

トランスクリプトームデータから創薬ターゲットを見つける (変形性関節症を例に)

本記事では、変形性関節症 (osteoarthritis-like; OA) 患者でみられる遺伝子発現変動がインターロイキン (IL-17) によって引き起こされるということを示した論文 (Mimpen et al., 2021) で使用されたトランスクリプトームデータを [Omics Playground](#) で再解析します。

論文の概要

Mimpen らは、末期変形性関節症患者から得た軟骨細胞 (human chondrocytes; HC) および滑膜繊維芽細胞 (synovial fibroblasts; SF) に対し、IL-17 ファミリーに属する 3 種のサイトカイン (IL-17A, IL-17AF, IL-17F) を作用させた結果、血管新生、免疫、補体に関するパスウェイに異常をきたすことを発見した。また、関節炎や筋骨格の疾患に関わる遺伝子セットとも関連性がみられることも明らかにし、IL-17A が変形性関節症に関与していると結論づけている。

また、本論文では、軟骨細胞および滑膜繊維芽細胞のそれぞれを、対照群、IL-17A 処理群、IL-17AF 処理群、IL-17F の 4 つのグループに分け、さらに各群ごとに 6 サンプル用意している (すなわち、軟骨細胞および滑膜繊維芽細胞のそれぞれについて 24 種類のトランスクリプトームデータを用意している)。

1. クラスタリング解析

まずは tSNE を用いてデータのクラスタリングを行った結果、細胞種ごとにクラスターが分かれたものの、各処理によってクラスターが分かれることはなかった (図1)。

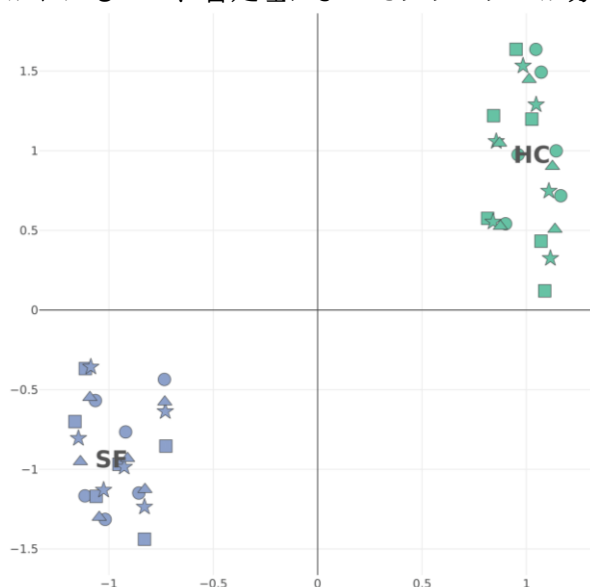


図1 tSNE によって、サンプルごとのデータを 2 次元平面上にプロットした図

細胞種 緑:軟骨細胞 青:滑膜繊維芽細胞
 処理 ●:コントロール
 ■:IL-17A 処理群 ★:IL-17AF 処理群 ▲:IL-17F 処理群

つづいて、各サンプルを細胞種および処理によってグループ分けし、ヒートマップによってグループ間の違いを可視化した結果、コントロールと処理群（とくに IL-17A 処理群）の間で遺伝子の発現状況に明確な差があることが分かった（図 2A、図 3A）。また、コントロールと IL-17A 処理群の間で最も変動が大きかったのは、どちらの細胞でも遺伝子クラスター S3 であった。クラスター S3 に付与されたアノテーションを見ると、炎症反応、血管新生、免疫反応と強く関連していることが分かった。また、軟骨細胞の場合では、さらに補体活性化とも関連が強いことが明らかになった（図 2B、図 3B）。これらは元論文で報告されている知見と合致した。

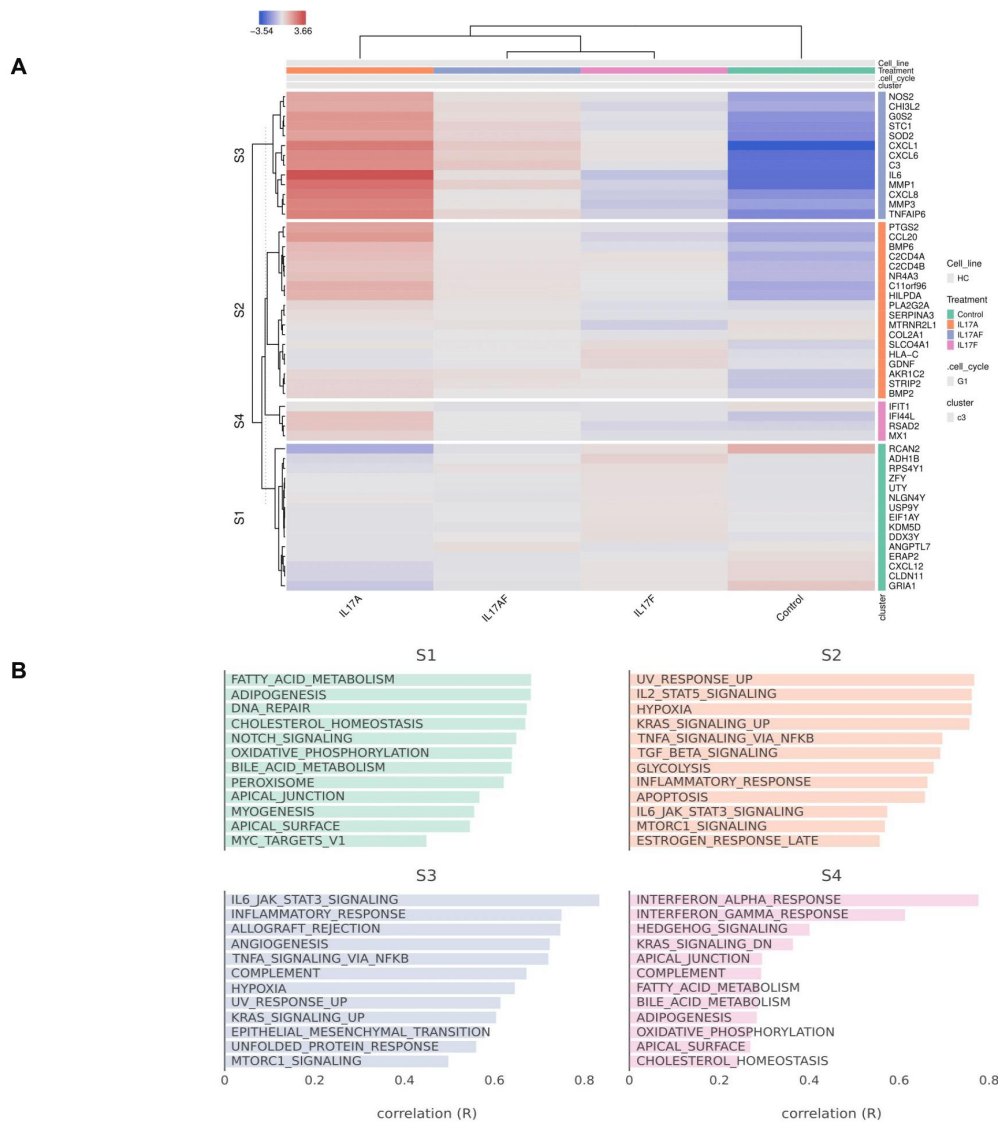


図 2 A:各群における軟骨細胞での遺伝子発現を示すヒートマップ B:ヒートマップと対応する遺伝子クラスター

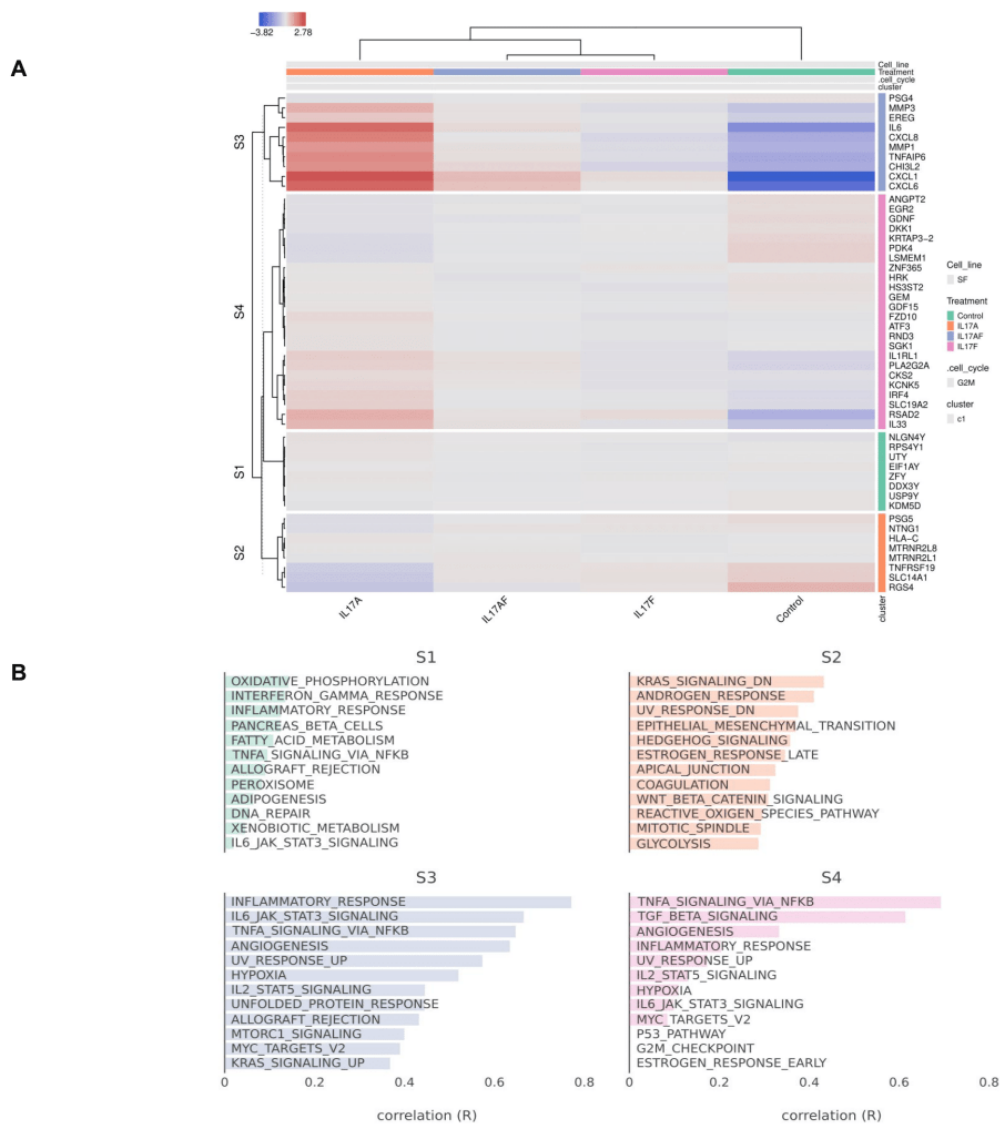


図3 A:各群における滑膜線維芽細胞での遺伝子発現を示すヒートマップ **B:**ヒートマップと対応する遺伝子クラスター

2.発現変動解析

本解析では、発現変動遺伝子として、3つの統計解析手法(EdgeR (qlf),DESEQ2 (wald),limma (trend); FDR<0.05, FC>|0.5|)のいずれでも有意と判定された遺伝子を用いた。

コントロールと IL-17A 処理群を比較した結果、軟骨細胞では 306 遺伝子の発現変動(発現上昇 196 発現低下 110)が観測されたのに対し、滑膜繊維芽細胞では 38 遺伝子の発現変動(発現上昇 32 発現低下 6)のみが観測された(図4)。また、これらのうち、29 遺伝子が両細胞で共通して発現変動していた(図5)。発現上昇している遺伝子の中には、IL-6, C-X-C motif chemokine ligands, NFKB inhibitor zeta (NEKBIZ), C-C motif chemokine ligand2 (CCL2), IRF1 などが含まれていたが、これらはすべて免疫反応に関与していることが知られている。また、その上記の他にも間接リウマチ患者で過剰発現することが知られている MAP3K8 が発現上昇していた(George and Salmeron, 2009)。

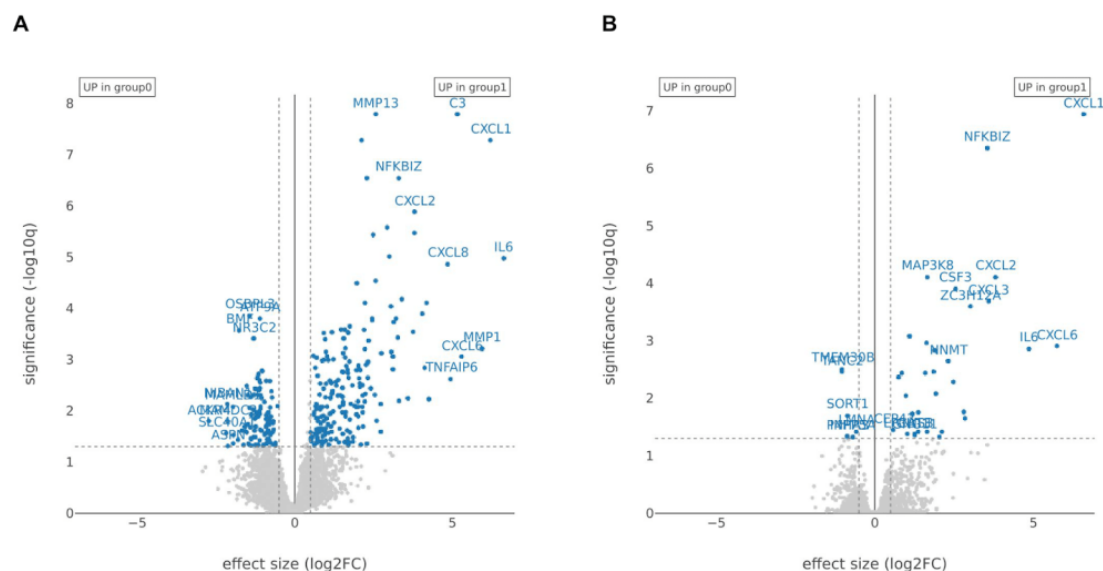


図4 コントロールと IL-17A 処理群間での遺伝子発現変動をあらわすボルケーノプロット A:軟骨細胞 B:滑膜繊維芽細胞

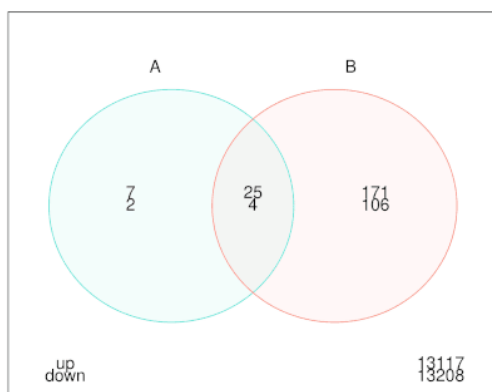


図5 各細胞種におけるコントロールと IL-17A 処理群間での遺伝子発現変動をあらわすベン図
上段:発現上昇遺伝数 下段:発現低下遺伝子数
A:軟骨細胞 B:滑膜繊維芽細胞

3. 遺伝子セットエンリッチメント解析

コントロールと IL-17A 処理群間の発現変動を、軟骨細胞と滑膜繊維芽細胞のそれぞれについて、公共のデータベースと比較した。アルゴリズムは fgsea を使用した (FDR<0.05, logFC>2)。軟骨細胞と滑膜繊維芽細胞における両群間の発現変動を、プラットフォーム中の "DISEASE" データベースと比較した結果、変形性関節症、関節炎、関節リウマチの他、強皮症、クローン病、円板状エリテマトーデスなどの炎症性および自己免疫性の疾患における遺伝子発現プロファイルと強い相関があることが分かった。以下の図では軟骨細胞に関する結果のみ示している (図 6)。

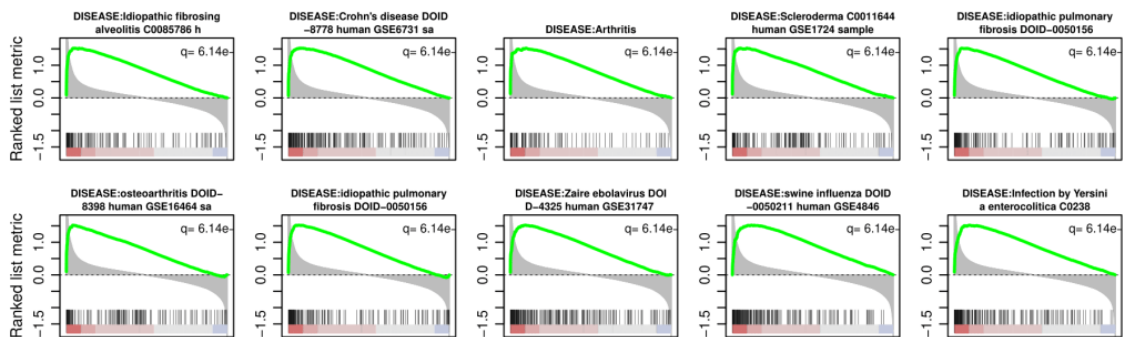


図 6 IL-17A 処理軟骨細胞でみられた発現変動と相関の高い 10 個の遺伝子発現プロファイル

また、KEGG パスウェイ解析の結果 (※最新版では KEGG ではなく WikiPathway が利用可能です)、軟骨細胞の IL-17A 処理群では、自然免疫および炎症化関与する NOD 様受容体パスウェイが有意に活性化していることが判明した ($q < 0.01$) (図 7)。さらに、GO エンリッチメント解析においても、軟骨細胞および滑膜繊維芽細胞の IL-17A 処理群において、免疫、炎症関連遺伝子セットが有意に発現上昇していることが分かったほか ($q < 0.01$)、軟骨細胞の IL-17AF 処理群でもわずかにそれらの発現上昇が認められた (図 8)。

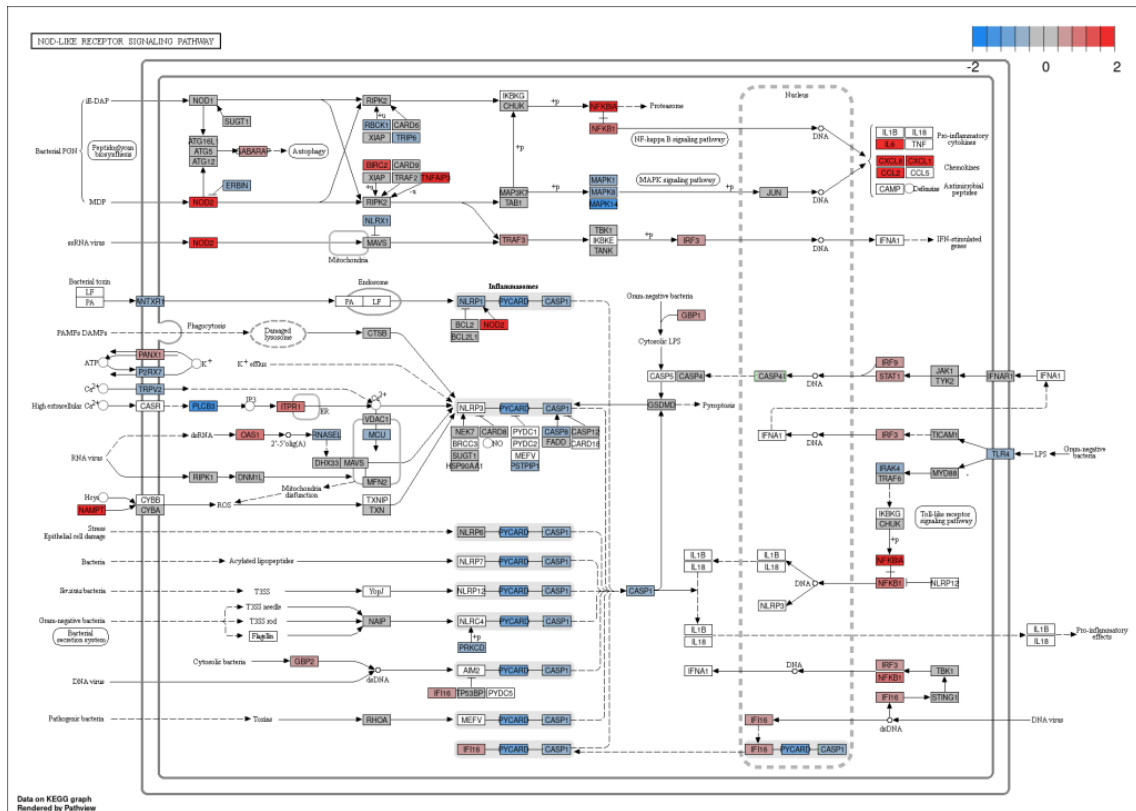


図7 NOD 様受容体パスウェイを図で示したもので、コントロールに対し IL-17A 処理軟骨細胞で発現上昇している遺伝子は赤で、発現低下している遺伝子は青で示されている。

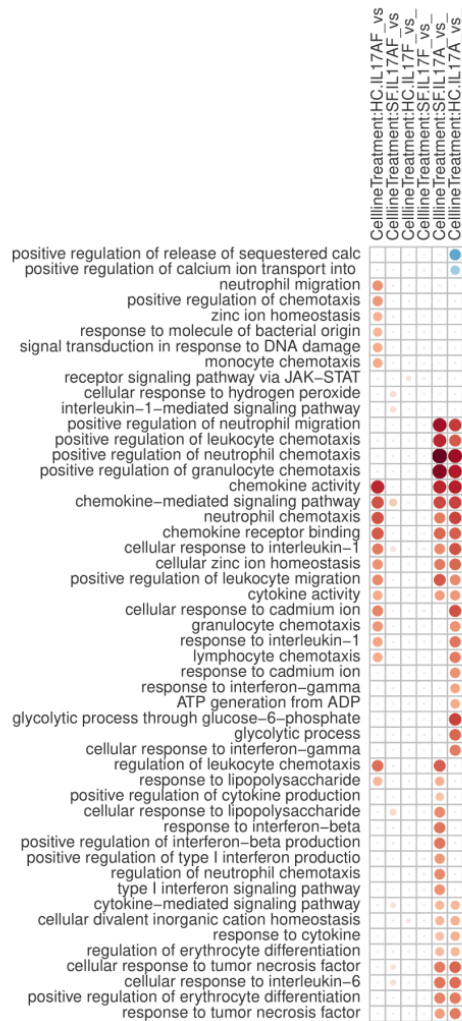


図8 コントロールに対し、IL-17 処理で有意な発現上昇がみられた GO タームは赤で、有意な発現低下がみられた GO タームは青で表示したマトリックス

つづいて、プラットフォーム中の drug connectivity パネルを利用し、L1000 drug activity データベースと実験結果の比較を行った。今回は、IL-17 処理群でみられた発現変動とは反対の発現変動をもたらす薬剤に着目し ($q < 0.05$)、IL-17 処理による発現変動に対する阻害剤となりうる薬剤を探索した。予測された薬剤の中で、効果が最も顕著だと思われるのは、p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases) 阻害剤となり、次いで CDK (cyclin dependent kinases) 阻害剤および MEK (mitogen-activated protein kinase kinases) 阻害剤となった (図 9A)。MEK は変形性関節症において中心的な作用をもたらす因子であり、治療の際のターゲットとして永らく注目されてきた (Loeser et al., 2010)。また、p38 MAPK パスウェイは関節リウマチと強く関係していることも報告されている (Clark and Dean, 2012)。CDK9 の阻害は、in vitro および変形性関節症モデルのマウスを用いた実験により、疾患に対して好ましい効果があることも報告されている (Xue et al., 2019; Haudenschild et al., 2019)。

個別の薬剤に着目してみると、いくつかの薬剤では、IL-17 処理群すべての発現変動と逆の発現変動が生じることが分かった (図 9B)。図 9B でマークした薬剤のうち、fostamatinib は SYK 阻害剤であり、変形性関節症患者に対して臨床試験が行われてはいるが (Tanaka et al., 2021)、少なくとも他で行われた *ex vivo* の実験では効果が限定的であった (Kjelgaard-Petersen et al., 2017)。AZ-628 という化合物は、RIP3 (receptor-interacting protein kinase-3) 阻害剤であり、本解析では全面的にアンタゴニストとしての性質を示しているだけでなく、実際に変形性関節症の症状を抑制することも最近示された (Jeon et al., 2020)。Alvocidib は外傷後変形性関節症 (PTOA) の発生を抑制することが知られており (Haudenschild et al., 2019)、triptolide は変形性関節症の治療法として広く研究されている (Lee et al., 2021)。最後に、Src kinase 阻害剤として知られる PP-2 は、軟骨細胞分化を制御することが知られており、Src kinase の抑制が変形性関節症をはじめとする骨格系疾患に対する治療法として有効である可能性を示唆している (Bursell et al., 2007)。

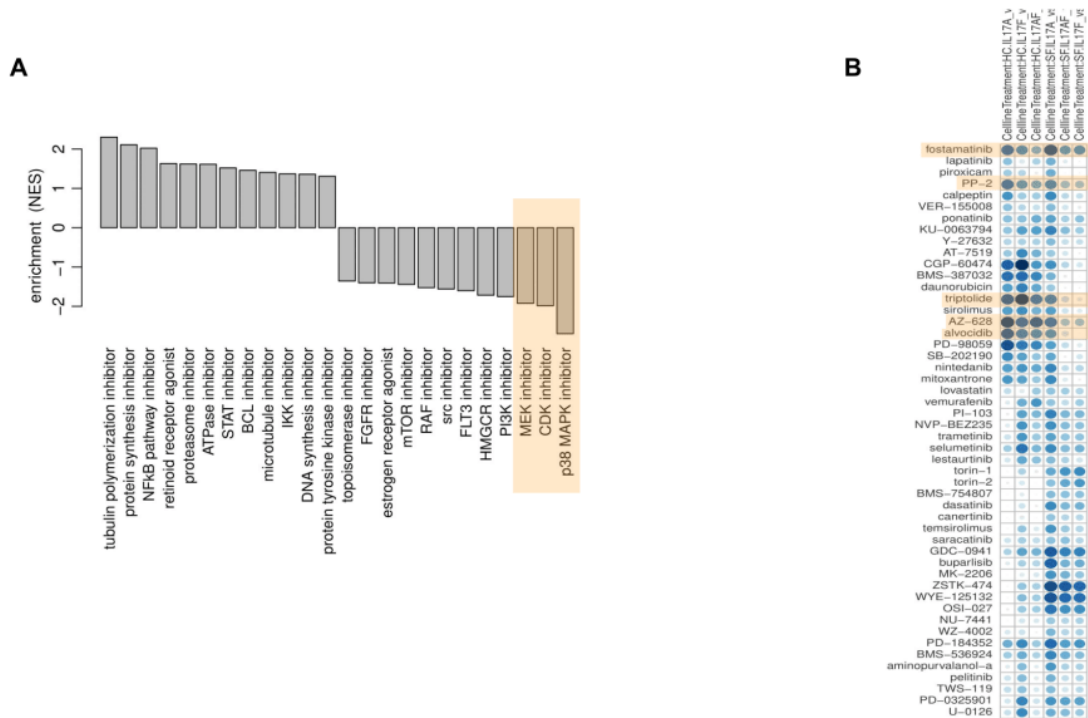


図 9 ドラッグ CMap 解析の結果 A:CMap 解析結果の中から、IL-17 処理でもたらされる発現変動と関連性の高いものを抽出している。負の NES (normalized enrichment score) は、IL-17 処理によってもたらされる発現変動とは逆の発現変動をもたらす薬剤であることを意味している。とくに NES が小さいものをハイライトしてある。 B:IL-17 処理による発現変動とは逆の発現変動をもたらす薬剤のうち、顕著なものをならべたマトリックスで、変形性関節症患者および疾患モデルのマウスで治験が行われた薬剤がハイライトしてある。

4. バイオマーカー分析

プラットフォーム中の“Find Biomarkers”パネルを使用し、各群で特徴的な発現をする遺伝子マーカーを見つけるための決定木を作成した。出力される決定木は、複数考えられる決定木の中の一つであるが、免疫関連因子のどのような発現変動が、変形性関節症での遺伝子発現変動と関連しているかを調べることができる。ケモカインである CXCL1 の発現に着目してみると、すべての処理群でコントロールとの差が顕著であり、非処理群と処理群を判別するのに有効である。また、NFKBIZ (NFKB inhibitor Zeta) 遺伝子も同様の傾向を示したほか、これらには劣るが、CXCL3 および IL-6 も非処理群と処理群の間で発現量の差がみられた。また、IL-17 処理群間の違いを判別するには、CXCL1, CXCL3, IL-6, NFKBIZ の発現量に着目すればよいことが分かるのに加えて、特に IL-17A が他のアイソフォームに比べても遺伝子発現に対する影響が大きいこともわかる。

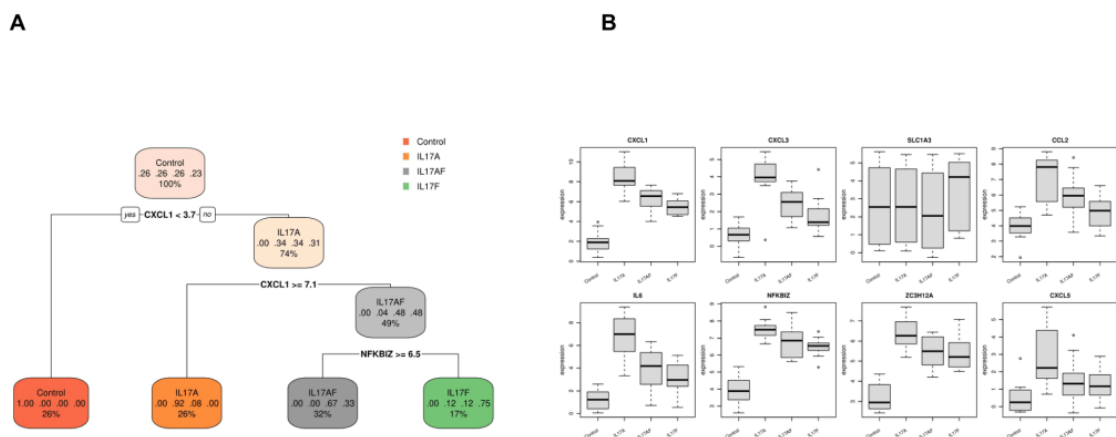


図 10 バイオマーカー分析の結果 **A**: 各群を判別するバイオマーカー探索のための決定木の一例
B: プラットフォームで出力されたバイオマーカーの発現量に関するボックスプロット

結論

Mimpen らが使用したデータを用いた再解析によって、元論文と同様、IL-17A 処理された軟骨細胞で変形性関節症と同様の遺伝子発現変動がみられることが分かった。この遺伝子発現変動は、免疫関連遺伝子および炎症関連遺伝子の発現上昇によって特徴づけられ、公共データベース中の関節炎および自己免疫疾患に関連する遺伝子発現プロファイルと同様の性質を示した。本解析では、MAP3K8 の発現上昇も知られているが、これは本解析中で MEK 阻害が治療法として有効であることが予測された drug connectivity 解析の結果とも関連している。また、実際に MEK および p38 MAPK の阻害が変形性関節症への治療法としてテストされているが、これは IL-17A による処理が変形性関節症でみられる遺伝子発現変動をよく再現できていることを示している。さらに、IL-17A 処理群におけるバイオマーカーとして、いくつかのケモカインや免疫関連遺伝子が挙げられたのと同時に、IL-17AF 処理や IL-17F 処理に比べ、IL-17A 処理による遺伝子発現変動に対する効果が大きいことも確かめられた。

参考文献

1. Bursell, L., Woods, A., James, C. G., Pala, D., Leask, A., & Beier, F. (2007). Src kinase inhibition promotes the chondrocyte phenotype. *Arthritis research & therapy*, 9, 1-12.
2. Clark, A. R., & Dean, J. L. (2012). Suppl 2: The p38 MAPK Pathway in Rheumatoid Arthritis: A Sideways Look. *The open rheumatology journal*, 6, 209.
3. George, D., & Salmeron, A. (2009). Cot/Tpl-2 protein kinase as a target for the treatment of inflammatory disease. *Current topics in medicinal chemistry*, 9(7), 611-622.
4. Haudenschild, D. R., Carlson, A. K., Zignego, D. L., Yik, J. H., Hilmer, J. K., & June, R. K. (2019). Inhibition of early response genes prevents changes in global joint metabolomic profiles in mouse post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 27(3), 504-512.
5. Jeon, J., Noh, H. J., Lee, H., Park, H. H., Ha, Y. J., Park, S. H., ... & Kim, Y. S. (2020). TRIM24-RIP3 axis perturbation accelerates osteoarthritis pathogenesis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(12), 1635-1643.
6. Kjelgaard-Petersen, C. F., Christensen, T. G., Häggglund, P., Karsdal, M. A., Thudium, C. S., & Bay-Jensen, A. C. (2017). AB0062 Ex vivo back-translation of fostamatinib's effect on joint ecm turnover shows significant effect on bone but no effect on the synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76 (Suppl 2), 1068-1069.
7. Lee, H., Zhao, X., Son, Y. O., & Yang, S. (2021). Therapeutic Single Compounds for Osteoarthritis Treatment. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(2), 131.

8. Loeser, R. F., Erickson, E. A., & Long, D. L. (2008). Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology*, 20(5), 581.
9. Mimpfen, J. Y., Baldwin, M. J., Cribbs, A. P., Philpott, M., Carr, A. J., Dakin, S. G., & Snelling, S. J. (2021). Interleukin-17A causes osteoarthritis-like transcriptional changes in human osteoarthritis-derived chondrocytes and synovial fibroblasts in vitro. *Frontiers in immunology*, 12, 676173.
10. Tanaka, Y., Millson, D., Iwata, S., & Nakayamada, S. (2021). Safety and efficacy of fostamatinib in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate in phase II OSKIRA-ASIA-1 and OSKIRA-ASIA-1X study. *Rheumatology*, 60(6), 2884-2895.
11. Xue, S., Zhu, L., Wang, C., Jiang, Y., Lu, H., Liu, Y., ... & Ma, J. (2019). CDK9 attenuation exerts protective effects on catabolism and hypertrophy in chondrocytes and ameliorates osteoarthritis development. *Biochemical and biophysical research communications*, 517(1), 132-139.

【お問い合わせ先】

フィルジェン株式会社 バイオインフォマティクス部

〒459 8011 愛知県名古屋市緑区定納山一丁目 1409 番地

TEL: 052 624 4388 (9 : 00 ~ 17 : 00) **FAX:** 052 624 4389 **Email:** biosupport@filgen.jp