

TRANSLATIONAL SCIENCE

Parsing multiomics landscape of activated synovial fibroblasts highlights drug targets linked to genetic risk of rheumatoid arthritis

Haruka Tsuchiya ,¹ Mineto Ota ,^{1,2} Shuji Sumitomo,¹ Kazuyoshi Ishigaki,³
Akari Suzuki,⁴ Toyonori Sakata,⁵ Yumi Tsuchida,¹ Hiroshi Inui,⁶ Jun Hirose,⁶
Yuta Kochi,^{4,7} Yuho Kadono,⁸ Katsuhiko Shirahige,⁵ Sakae Tanaka ,⁶
Kazuhiko Yamamoto ,⁴ Keishi Fujio ¹

[Ann Rheum Dis. 2021; 80: 440–450.]

滑膜組織の研究の流れ

Location, location, location: how the tissue microenvironment affects inflammation in RA

Christopher D. Buckley^{1,2}, Caroline Ospelt³, Steffen Gay³ and Kim S. Midwood¹

[Nat Rev Rheumatol. 2021;17(4):195-212.]

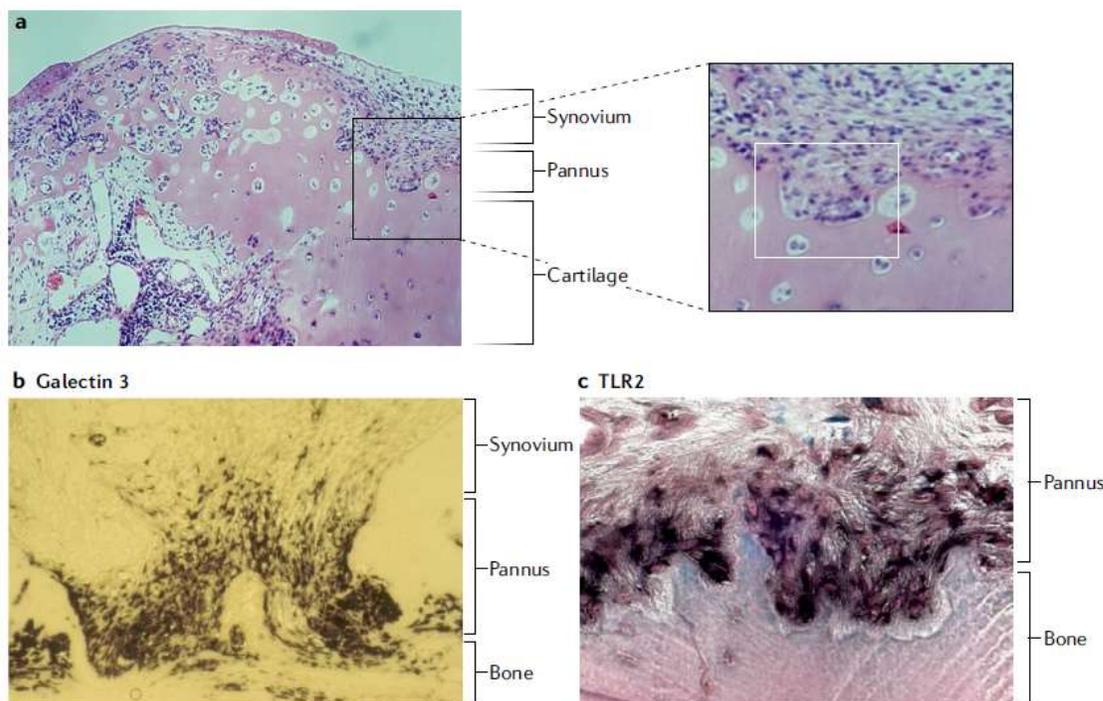
- RAは必ずしも現在の治療で全員に奏功するわけではない。炎症のある関節で何が起きているかの解明が不十分であることが治療開発の障害となっている。
- 組織微小環境(細胞・細胞外)が病態生理に重要で、全ての組織はECM (extracellular matrix) に支持されており、複雑なnetworkが組織の状態を決定する。
- RAの炎症の主座である滑膜の構造的な理解からsingle cellレベルの理解が進み、RAの関節でSynovial ECMの制御がvitalだと分かってきた (D2T RAでも)。

ECM構成要因：1000以上の分子

- 細胞成分：Core molecules= collagen, proteoglycan, glycoprotein). Matrix関連protein= mucin, lectin, 酵素= MMP等. 可溶性因子= GF等, Wnts, Cytokine.

滑膜組織の構造

- 滑膜組織の構成要素：Macrophage, **Synovial fibroblast (SF)**, 神経細胞, 内皮細胞。
- 組織は**2領域**：**Lining** layerと**Sub-lining** layer. Lining: 正常は1-3細胞層で、Fibroblastと有孔基底膜とMΦで構成され関節腔と滑膜の細胞と分子の出入を統合。Sub-lining: Fibroblast, MΦ, looser collagenous ECMからなり滑膜組織の血管形成と栄養・リンパ球の出入りに寄与する。
- RAでは**lining layerは10-20細胞層に増大**し、免疫細胞浸潤がresident MΦに加わり、滑膜細胞が増殖する。量的だけでなく質的变化もある(Ly, SF分画)



RAにおける滑膜の組織学的変化

- RAでは滑膜中に2次リンパ組織に類した構造を作る (T細胞領域とB細胞領域)。ここにCXCL13, CCL9, CCL21発現亢進し新たなリンパ球流入を促し自己抗体産生する。
- 早期RAの組織所見は3タイプにわけられる：pauci-immune fibroid, diffuse myeloid (Monocyte/MΦ中心), Lympho-myeloid (T/Bはじめ免疫細胞浸潤多い)。
- Pannus**は構造的に良く定義された、軟骨浸潤する炎症滑膜であり、組織破壊酵素を産生するMΦ/SFで構成された組織である、軟骨ECMに接触し破壊的に浸潤する。
- PannusではMMPs, TLRs, SUMO1, p53発現亢進し、腫瘍抑制するPTEN発現が低下。
- Pannusではtissue microenvironmentも変化している。**Galectin 3**はPannusに選択的に発現し、SFを直接的に活性化し向炎症性サイトカイン(IL-6)と向炎症性ケモカイン(IL8/CCL2/CCL3/CCL5)を発現させる。
- TLR2もIL-6産生のために必要で、Galectin 3とTLR2はPannusの存在は、活性化SF局在を示唆する。

滑膜組織のsingle-cell analysis

- 滑膜生検からsingle-cell RNA seqが可能となった. 少なくとも18細胞種 (T/B/MΦ/SF; Fan Zhang NI) . Landscape= Croft Nature 2019/Fan Zhang
- Tph (T peripheral helper cell):** (Rao, Nature, 2017). PD1高発現, CXCR5陰性TがRA滑膜内に存在, exhaustedでないがTfhと同様にB細胞を誘引するサイトカイン・ケモカイン産生 (CXCL13, IL-21) しPlasma cell分化とIgG産生を促進する. Tfhと異なり炎症巣への遊走能がある. Seropositive RAで高度に増殖するがSeronegativeではそうではない. RAにおける節外性リンパ組織形成も説明可能.
- SF (Synovial fibroblast) の分画:** 炎症性SF分画は膜性糖タンパクのTHY1陽性でsub-liningにありRA>>OAで多くNOTCH3を介して増える (Croft, 2019 Nature). THY1-negative SFはlining layer に多く, 軟骨・骨の破壊に関連する.
- MΦ分画:** (Culemann, Nature, 2019; 572: 670-75) Lining-layerのtissue-resident MΦが免疫学的バリア機能をもつがRAで障害されMonocyte-derived cellの関節への流入を制限できなくしている (OAでは炎症抑制する). Sub-liningのMΦはheteroな集団からなる.
- RAの9病態からMΦ4分画が同定され, 寛解RAで認める2分画 (MerTK⁺TREM2^{hi} MΦ, MerTK⁺LYVE1⁺ MΦ)が減るとRA再燃↑ (Alivernini, NatMed, 2020). これらの細胞がex vivoで滑膜修復の炎症改善脂質mediator産生する.
- RAではActiveでSub-lining NOTCH3依存性THY-1⁺ SFが増殖, Lining THY-1⁻ SFまたはMerTK⁺ MΦは減少する.
- RA滑膜中のMerTK⁺ MΦ / MerTK⁻ MΦ比が高ければ寛解率が上がる.
- 免疫抑制効果のない, “Pathogenic” SFを標的とした治療薬がattractiveな候補となる.
- SFのepigenomic変化も治療標的となりえる.

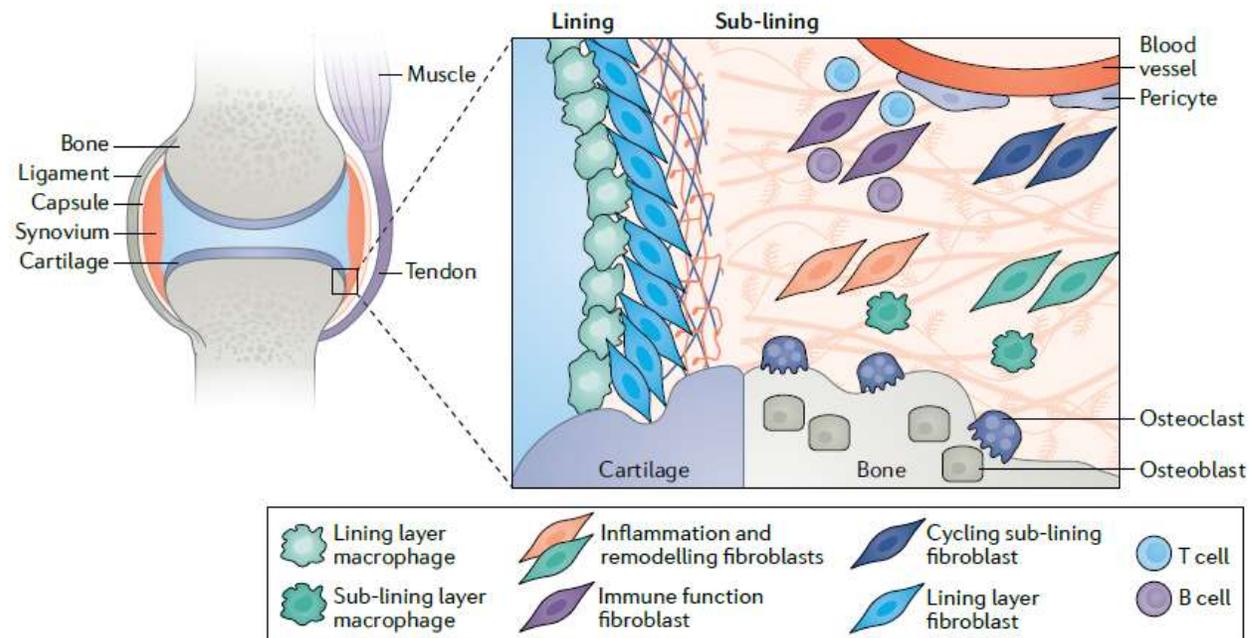


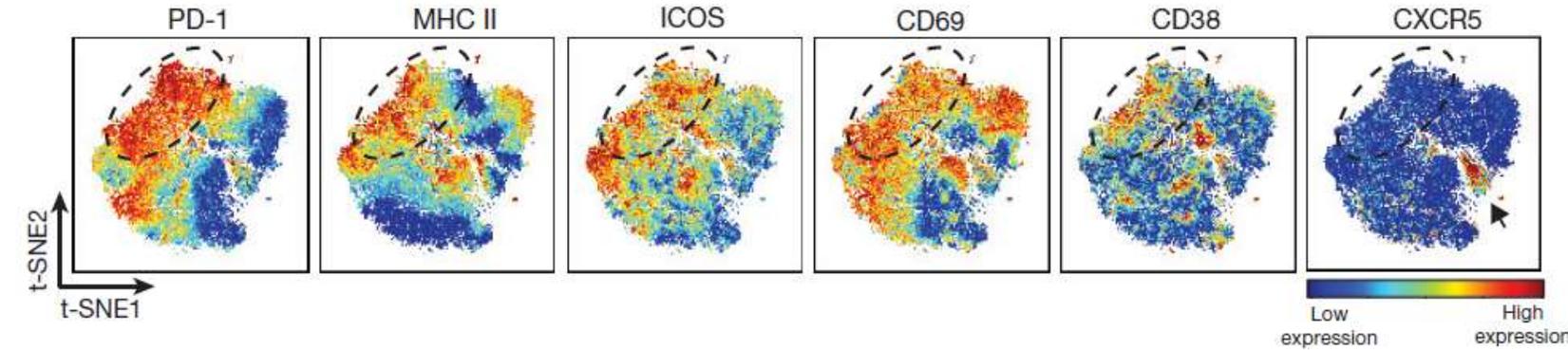
Table 1 | Conserved cell populations in rheumatoid arthritis joints

Cell subsets	Marker genes (human)	Marker genes (mouse)	Activation marker or effector genes
Fibroblasts			
Lining layer	Negative (CD90); positive (CD55 and PGR4)	Negative (Cd90); positive (Pgr4)	RANKL:OPG ratio, CCL9, CLIC5, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, HAS1, HTRA4 and DNASE1L3
Sub-lining layer (immunomodulatory)	Positive (CD90 and CD34)	Positive (Cd90 and Cd34)	IL6, IL33, IL34, IFI30, LIF, CXCL9, CXCL12, CXCL13, CCL2, CCL19 and CCL21
	Negative (CD34); positive (CD90 and DKK)	Negative (Cd34); positive (Cd90)	
Sub-lining layer (perivascular)	Negative (CD34); positive (CD90 and HLA-DRA)	Negative (Cd34); positive (Cd90)	
Macrophages			
Lining layer	Not reported	Negative (Cfsr1); positive (Cx3cr1)	TREM2, VSIG4, AXL, MFGE8, JAM1, ZO1, CLDN5, FAT4 and VANGL2
Interstitial	Negative (CD11C and CD38); positive (NURP1)	Negative (Cx3cr1); positive (Cfsr1, MHC class II genes and Aqp1)	MERTK, CTSK, HTRA1, GPNMB and ITGB5
	Positive (C1QA, CD11C and CD38)	Negative (Cx3cr1); positive (Cfsr1 and Relma)	MRC1, CD163 and MARCO
Monocyte-derived (infiltrating)	Positive (SPP1, CD11C, CCR2 and CD38) when activated by interferon	Negative (Ly6c2); positive (Ccr2 and Arg1)	ARG1, IFI6, IFI44L, LY6E and SPP1
	Positive (IL1B, CD11C, CCR2 and CD38)	Negative (Ly6c2); positive (Ccr2 and Il1b)	NR4A2, HBEGF, PLAUR, RGS2, IL1B, HTF3, CXCL2 and EREG

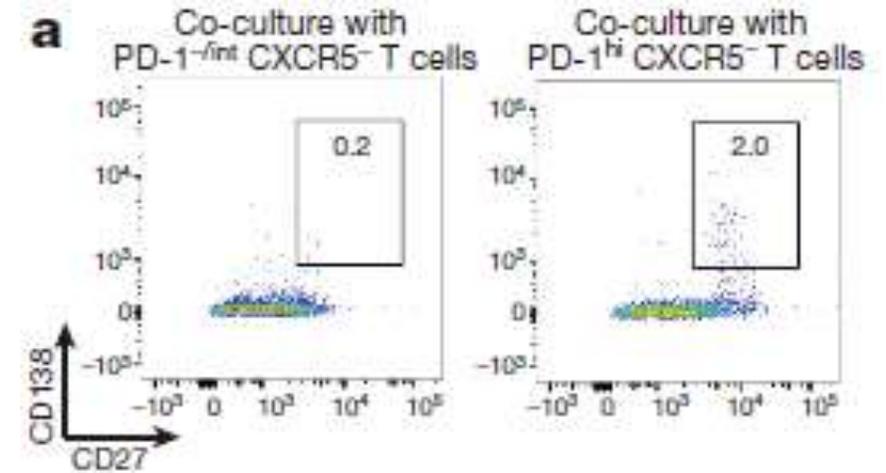
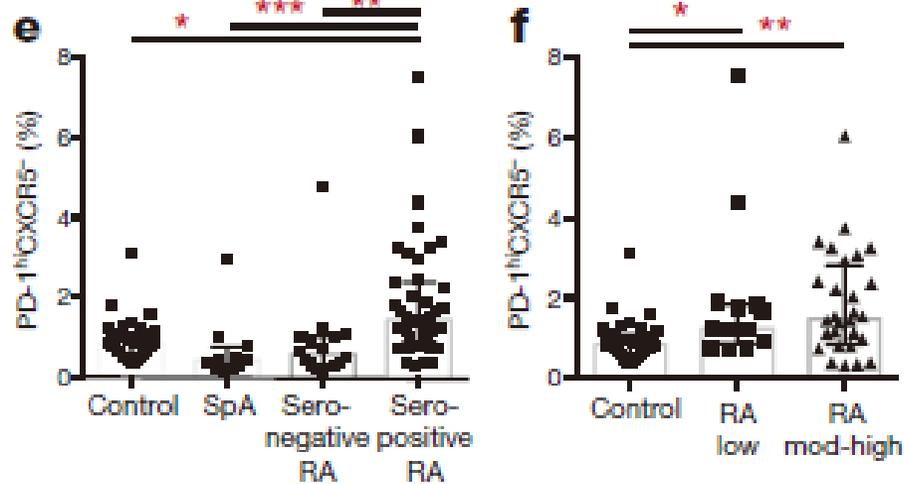
Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis

[Nature. 2017; 542(7639): 110-14.]

- AMPの滑膜組織から同定された、新規細胞集団 T_{PH} の報告.



- Peripheral helper T (T_{PH}) : $PD-1^{hi}CXCR5^{-}$

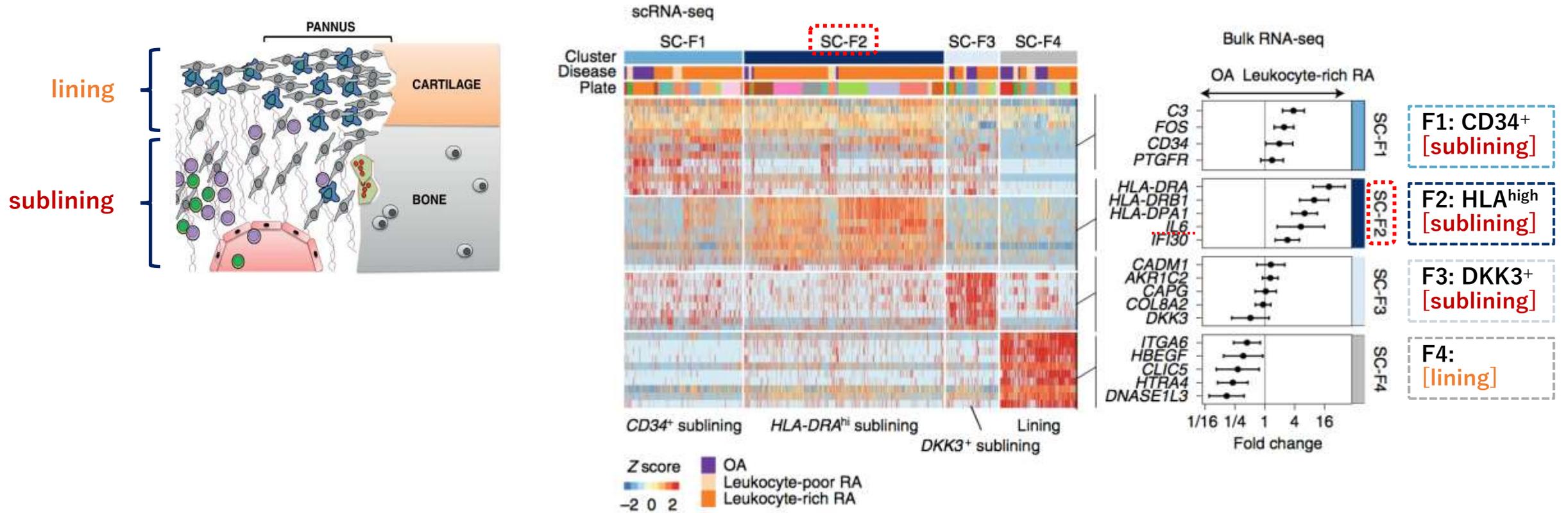


- Seropositive RAの末梢血でも認める

- T_{FH} よりB細胞成熟を促す能力が高い.

Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry [Nat Immunol. 2019; 20(7): 928-42.]

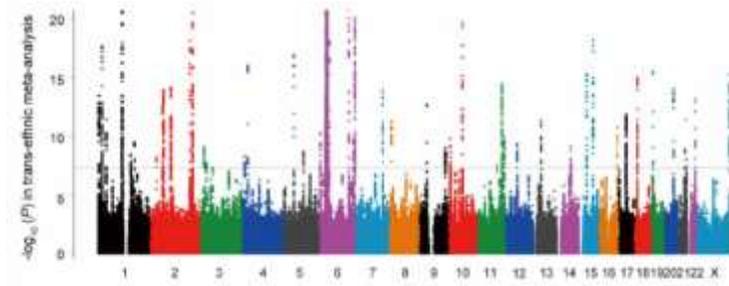
Fan Zhang^{1,2,3,4,5,27}, Kevin Wei^{5,27}, Kamil Slowikowski^{1,2,3,4,5,27}, Chamith Y. Fonseka^{1,2,3,4,5,27},



- SFは、transcriptome levelで 4つのsub groupに分かれる。
- SubliningにあるFraction 2 (*HLA-DRA*^{hi}) がRA (Leukocyte-rich RA) で多く、IL6発現が高い。

遺伝子解析とエピゲノム解析

関節リウマチのGWAS



[Nature. 2014;506(7488):376-81.]

GWAS解析

- 因果関係：頑健
- メカニズム：不明

DNA
(ゲノム・SNP)

エピゲノム

RNA
(トランスクリプトーム)

Protein

疾患 (RA)

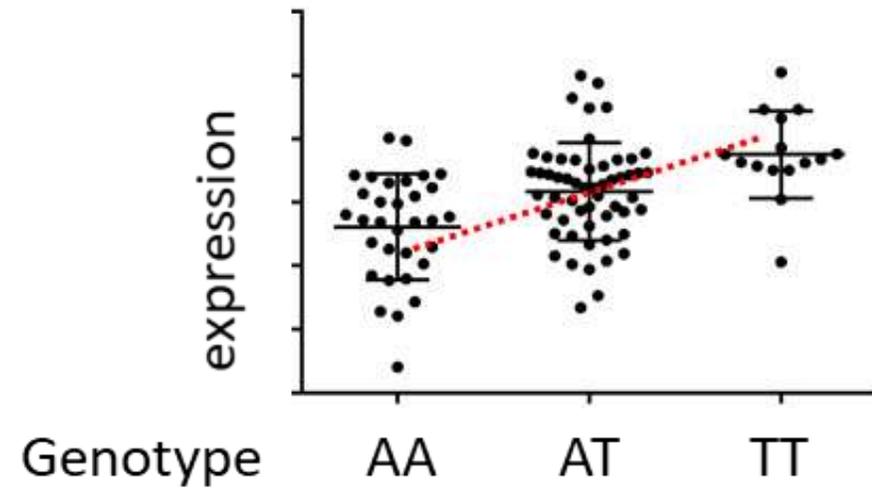
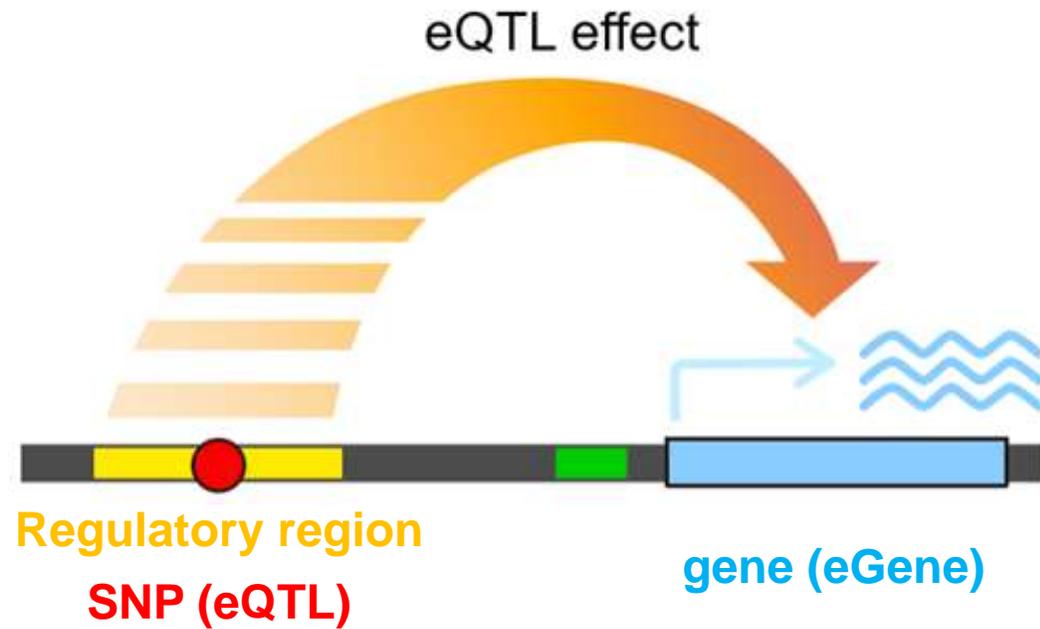
- RA発症の危険因子の約60% → 遺伝的要因

[Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18001.]

RA > 100の感受性多型

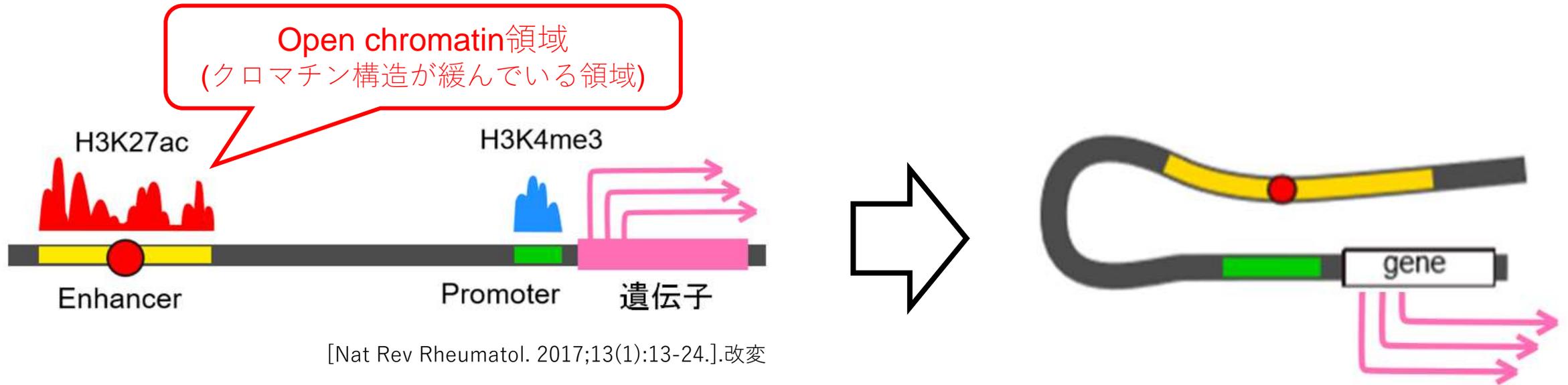
- GWASに基づく原因候補遺伝子の一部は既知の治療標的と一致
- 疾患責任細胞や細胞種特異的な治療標的探索 → 中間形質解析の統合が必要

cis-expression Quantitative Trait Loci (cis-eQTL)解析



- Genotype と mRNA 発現 の 関連解析 (線形回帰分析)
- ある遺伝子の発現に影響を及ぼすゲノム上の位置 (SNP) を解明
- 複数の刺激条件や細胞種の発現データと組み合わせる事で、どの条件で特に影響が強いか推測可能

エンハンサーとプロモーター



- エンハンサー (H3K27ac) はプロモーター (H3K4me3) に作用し遺伝子発現量を制御する
- 立体構造が変化することによってエンハンサーは作用する

論文の解説

mRNA発現量をみる

Promoter/Enhancer
の開閉をみる

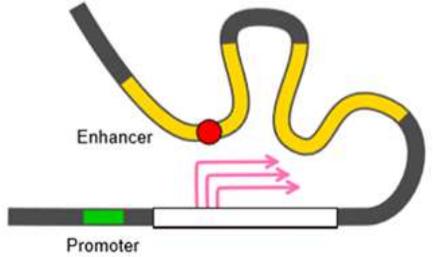
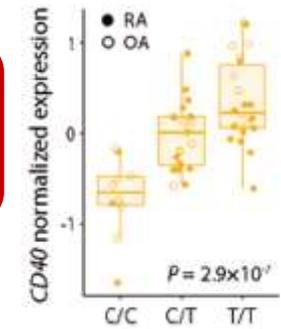
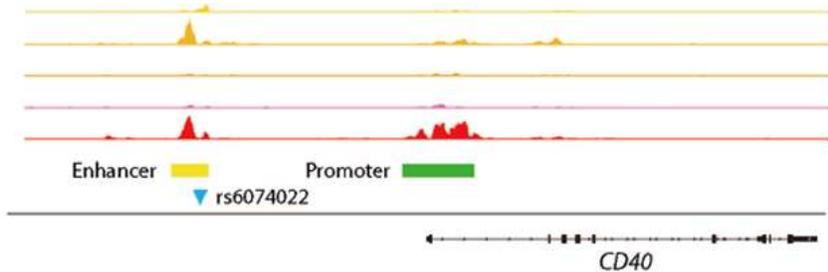
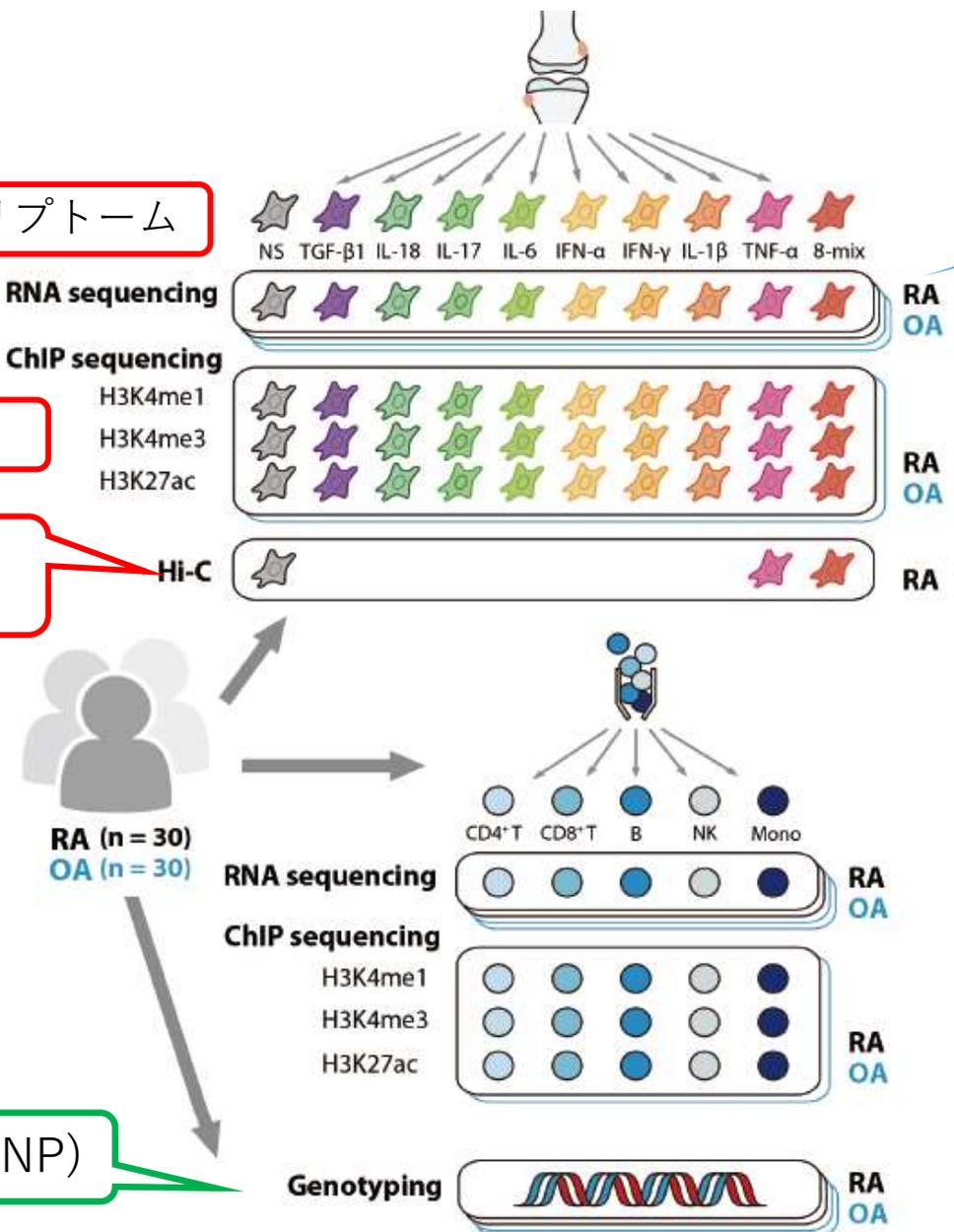
立体構造をみる

トランスクリプトーム

エピゲノム

エピゲノム
(3D構造)

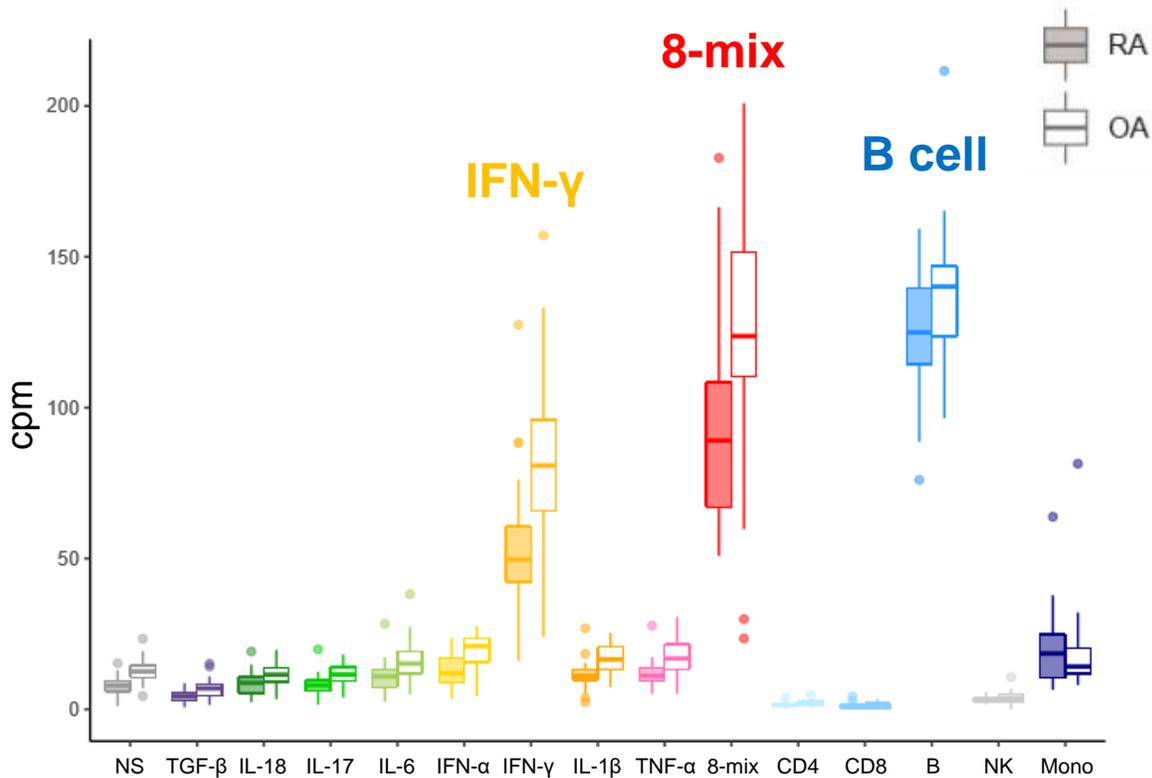
ゲノム (SNP)



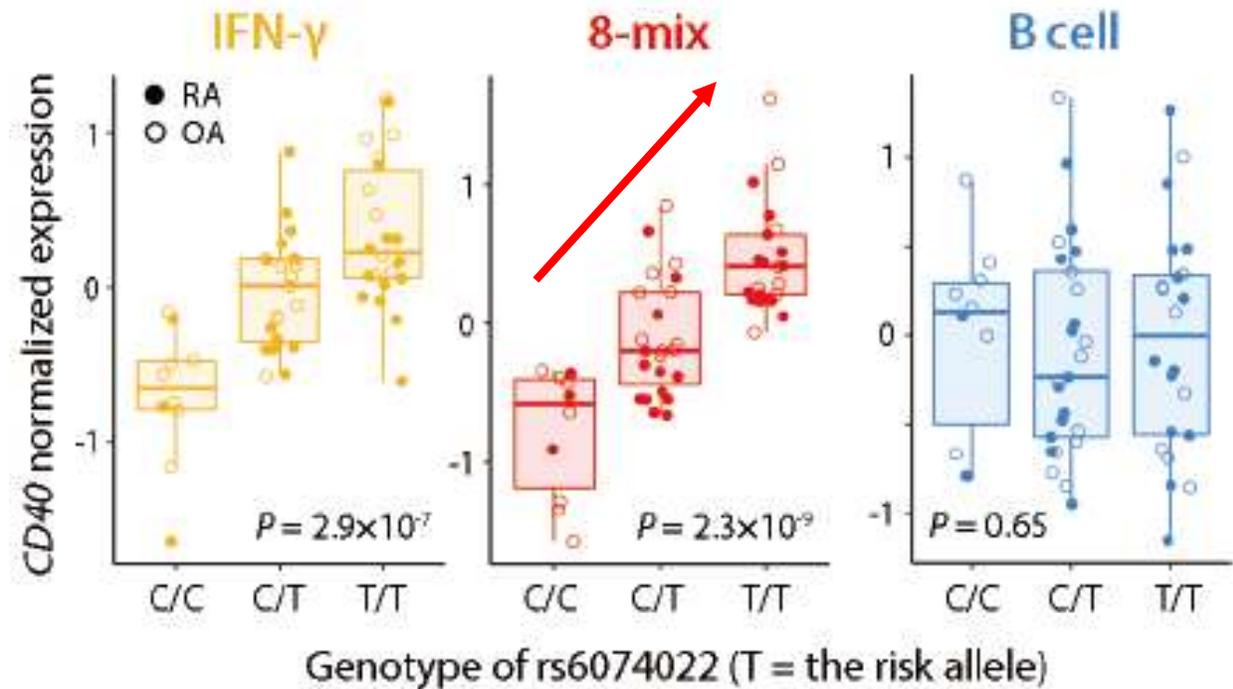
eQTL
解析

cis-eQTLの例： *CD40* と rs6074022 [RA GWAS SNP]

*CD40*発現量



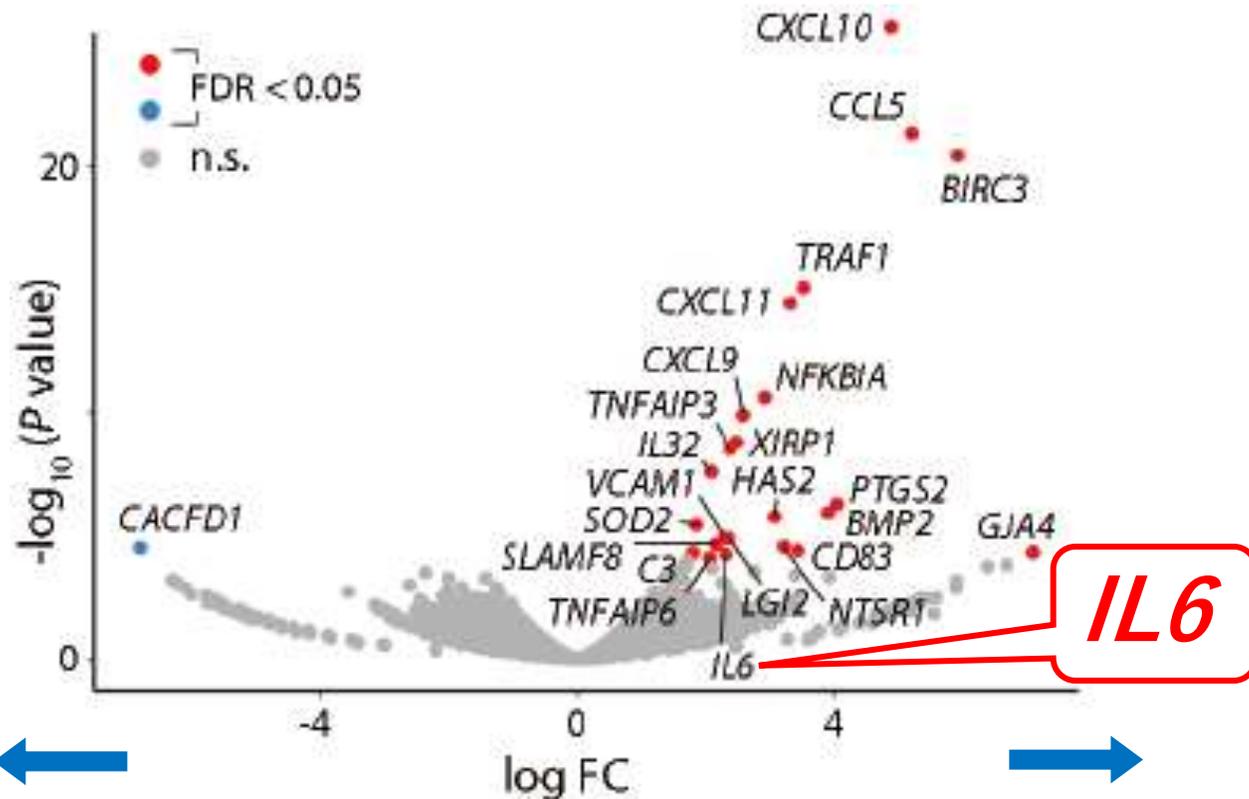
eQTL効果の向き



- 8-mix・IFN- γ 刺激下のSFsとB cellで*CD40*が高発現
- 8-mix・IFN- γ 刺激下のSFsでのみ、rs6074022がrisk alleleの場合*CD40*発現が亢進

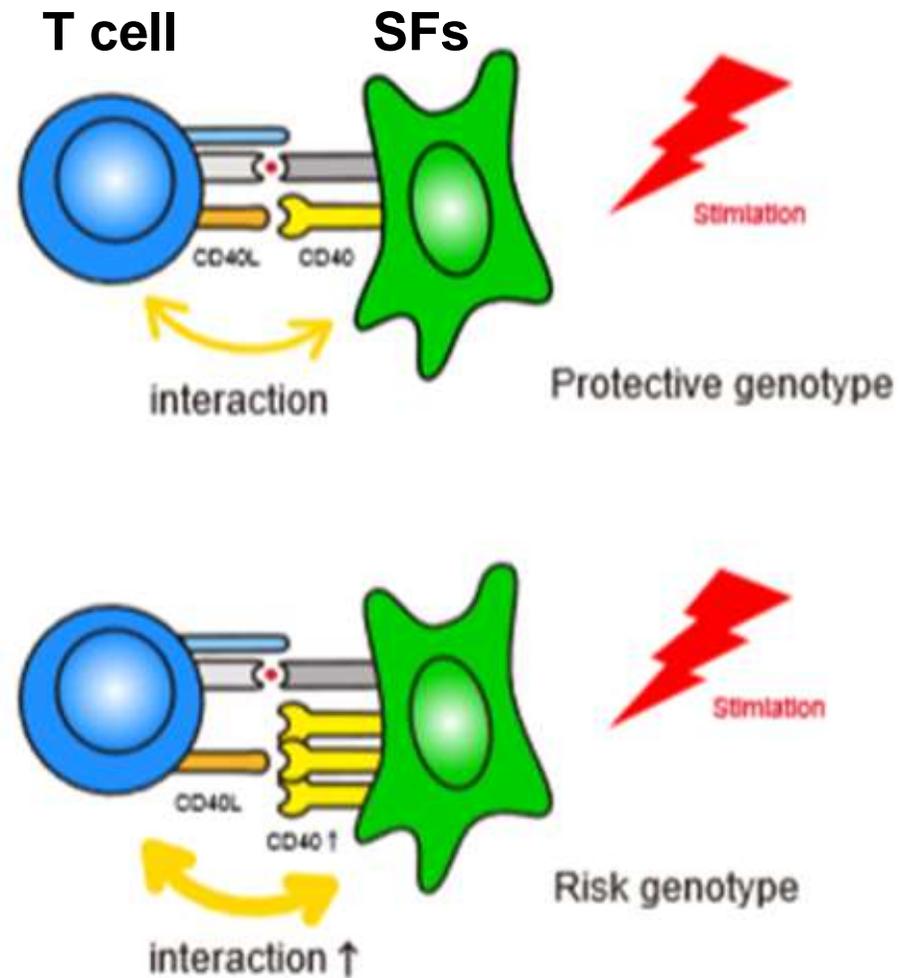
CD40-CD40L と IL-6発現

IL6発現量



CD40L添加で低発現

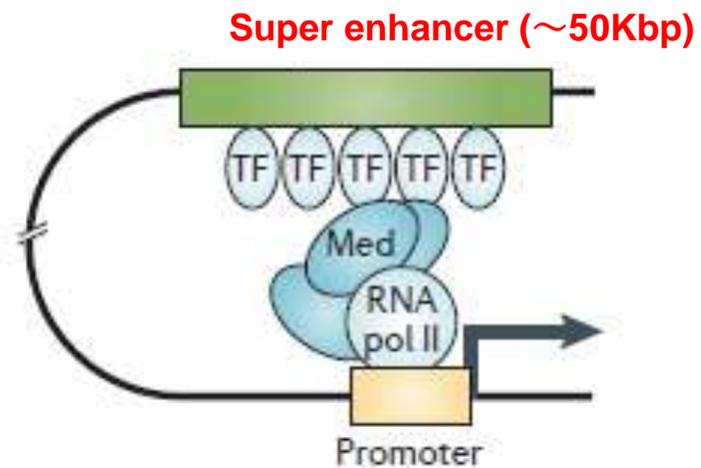
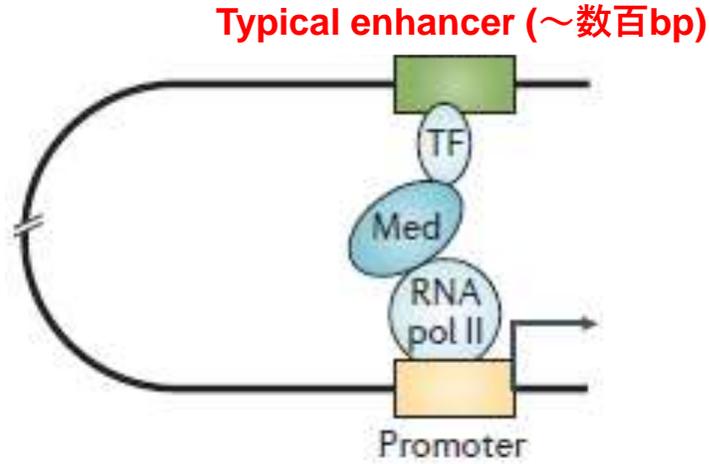
CD40L添加で高発現



- IFN- γ 刺激下のSFsにCD40Lを添加すると、SFsからのIL6発現が亢進
- SFsにおけるCD40の発現は遺伝的バックグラウンドにより制御され、RAの病態に関連する可能性

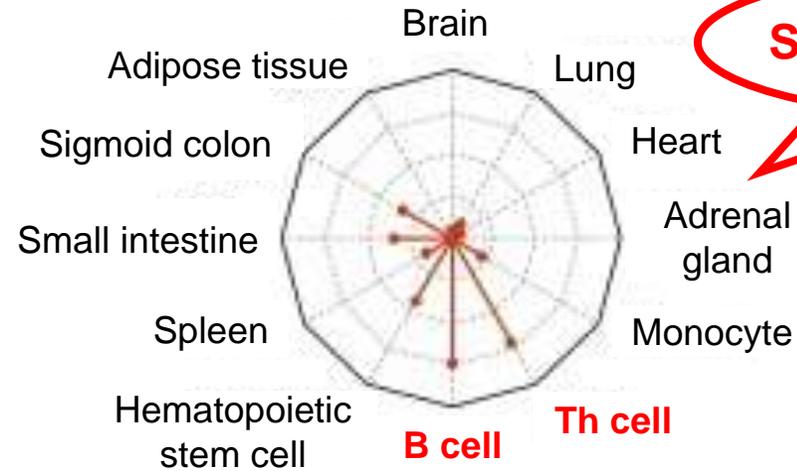
SFはRAの疾患感受性に寄与する責任細胞か？

Super-enhancer



[Nat Rev Cancer. 2016;16(8):483-93.]

Super-enhancerとRA感受性多型

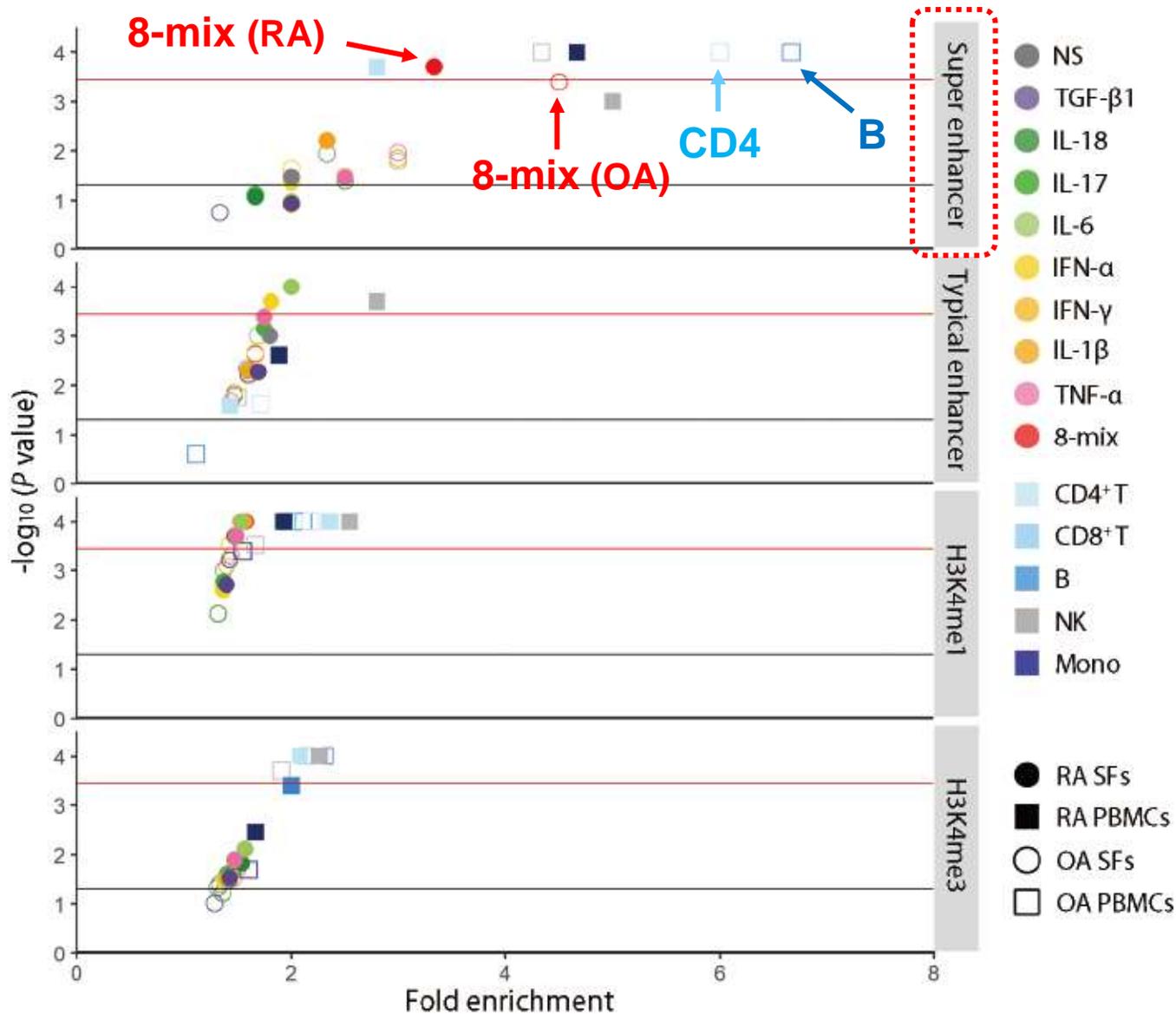


[Cell. 2013;155(4):934-47.]

Super enhancer; SE

- 細胞の性質を決定する重要な転写因子の多くが結合する，巨大なエンハンサー領域。
- 多因子疾患の疾患感受性多型は，疾患責任細胞のSEに濃縮される。

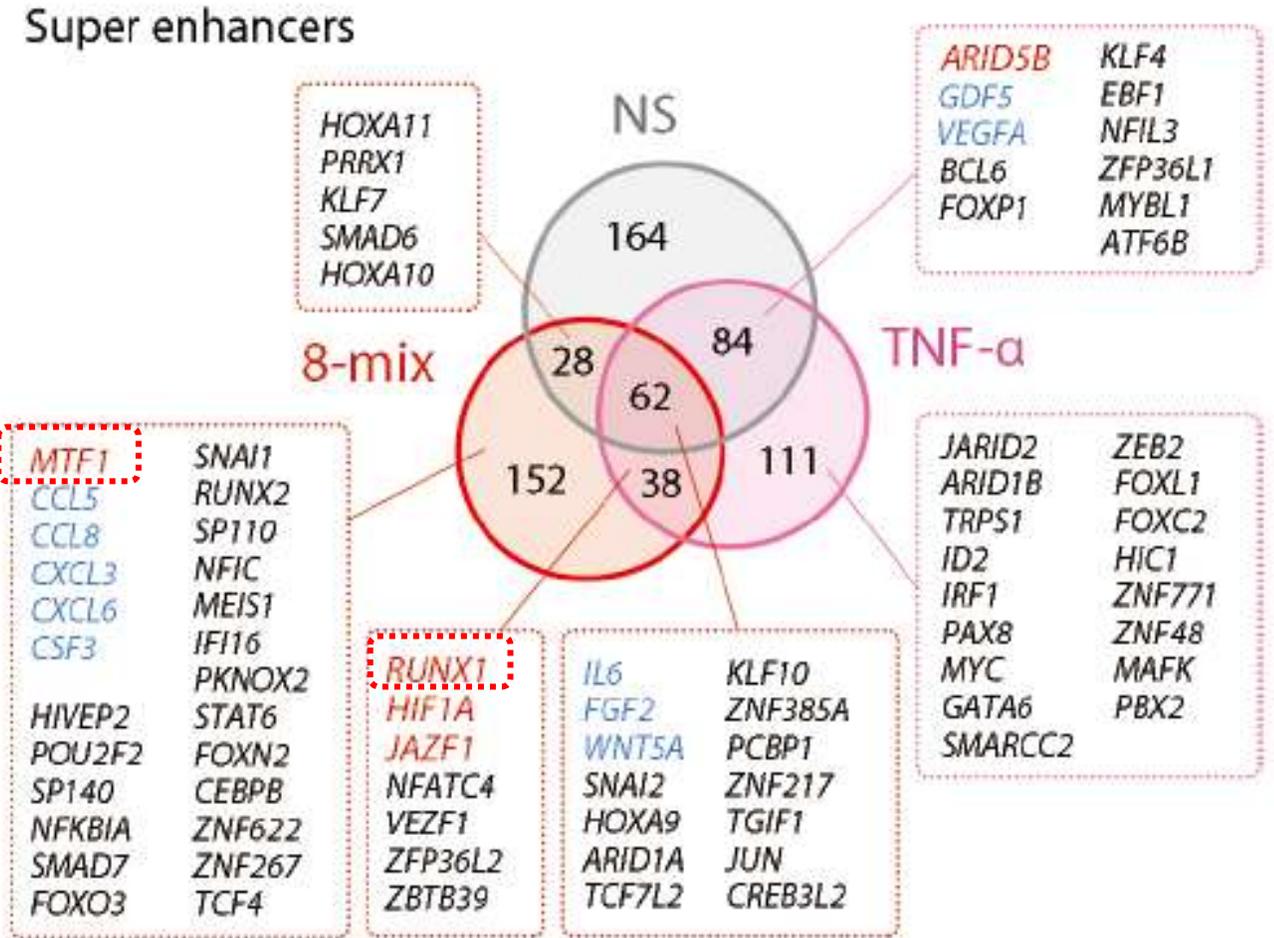
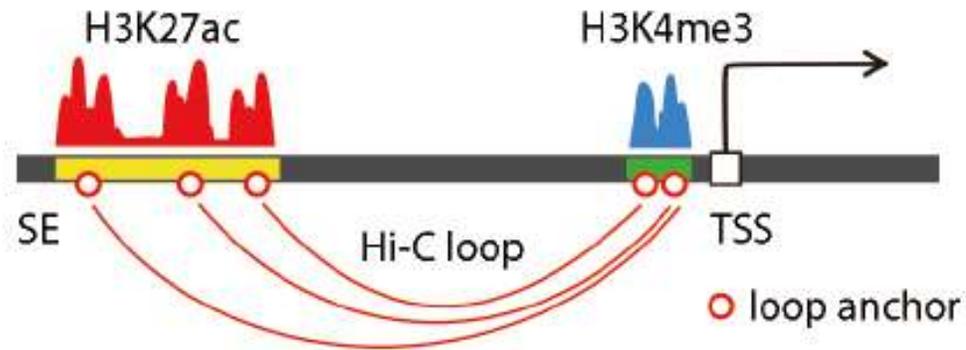
RA GWAS-エピゲノム濃縮解析



- 8-mix刺激下のSFsのSEは、既知のCD4 T cellやB cell同様に感受性多型と一致が多い
- 複合刺激下のSFsは、RAの疾患責任細胞の1つとしてふるまう

Super-enhancer関連遺伝子の解析

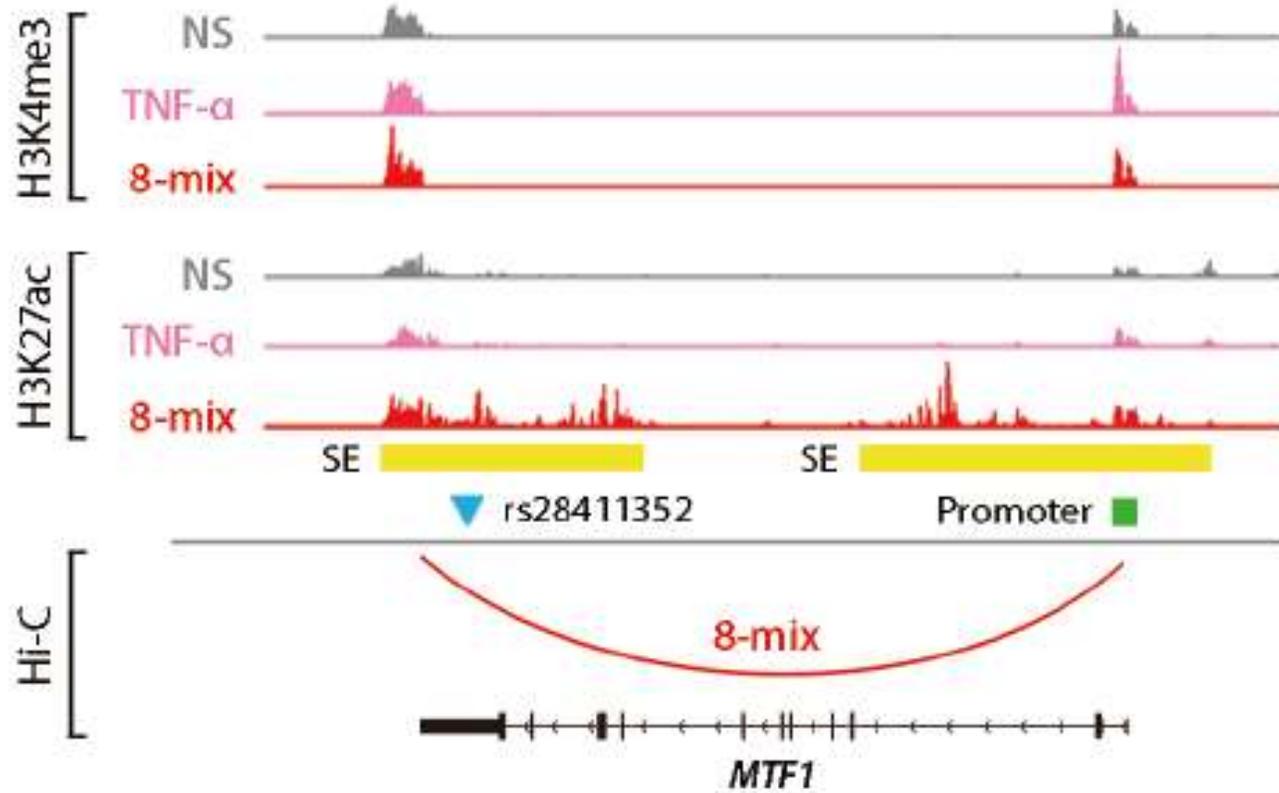
Super enhancer関連遺伝子:
Hi-CでSEとpromoterがループを形成する遺伝子



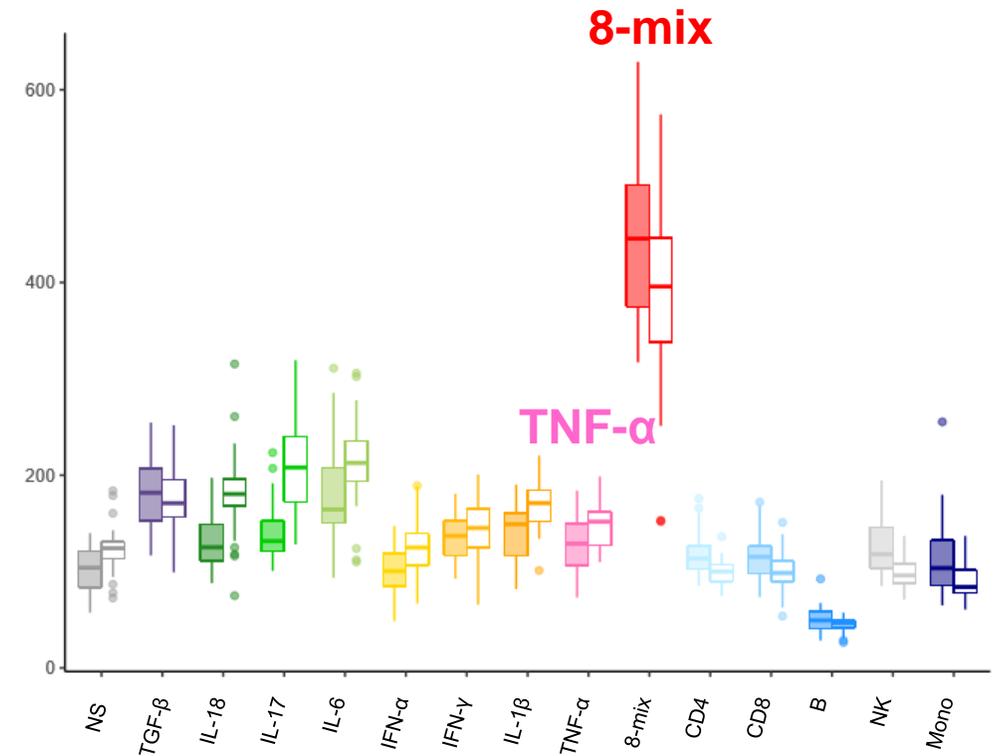
赤字: RA GWAS SNPと Super enhancerが重複する遺伝子

RAに関わる多くの**サイトカイン・ケモカイン・転写因子**を, **8-mix SE**が制御

MTF1発現を制御する8-mix Super enhancer

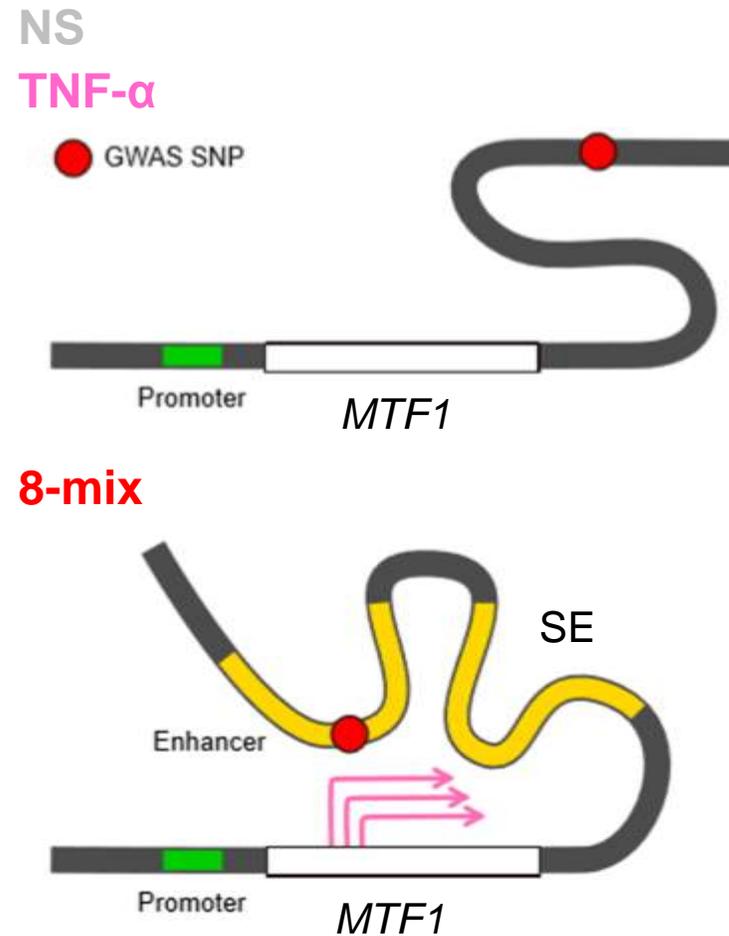


MTF1発現量



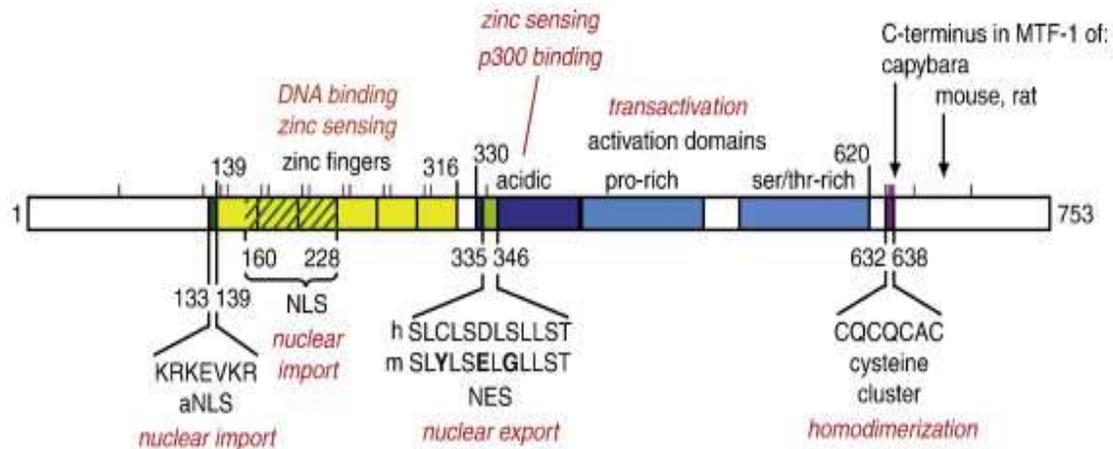
- *MTF1* promoterの上流には、**8-mix刺激下で形成されるSE**が存在
- 8-mix刺激下で、***MTF1* promoterはSE内のGWAS SNP領域と立体的にloopを形成**

*MTF1*発現を制御する8-mix Super enhancer

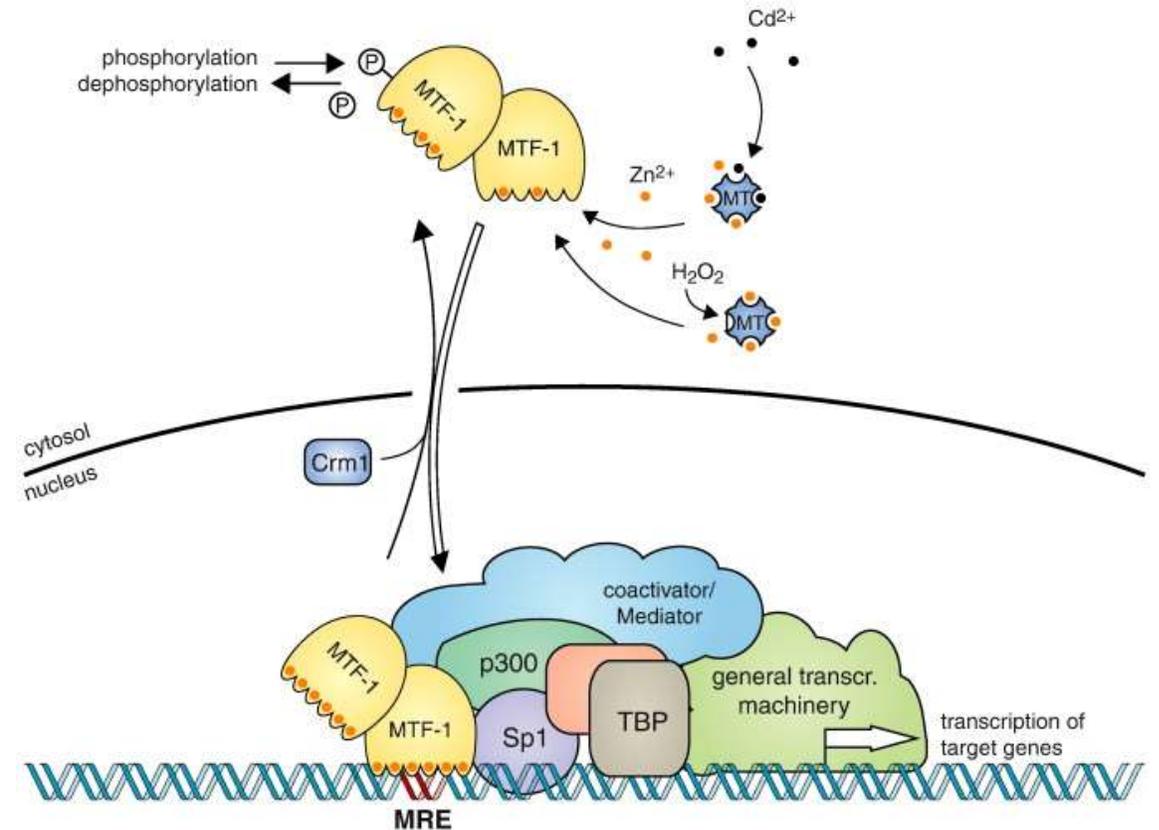


- *MTF1* promoterの上流には、**8-mix刺激下で形成されるSE**が存在
- 8-mix刺激下で、***MTF1* promoterは SE内のGWAS SNP領域と立体的にloopを形成**

Metal regulatory Transcription Factor 1; MTF-1



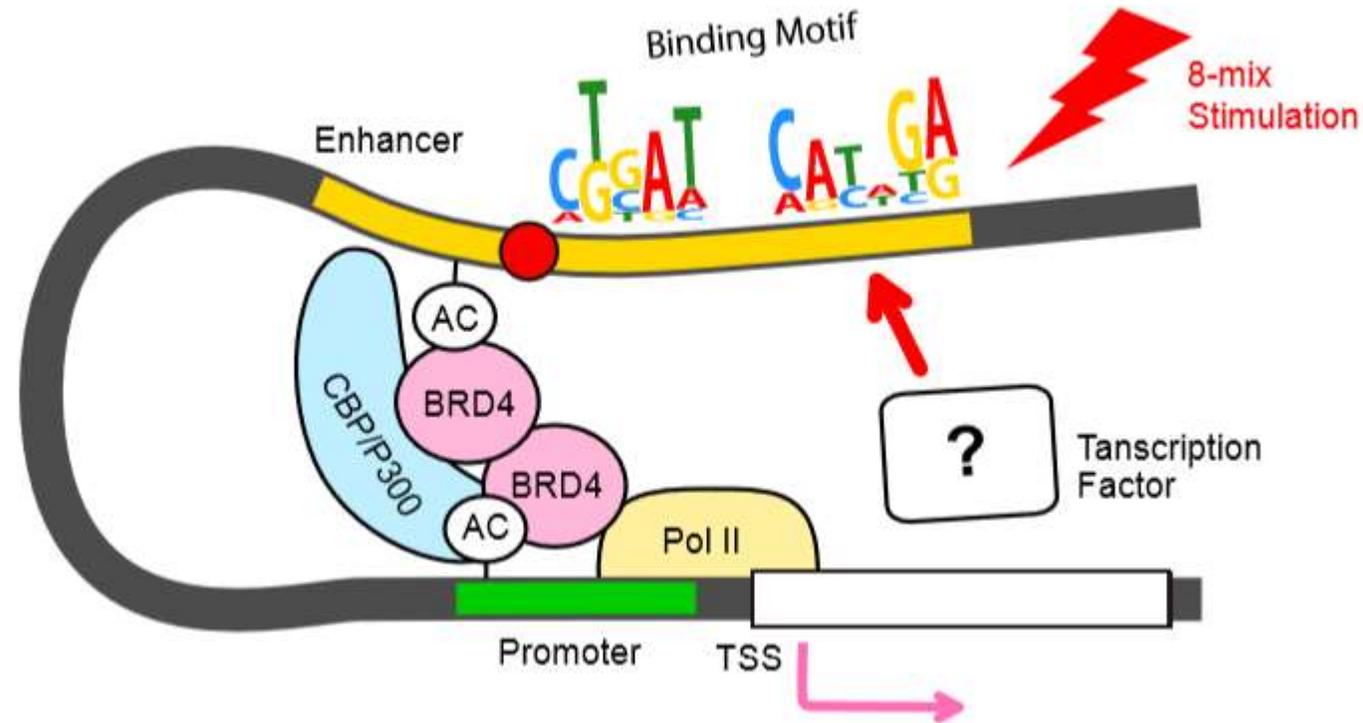
[Biochim Biophys Acta. 2012;1823(9):1416-25.]



- 定常状態では核と細胞質に存在. Znにより活性化され, 核に移動する.
- Target geneのMetal Responsive Element; MREに結合し, 他の転写因子 (例: HIF-1 α) や coactivator (例: p300) と complexを形成
- HIF-1 α の核への移動や転写活性に関与することで, 腫瘍増殖や進展に関わる

8-mix Super enhancerのモチーフ解析

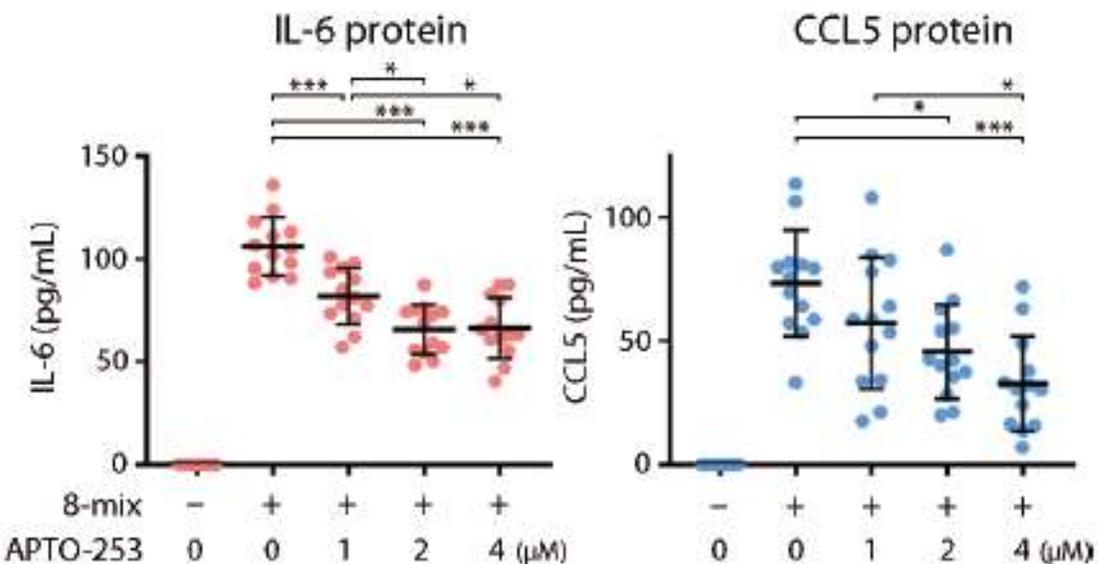
TF	Motif	SEs-connection	8-mix	
			vs TEs	vs NS SEs
SNAI1		yes	1.0×10^{-59}	1.0×10^{-14}
TCF4		yes	1.0×10^{-50}	1.0×10^{-13}
SNAI2		yes	1.0×10^{-48}	1.0×10^{-19}
MTF1		yes	1.0×10^{-18}	1.0×10^{-03}
SREBF1		no	1.0×10^{-09}	1.0×10^{-09}
RARA		no	1.0×10^{-09}	1.0×10^{-08}
JUN		yes	1.0×10^{-03}	1.0×10^{-14}
FOXL1		no	1.0×10^{-08}	1.0×10^{-04}
ZNF740		no	1.0×10^{-07}	> 0.05
IRF1		no	> 0.05	1.0×10^{-33}
CEBPB		yes	> 0.05	1.0×10^{-30}



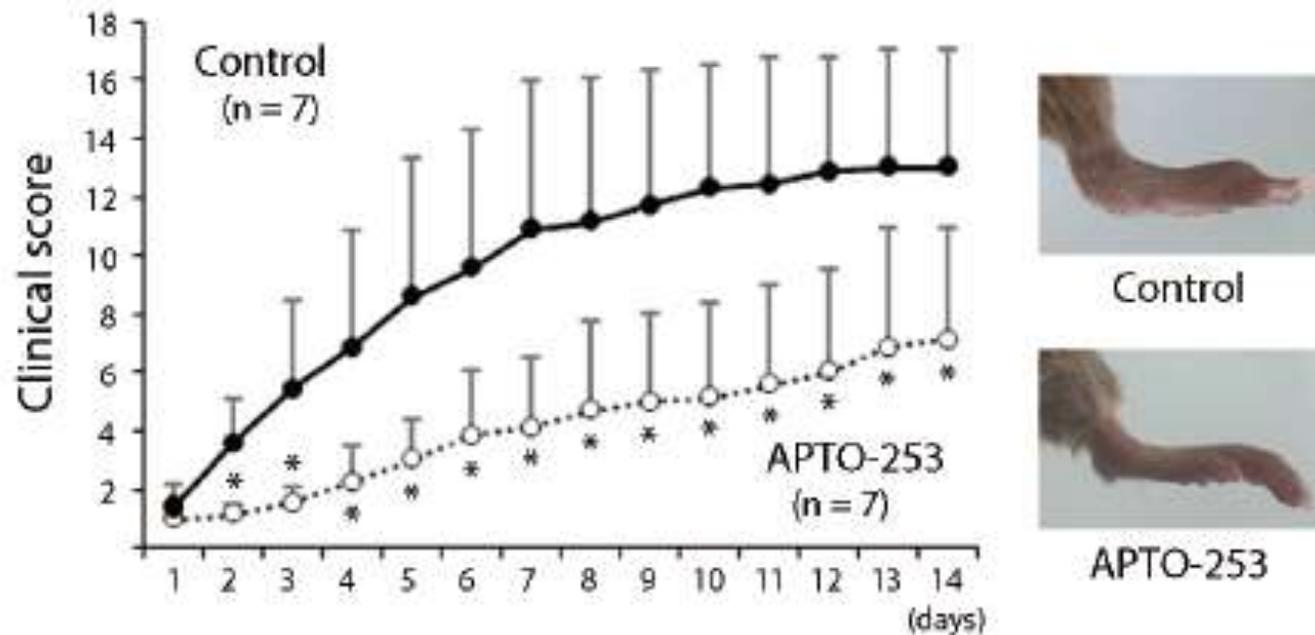
8-mix SEには、**MTX1**に代表される**SE関連遺伝子**が結合する可能性

MTF1阻害によるIL-6産生抑制と、関節炎抑制効果

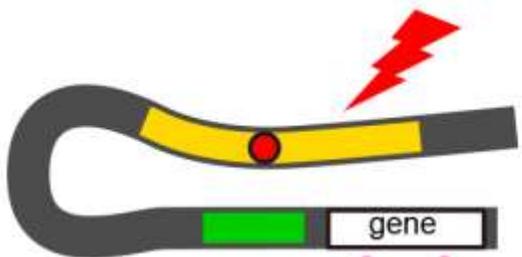
In vitro MTF1抑制



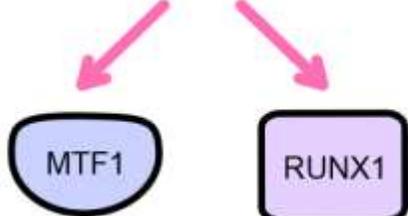
MTF1抑制によるCIA治療実験



- MTF1阻害薬 (APTO-253)は、濃度依存性にIL-6・CCL5の産生を抑制する
- CIA治療実験では、**発症した関節炎はMTF1阻害薬により有意に抑制される**



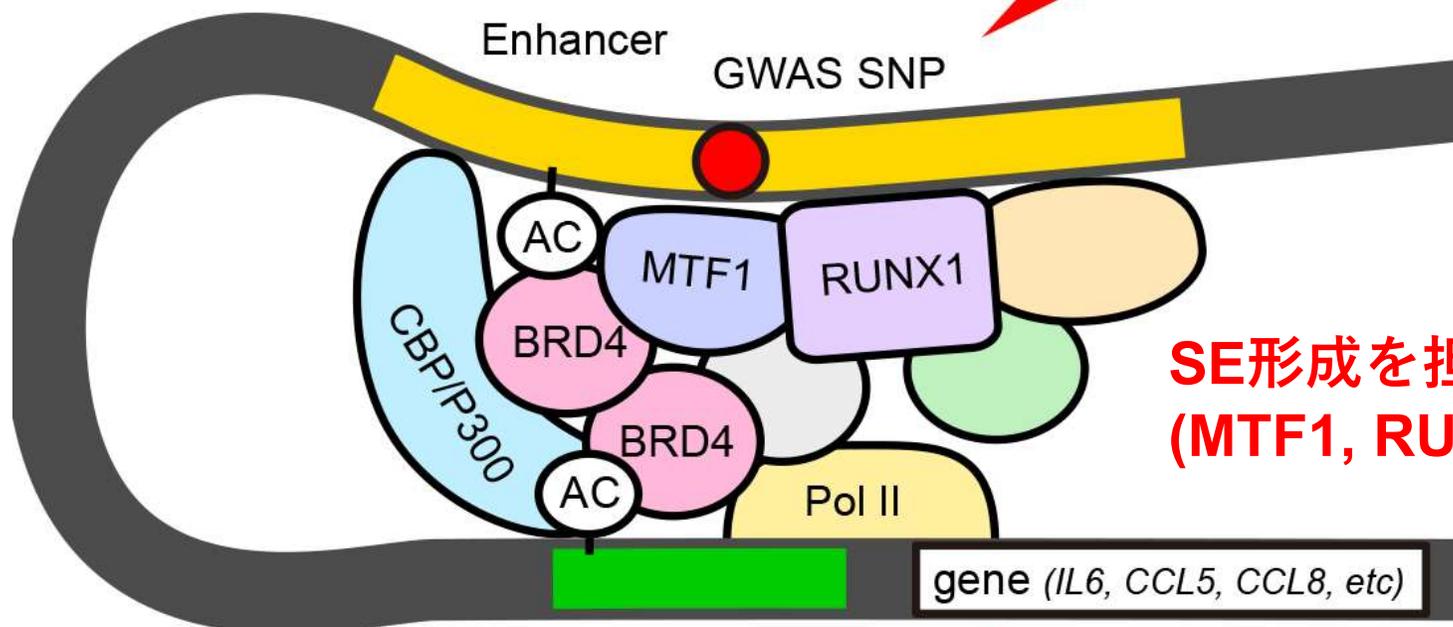
Self regulation



複合的な炎症環境



疾患感受性領域のSE形成



SE形成を担う転写調節因子
(MTF1, RUNX1, ...)

Promoter TSS

病態関連遺伝子の発現亢進

本論文のまとめ

- 活性化したSFはpathogenicな遺伝子を発現し, 特にCD40はIFN- γ 刺激でRA risk genotypeと発現亢進が有意に関連する.
- SFsは複合炎症下でSuper enhancer領域がRA risk SNPと重複し, RAの疾患責任細胞としてふるまう.
- MTF-1遺伝子は, 刺激下のSFのsuper enhancer領域がRA risk SNPと重複し, プロモーター領域と3次元的に近接し発現が亢進する.
- MTF1阻害でIL-6, CCL5発現は抑制され, マウス関節炎は改善した.

本論文の意義

- 本論文はsingle cell analysisではないので、新規細胞集団の同定や、解剖学的位置と表面マーカーの同定などには寄与しない。
- また、SFを抽出し、各種サイトカインで刺激した人工的な系であることにも留意が必要である。
- ただ、従来RA-GWASとの関連が示されたCD4, B細胞に加えて、SFも刺激下であれば発症責任細胞としてふるまうことが示されたことは新規性がある。
- 患者検体を用いた統合的機能ゲノム解析の有用性が、新規治療標的の同定(MTF1など)によって示されたという意義も大きい。