一光 (愛媛大学大学院, 医学系研究科, 関節機能再建学講座)
水木 伸一 (松山赤十字病院, リウマチ膠原病センター)
竹中 克斗 (愛媛大学大学院, 医学系研究科, 血液・免疫・感染症内科学)
五十嵐 勝秀 (星薬科大学, 生命機能創成科学研究室)
三浦 裕正 (愛媛大学大学院, 医学系研究科, 整形外科)

竹田 秀 (虎ノ門病院, 内分泌代謝科)

今井 祐記 (愛媛大学, プロテオサイエンスセンター, 病態生理解析部門)

6. 発表雑誌

雑誌名: The Journal of Clinical Investigation

論文タイトル: Epigenetic regulator UHRF1 suppressively orchestrates pro-inflammatory gene expression in rheumatoid arthritis.

著者: Noritaka Saeki, Kazuki Inoue, Maky Ideta-Otsuka, Kunihiko Watamori, Shinichi Mizuki, Katsuto Takenaka, Katsuhide Igarashi, Hiromasa Miura, Shu Takeda, Yuuki Imai

7. 問い合わせ先

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 病態生理解析部門

教授 今井祐記 (いまい ゆうき)

TEL: 089-960-5925

E-mail: y-imai@m.ehime-u.ac.jp

8. 用語解説

注 1: 滑膜

関節は関節包と呼ばれる袋で覆われ関節腔を形成している。この関節包を内張している膜が滑膜である。滑膜の表層は滑膜細胞(滑膜線維芽細胞と滑膜マクロファージ)によって構成されている。

注 2: 生物学的製剤

生体が作り出したタンパク質(抗体)を使用した薬剤。関節リウマチに使用される代表的な生物学的製剤として、インフリキシマブ、トシリズマブ、アバタセプトなどがある。

注 3: 分子標的薬

病態の原因となる分子を標的とする薬剤。関節リウマチに使用される代表的な分子標的薬として、トファシチニブがある。

注 4: エピジェネティクス

DNA の塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節の仕組み。

注 5: DNA メチル化

エピジェネティクスによる遺伝子発現制御の一つ。DNA を構成するシトシンにメチル基を付加する反応。一般的に、転写開始点付近の DNA がメチル化修飾されると遺伝子発現は抑制され、逆に

メチル化がなくなる (DNA 低メチル化) と遺伝子発現が促進される。

注 6: DNA マイクロアレイ

基盤上に固定化したオリゴヌクレオチド DNA とサンプル中の核酸で相補的な複合体を形成させ、個々の塩基配列をもつ核酸がサンプル中にどの程度含まれていたか網羅的に解析する手法。

注 7: アポトーシス

組織が正常な状態を保つためにあらかじめプログラムされている細胞死。アポトーシスが正常に行われない (アポトーシス抵抗性) ことは病気の原因の一つになり得る。

注 8: RNA シーケンス

次世代シーケンサーと呼ばれる高速で塩基配列を解読する機械を用いて、サンプル中に含まれる mRNA の網羅的な発現パターンを解析する手法。

注 9: MBD2 シーケンス

MBD2 ビーズを用いて、サンプル中に含まれるメチル化された DNA 断片を特異的に回収し、それを次世代シーケンサーで解読することで、ゲノム DNA におけるメチル化領域を網羅的に解析する手法。

注 10: 疾患活動性

病気の勢いの程度のこと。疾患活動性が高ければ病態は悪化しており、非常に低ければ寛解した (症状がほとんどない状態) と考えることができる。

注 11: DAS28 (Disease activity score 28)

関節リウマチの様々な症状や評価を算出して得られる総合的な疾患活動性の指標。

注 12: オルガノイド培養

試験管内で、3次元的に臓器様の組織を構築する培養方法。