

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17244

研究課題名(和文) miRNAデリバリーを利用したシェーグレン症候群に対する新たな治療法の探索

研究課題名(英文) Investigation of the role of miRNAs in the pathogenesis of Sjögren's syndrome for miRNA delivery

研究代表者

酒井 学 (SAKAI, MANABU)

大阪大学・歯学部附属病院・技術職員

研究者番号：50643376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群(SS)は、口腔内の慢性炎症や唾液分泌量の低下、乾燥症状を引き起こす全身性の難治性自己免疫疾患であり、現状ではSSに対する治療は乾燥症状に対する対症療法が基本となってしまう。本研究では近年注目を浴びている核酸デリバリーシステムを利用した新しい治療法の開発を目指すべく、原発性シェーグレン症候群モデルマウス(IQ1/Jicマウス)を使用し、SS特異的に上昇するmiRNA146a-5pとmiRNA146b-5pを同定した。この結果はmiRNA-146aとmiRNA146b-5pを将来的にシェーグレン症候群に対する核酸デリバリーシステムを利用した治療に使用できる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群(SS)は、口腔内の慢性炎症や唾液分泌量の低下、乾燥症状を引き起こす全身性の難治性自己免疫疾患であり、現状ではSSに対する治療は乾燥症状に対する対症療法が基本となってしまう。本研究ではSSモデルマウスからmiRNA146a-5pとmiRNA146b-5pを同定した。本研究結果は、これまで関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの他の自己免疫疾患と比較し、免疫抑制剤や生物学的製剤による治療法が確立していないISSに対する、miRNAを利用する新たな治療法の確立へと繋がる学術的、社会的意義を示した。

研究成果の概要(英文)：Sjogren's syndrome (SS) is a chronic autoimmune disorder characterized by lymphocytic infiltration into exocrine glands such as salivary and lacrimal glands, leading to oral and eye malfunction such as dry mouth and ocular dryness. Though various treatments for SS have been studied, no effective treatment for SS has been found. In this study, we first showed the presence of both miRNA-146a-5p and miRNA-146b-5p in IQ1/Jic mice used SS model by 3D-Gene assay. This result showed that both miRNA-146a-5p and miRNA-146b-5p may have the possibility of becoming one of the new treatment methods of SS and becoming a new diagnostic marker of SS.

研究分野：器官再生、器官発達、基礎歯学

キーワード：シェーグレン症候群 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は、涙腺・唾液腺などの外分泌器官を主な標的臓器として炎症細胞の浸潤が起こり、慢性の炎症や分泌量の低下、乾燥症状を引き起こす全身性の難治性自己免疫疾患である。これまでに考えられている原因としては遺伝的要因、免疫学的異常、環境因子としてのウイルス感染、ホルモンのバランス異常など様々である。治療としては点眼による涙液補充、ムチン産生促進剤であるジクアホソルナトリウム点眼、レバミピド点眼などがあり、また口腔乾燥症状に対しては、副交感神経ムスカリン受容体 (M3) 刺激薬であるセビメリンやピロカルピンの使用、人口唾液や水分補給による口腔内乾燥の防止などがある。しかし、現状では SS に対する治療は乾燥症状に対する対症療法が基本となってしまう。また、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの他の自己免疫疾患と比較し、SS は免疫抑制剤や生物学的製剤による治療法は確立していない。

近年、低分子医薬品にかわるシーズとして核酸医薬の研究が盛んになされているが、その中でも miRNA などの RNA 干渉を応用した技術は疾患の原因となる遺伝子の特異的かつ直接的に攻撃できることから、次世代の医薬品候補としての期待が大きい。miRNA は約 22 塩基からなる non-coding RNA であり、複数の mRNA を標的としその塩基相補性を介して、翻訳抑制または mRNA の分解を導き、タンパクレベルでの発現を抑制する。miRNA の発現は組織や発生、分化段階により異なり、細胞の増殖、発生分化、アポトーシスなどの調節を行っていることが明らかとなり、近年では関節リウマチをはじめとする様々な疾患の病態形成、進展に関与していることが報告されている (Nakamachi et al., 2016)。miRNA による疾患治療の基本コンセプトは、発現異常をきたした miRNA を正常状態に戻すというものであり、(1) 特定疾患で発現が亢進状態にある miRNA の機能を阻害する、(2) 特定疾患で発現が低下した miRNA を補充する、という 2 つのアプローチが考えられている (Montgomery et al., 2014, Salama et al., 2014)。

これまで SS に対する miRNA として同定されたものには、口唇小唾液腺細胞を用いた検討による miRNA-181b、miRNA17-92 の減少や、miRNA-574-3p、miRNA-768-3p の増加などが明らかになっているが (Alevizos et al., 2011, Alevizos & Illei, 2010, Kapsogeorgou et al., 2011)、他の自己免疫疾患で同定されている miRNA と比較するとその報告は大変少ない。更に、同定された miRNA が SS 以外の疾患をもつ患者から得られている可能性を否定出来ないことから、疾患特異的なものと判断するのが難しく、将来的にはバイオマーカーとして利用出来るかどうかという方向性のみまま留まっていることから、実際の SS 治療へ向けたアプローチへは至っていないのが現状である。そこで今回、私たちは原発性 SS モデルマウスを作成することで SS 特異的な miRNA を同定し、最終的にはそれら miRNA を障害が起きている唾液腺などの外分泌器官を標的とするデリバリーシステムにより導入するという、*in vivo* での新たな SS 特異的治療法を確立に向けた検討をしたいと考えている。miRNA は *in vitro* においては非常に高い活性が得られるものの、*in vivo* では単独投与で十分な活性を得ることは難しい。その主な原因は生体内での安定性の低さや物理学的特性に起因するものと言われており、*in vivo* への応用には反応の場である細胞質へと核酸分子を効率的かつ安定的に導入する、適切なデリバリーシステムとの併用が必須条件になっている。そこで本研究の進捗次第では、デリバリー技術として高い汎用性ととも優れた安全性を持つことが立証されており、将来的に臨床開発へとステージが進んだ場合にも対応が可能なアテロコラーゲンを用いた検討 (Nakamachi et al., 2016) に進めたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究は、シェーグレン症候群 (SS) に対する核酸デリバリーシステムを利用した新しい治療法の開発を目的とする。SS は他の自己免疫疾患と比べても有効な治療は確立されておらず、対症療法に留まっているのが現状である。そこで本研究では、近年盛んに研究がなされている核酸医薬とドラッグデリバリーに着目し、以下の 2 点を検討する。

- (1) 原発性 SS 特異的モデルマウスを作成し、SS に特異的な miRNA を網羅的に解析、同定する
- (2) 同定された miRNA をデリバリーシステムにより障害部へ導入し、その効果を多角的に解析する

これらの結果により、これまでの対症療法とは異なり、根治治療へと繋がる新たな SS の治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) NFS/sld ミュータントマウスを使用した、シェーグレン症候群 (SS) モデルマウスの作成
舌下腺粘液細胞に分化異常をきたす NFS/sld ミュータントマウスに生後 3 日目の胸腺摘出を施すことにより、原発性 SS モデルマウスを作成する (Haneji et al., 1994, Haneji et al., 1997)。

- (2) SS モデルマウスから採取した障害唾液腺組織中の miRNA を網羅的解析
SS モデルマウスから障害が起きている唾液腺組織を採取する。

採取した障害唾液腺の形態学的観察をするため、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、炎症の程度を Saegusa らの判定方法を参考にして分別する (Saegusa J et al., 1997)。

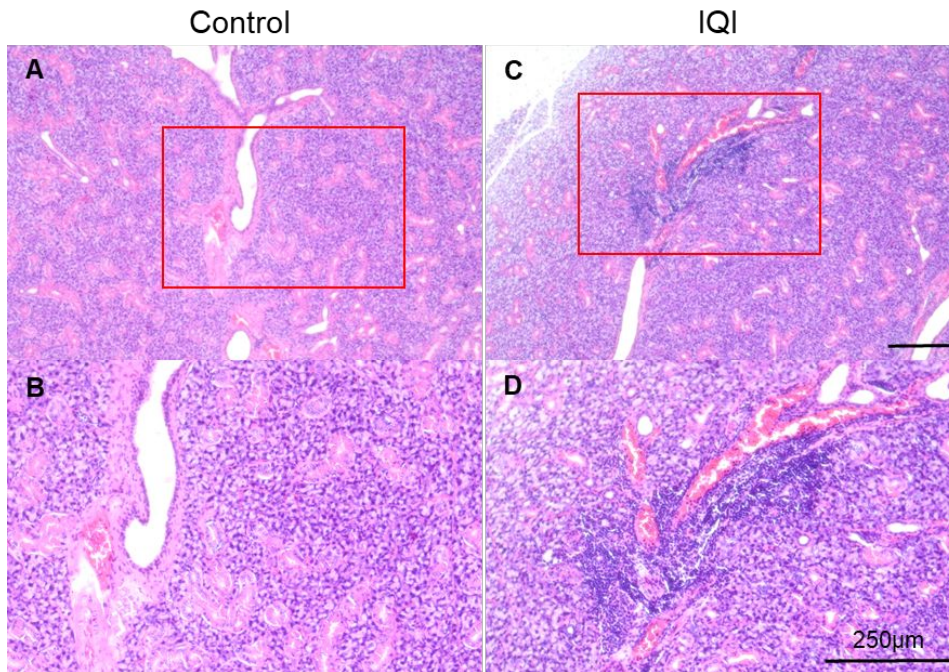
の結果から、障害が大きく観察された IQI マウス(10 month)から唾液腺を採取し、miRNA を miRNeasy mini kit (Qiagen)を使用して抽出する。

抽出された total RNA を 3D-Gene miRNA labeling kit (Toray Industries)でラベリングし、3D-Gene Mouse miRNA Oligo chips (Toray Industries)でハイブリダイズさせる。

蛍光シグナルを 3D-Gene Scanner (Toray Industries)により検出し、3D-Gene Extraction software (Toray Industries)により解析する。それぞれのデータは、95%信頼区間のブランクスポットのシグナル強度によって決定されたバックグラウンドシグナルの平均強度で置換することにより正規化する。バックグラウンドのシグナル強度の 2SD より大きいシグナル強度があるスポットの測定値を有効とし、miRNA の相対的発現レベルは、マイクロアレイによる有意なスポットのシグナル強度を比較して計算する。信号強度の中央値が 25 に調整されるように正規化データをアレイごとに網羅的に正規化する。これらの結果から SS 特異的に値が変化している miRNA を同定する。

4 . 研究成果

2017 年度：研究目的(1)について重点的に検討を行った。当初計画していた研究実施内容においては舌下腺粘液細胞に分化異常をきたす NFS/sld ミュータントマウスを使用予定であったが、摘出手技の正確性を向上させるためには多くの時間が必要なこと、および摘出後のフローサイトメトリー手技の煩雑さの観点から使用マウスを変更し、SS 自然発症モデルである IQI マウス (ヒト SS 末期病変と類似した B 細胞浸潤が顕著な唾液腺炎病変を形成する (Saegusa と Kubota, JVMS, 1997))とした。IQI マウスについて、コントロール群である ICR マウスと比較検討したところ、IQI マウスでは生後 4 か月から顕著な唾液腺炎病変が観察され、週齢を重ねるのに比例して唾液腺組織の炎症病変が増加していた (図 1、2)。



(図 1) 生後 10 か月の唾液腺組織像
A: コントロール ICR マウスの唾液腺組織 B: A の拡大図
C: IQI マウスの唾液腺組織 D: C の拡大図

Age (month)	Age (month)	No. of cases with the lesion	No. of cases with the lesion		
			positive / examined (%)	Slight	Moderate
4	4	8 / 12 (67)	8	0	0
7	7	11 / 14 (79)	6	4	1
10	10	13 / 13 (100)	4	4	5

(図 2) IQI マウスにおける唾液腺組織の障害の経時的変化

2018年度：生後10か月のIQIマウスを使用し、東レの3Dgene-assayを利用し、SSに關与すると考えられるmiRNAを網羅的に解析した。その結果、コントロール群に対してmiRNA146a-5pとmiRNA146b-5pの2つがIQIマウスの唾液腺において有意に増加していた(図3)。miRNA146は内因性の免疫、炎症性サイトカインの産生、免疫細胞の増殖などに関わっており、この機能がシェーグレン症候群で觀察される唾液腺症状に關連する可能性が示唆された。この結果はmiRNA-146a/b-5pが将来的にシェーグレン症候群の診断マーカーや、核酸デリバリーシステムを利用した新しい治療法の開発に繋がる可能性を示した。当初計画していた研究目的(2)については、NFS/sldミュータントマウスをSS自然発症モデルであるIQIマウスに変更したこと、また検討可能になるまでのIQIマウスの成長に多くの時間を費やしてしまったため、今後の検討課題とする予定である。

(Up)					(Down)				
Name	ID	(Global Normalization)			Name	ID	(Global Normalization)		
		Control	IQI	Ratio			Control	IQI	Ratio
mmu-miR-3552	MIMAT0035715	11	55	5.11	mmu-miR-7043-3p	MIMAT0027991	41	8	0.19
mmu-miR-6388	MIMAT0025135	5	13	2.76	mmu-miR-3572-3p	MIMAT0020636	16	6	0.34
mmu-miR-1901	MIMAT0007880	6	17	2.65	mmu-miR-6950-3p	MIMAT0027801	16	6	0.38
mmu-miR-294-5p	MIMAT0004574	6	16	2.62	mmu-miR-18a-5p	MIMAT0000528	14	6	0.41
mmu-miR-146a-5p	MIMAT0000158	133	346	2.60	mmu-miR-551b-3p	MIMAT0003890	19	8	0.43
mmu-miR-181b-1-3p	MIMAT0017067	8	20	2.50	mmu-miR-7032-3p	MIMAT0027969	13	6	0.43
mmu-miR-7226-3p	MIMAT0028421	5	12	2.41	mmu-miR-196b-3p	MIMAT0017170	13	6	0.44
mmu-miR-134-5p	MIMAT0000146	5	11	2.36	mmu-miR-7021-3p	MIMAT0027947	13	6	0.44
mmu-miR-6899-3p	MIMAT0027699	5	12	2.35	mmu-miR-3110-3p	MIMAT0014952	16	7	0.44
mmu-miR-7647-3p	MIMAT0029797	10	24	2.31	mmu-let-7i-3p	MIMAT0004520	12	6	0.45
mmu-miR-710	MIMAT0003500	5	12	2.29	mmu-miR-3544-3p	MIMAT0022354	21	10	0.46
mmu-miR-3093-5p	MIMAT0014907	7	15	2.27	mmu-miR-5626-5p	MIMAT0022381	14	7	0.47
mmu-miR-6913-3p	MIMAT0027727	6	13	2.27	mmu-miR-7681-3p	MIMAT0029883	15	7	0.47
mmu-miR-1298-5p	MIMAT0014809	12	25	2.19	mmu-miR-6942-3p	MIMAT0027785	20	9	0.47
mmu-miR-491-5p	MIMAT0003486	13	29	2.17	mmu-miR-1199-5p	MIMAT0005860	33	16	0.47
mmu-miR-150-5p	MIMAT0000160	30	63	2.13	mmu-miR-154-3p	MIMAT0004537	15	7	0.47
mmu-miR-146b-5p	MIMAT0003475	102	216	2.11	mmu-miR-6908-3p	MIMAT0027717	13	6	0.47
mmu-miR-7017-5p	MIMAT0027938	6	13	2.07	mmu-miR-449a-5p	MIMAT0001542	14	7	0.48
mmu-miR-1843b-5p	MIMAT0019345	9	18	2.06	mmu-miR-24-1-5p	MIMAT0000218	25	12	0.48
					mmu-miR-291b-5p	MIMAT0003189	13	6	0.49
					mmu-miR-669f-3p	MIMAT0005839	24	12	0.50
					mmu-miR-25-5p	MIMAT0017049	22	11	0.50
					mmu-miR-470-5p	MIMAT0002111	11	6	0.50

(図3)コントロールICRマウスとIQIマウスのmiRNA発現量の比較

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

(1)Minagi H, Ikai K, Araie T, Sakai M, Sakai T. Benefits of long-term pilocarpine due to increased muscarinic acetylcholine receptor3 in salivary glands. Biochemical and Biophysical Research Communications. 査読有.503(2):1098-1102.2018.doi:10.1016/j.bbrc.2018.06.125.

(2)Y Tokuhara, T Morinishi, T Matsunaga, M Sakai, T Sakai, H Ohsaki, K Kadota, Y Kushida, R Haba and E Hirakawa. Nuclear expression of claudin-3 in human colorectal adenocarcinoma cell lines and tissues. Oncology Letters. 査読有.15(1):99-108.2018.doi:10.3892/ol.2017.7281.

(3)Sakai M, Matsushita T, Hoshino R, Ono H, Ikai K, Sakai T. Identification of the protective mechanisms of Lactoferrin in the irradiated salivary gland. Scientific Reports. 査読有.7(1):9753.2017.doi:10.1038/s41598-017-10351-9.

[学会発表](計3件)

(1)酒井学、松下巧、星野涼子、阪井丘芳. 唾液腺に対するラクトフェリンの機能解析. 第72回NPO法人日本口腔科学学会学術集会.2018.

(2)井階一樹、酒井学、阪井丘芳. 唾液腺の再生過程における転写因子p63の発現と局在. 第72回NPO法人日本口腔科学学会学術集会.2018.

(3)Ikai K, Sakai M, Matsushita T, Ono H and Sakai T. Lactoferrin promotes salivary gland development and radioprotection. Gordon Research Conference -Salivary glands & Exocrine

Biology.2017.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。