

関節リウマチの骨破壊誘導性細胞の同定と治療法の開発

東京大学大学院 医学系研究科 免疫学

小松 紀子

研究成果の概要：

近年の解析技術の進歩により、線維芽細胞は体を構成する足場としてはたらくだけでなく、組織破壊型や炎症型などの悪玉タイプの線維芽細胞が存在し、関節リウマチをはじめとする多くの疾患をひきおこすことが明らかになりつつある。私たちは以前、関節リウマチにおいて滑膜線維芽細胞は炎症を誘導するだけでなく、破骨細胞誘導因子RANKLを産生するおもな破骨細胞誘導細胞として骨破壊を誘導することを報告してきた。しかしながら骨破壊を誘導する、組織破壊型の滑膜線維芽細胞をつくる分子機構は不明であった。本研究において滑膜線維芽細胞においてRANKLのみならず軟骨を破壊するMMPなどの組織破壊に関わる遺伝子群の発現を誘導する主要な遺伝子としてETS1を同定した。滑膜線維芽細胞特異的にETS1を欠損させたマウスを新たに作製し、関節炎を誘導すると炎症には影響がないものの骨と軟骨の破壊が共に抑制されたことから、ETS1が骨・軟骨を破壊する組織破壊型の滑膜線維芽細胞の機能や運命決定を司る遺伝子であることが明らかとなった。さらにETS1は関節リウマチだけでなく腸炎やがんの病態形成に関わる組織破壊型の線維芽細胞のサブセットにも高く発現しており、組織破壊型の線維芽細胞の形成を通じてさまざまな疾患に関わる可能性が示唆された。これらの研究成果は組織破壊型の線維芽細胞を標的とした治療法の開発に大きく貢献するものと期待される。

【研究の背景】

線維芽細胞は、最も豊富に存在し体の構造を支持する細胞のひとつであり、組織の恒常性を保つ細胞である。近年の解析技術の進展により、病気の組織には炎症型や組織破壊型などのさまざまな機能を有する線維芽細胞が存在し、関節リウマチや腸炎、がんなどをはじめとする病態の形成を担うことが明らかになりつつある。

関節リウマチは関節の炎症に伴って骨や軟骨の破壊が誘導される最も頻度の高い自己免疫疾患の一つである。関節リウマチでは関節腔を包む滑膜に、免疫細胞や、滑膜特異的に存在する線維芽細胞である滑膜線維芽細胞が集積し増殖や活性化することで炎症の場を形成する。その病態形成機構は未だ不明な点が多く、根本的な治療法は開発されていない。IL-6やTNFを標的とした生物学的製剤は効果的であるものの全身性の免疫抑制による副作用や効果不十分などの症例が存在し、これらの問題を克服する治療法の開発が喫緊である。関節リウマチの骨破壊は破骨細胞によって引き起こされるため、破骨細胞誘導因子 RANKL を発現する細胞は骨破壊を誘導する悪玉細胞である。関節リウマチでは関節破壊のみならず傍関節性や全身性に骨粗鬆症も認められるが、われわれは関節破壊では滑膜線維芽細胞に、傍関節性骨粗鬆症では形質細胞が破骨細胞誘導細胞であることを証明し、長年の関節リウマチ研究の命題に決着をつけることに成功した (Komatsu et al *J Clin Invest* 2021)。

近年滑膜線維芽細胞には炎症を誘導する炎症誘導型と骨破壊を誘導する組織破壊型が存在することが

明らかにされ注目を集めているが、どのような分子メカニズムで各サブセットが形成されるかは不明な点が多い。またRANKLのはたらきを抑制する抗RANKL抗体は関節リウマチの骨破壊を抑制する薬剤として本邦で適用されているが、軟骨破壊を抑制することはできないという問題点が存在する。健康人においても常に骨破壊と骨形成がおきて骨の新陳代謝がなされることを鑑みて、関節リウマチの病的な骨破壊と軟骨破壊を同時に抑制する画期的な薬剤の開発が求められていた。

【研究の目的】

関節リウマチの悪玉細胞特異的に発現する治療標的分子を同定することは、関節リウマチの骨破壊の病態理解のみならず画期的な骨破壊制御法の確立に繋がる。本研究では申請者独自の知見に基づき、関節破壊における滑膜線維芽細胞に着目し、①骨破壊を誘導する RANKL 発現の悪玉細胞サブセットを同定すること、②悪玉細胞の病原性を司る分子基盤を解明し、有効性の評価を通して診断マーカーや治療標的を同定することを目的とする。これらの研究を通して、関節リウマチの骨破壊の病態解明と新しい視点に基づく骨破壊制御法の開発を目指す。

【研究の方法】

1. RANKL発現誘導機構の解明と新規発現誘導因子の同定

ATACseq と ChIPseq データベースを駆使し、滑膜線維芽細胞の RANKL 発現に重要なエンハンサー領域を同定し、motif enrichment analysis、Lucアッセイなどを通してRANKL 発現誘導に関わる転写因子を同定する。CRISPR/Cas9によりエンハンサー領域欠損マウスや滑膜線維芽細胞(Col6a1-Cre) 特異的遺伝子欠損マウスを作製する。

2. 骨破壊を誘導する滑膜線維芽細胞サブセットの同定とその分子基盤の解明

並行して CIA マウスおよび 関節リウマチ滑膜サンプルのシングルセル解析を行い RANKL+細胞のクラスターの同定を絞り込む。発現プロファイルをもとに関節炎マウスの炎症滑膜から単離し骨破壊を誘導する滑膜線維芽細胞サブセットを同定する。

3. 治療標的・診断マーカーとしての生体レベルでの有効性の評価

2, 3 で作製した遺伝子欠損マウスに 関節炎 を誘導して炎症及び関節破壊を評価する。

【研究の結果】

まず滑膜線維芽細胞がRANKLを発現するしくみに着目し、関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞のエピゲノム解析によりRANKL発現に関わる可能性のある遺伝子発現制御領域を複数同定した。これらの遺伝子領域を欠損させたマウスを複数作製し、特定の遺伝子領域 (E3) を欠損させたマウスから単離した滑膜線維芽細胞ではRANKLの発現が抑制されること、E3欠損マウスに関節炎を誘導すると骨破壊が抑制されることを見出した。さらにE3に結合する転写因子としてETS1を同定し、遺伝子発現解析によりETS1がE3に結合してRANKLだけでなく軟骨破壊をひきおこす細胞外基質分解酵素MMPの発現も誘導することを明らかにした。滑膜線維芽細胞が発現するETS1の関節リウマチにおける役割を明らかにするため、滑膜線維芽細胞特異的にETS1を欠損させたマウスを新たに作製し関節炎を誘導すると、炎症には影響がない一方で、骨と軟骨の破壊が共に抑制された。以上の結果から、関節リウマチにおいてはETS1が骨や軟骨を破壊する滑膜線維芽細胞を形成する鍵となる遺伝子であることが示された。

組織破壊型の線維芽細胞は関節リウマチだけでなく、腸炎やがんなどさまざまな病態においても存在し、病態形成に重要であることが知られている。シングルセル解析の結果、興味深いことに、ETS1は腸

炎やがんにおいて組織破壊やリモデリングに関わる線維芽細胞のサブセットに高く発現する一方で炎症を誘導するサブセットには認められなかった。線維芽細胞特異的にETS1を欠損させたマウスに腸炎を誘導すると、炎症には影響がないものの、粘膜下層や筋層の組織修復に異常が認められたことから、ETS1を発現する線維芽細胞は組織の再構築や修復に寄与することが示唆された。またエピゲノム解析により、ETS1の発現は炎症性サイトカインであるTNFや低酸素環境下で誘導される因子によって誘導されることが示唆された。このことからETS1の発現は病態において局所的に制御されており、組織破壊性の線維芽細胞の形成を介して、様々な疾患の病態を引き起こすことが考えられた。

【研究成果の意義】

本研究により関節リウマチにおいて骨・軟骨の破壊を誘導する滑膜線維芽細胞の病原性や運命を司る重要な転写因子としてETS1を同定し、組織破壊型の線維芽細胞がつくられる分子メカニズムを初めて明らかにすることに成功した。滑膜線維芽細胞のETS1の発現や活性を抑制することで滑膜線維芽細胞を標的とした関節リウマチの骨と軟骨破壊を同時に抑制する新しい治療法の開発に繋がるものと期待される。さらにETS1は関節リウマチだけでなく腸炎やがんなどさまざま病態における組織破壊性の線維芽細胞に高く発現しており、組織破壊型の線維芽細胞サブセットの病原性の発揮や運命決定がETS1を基軸とした遺伝子発現制御によって担われることが示唆された。本研究は組織破壊型の線維芽細胞に基づく病態の理解と新しい治療法の開発に大きく貢献するものと期待される。

論文：

1. Yan M, Komatsu N, Muro R, Huynh NC, Tomofuji Y, Okada Y, Suzuki HI, Takaba H, Kitazawa R, Kitazawa S, Pluemsakunthai W, Mitsui Y, Satoh T, Okamura T, Nitta T, Im SH, Kim CJ, Kollias G, Tanaka S, Okamoto K, Tsukasaki M, Takayanagi H. ETS1 governs pathological tissue-remodeling programs in disease-associated fibroblasts. *Nat Immunol.* 2022 Sep;23(9):1330-1341. doi: 10.1038/s41590-022-01285-0.
2. Komatsu N, Takayanagi H. Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis - immune cell-fibroblast-bone interactions. *Nat Rev Rheumatol.* 2022 Jul;18(7):415-429. doi: 10.1038/s41584-022-00793-5.