

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591076

研究課題名（和文）関節リウマチにおけるマイクロRNAによるインテグリンの制御に関する研究

研究課題名（英文）Contribution of integrin in the pathogenesis of rheumatoid arthritis

## 研究代表者

河野 誠司（KAWANO SEIJI）

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号：20351512

研究成果の概要（和文）：本研究は、関節リウマチ（RA）の病態におけるmiRNA-124の関与をインテグリンβ1制御の面から明らかにし、miRNAによるRAの病態解明と診断・治療への応用を図ることを目的とし、以下の結果を得た。(1)RA患者培養滑膜細胞にmiR-124を強制発現させると、インテグリンβ1の発現減少が見られた。(2)ラット・アジュバント関節炎モデルで、miR-124を投与したところ、関節炎の軽減が認められた。さらに関節組織において、インテグリンβ1の発現低下を認めた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the roles of miRNA with regard to the regulation of beta1 integrin in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. We found that (1) Overexpression of miR-124 caused lower expression of beta1 integrin in RA synovioocyte cell line, (2) Injection of miR-124 ameliorated the arthritis and reduced beta-1 integrin expression in histological section of joints in rat adjuvant-induced arthritis model.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：臨床免疫学・臨床検査学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：マイクロRNA、関節リウマチ、インテグリン

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ（RA）はわが国において約70万人以上が罹患している原因不明の自己免疫疾患である。RAの関節痛や関節変形によるADL・QOLの低下を防ぐ治療診断法の確立は、医学的にも社会的にも重要な課題の一つである。

近年発見されたmiRNAは、主にメッセンジャーRNA(mRNA)から蛋白への翻訳を抑制

する重要な分子である(2)。そして、発生・分化・増殖・代謝などの生命現象を制御することが知られ(3)、miRNAを用いた創薬の期待も高い(4)。そこで、我々は平成18年度より科学研究費補助金の支援を受け、RA滑膜細胞と変形性関節症(OA)滑膜細胞の156個のmiRNAを網羅的に解析し、RAで統計学的に有意に発現量が増加しているmiR-146など5個のmiRNAと、唯一低下して

いる miR-124a を同定した。我々は miR-124a に注目し、miRBase database の miRNA 標的分子検索プログラム (5) で miR-124a の標的分子を推定した。miR-124a を RA 滑膜細胞に強制導入して機能解析を行ったところ、miR-124a は滑膜細胞増殖を抑制し、miRBase で推定された細胞周期タンパク CDK2 蛋白の発現を抑え、MCP-1 の産生を抑制した。またルシフェラーゼ=アッセイにより、miR-124a が直接的に CDK2 や MCP1 の mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、蛋白への翻訳を制御していることを証明した (6)。以上より、miR-124a の発現低下が RA の病態に促進的・多面的に関与しており、新規の治療や診断への応用の可能性が高いことが示唆された。

miRBase を含む複数のデータベースで miRNA 標的分子を検索すると miR-124 (現在では miR-124a の表記は消えているので、以下 miR-124 とする) の標的候補分子として  $\beta 1$  インテグリンを挙げており、2009 年に miR-124 と Argonaute の複合体を用いた三次元解析で、miR-124 は  $\beta 1$  インテグリンの mRNA を標的として結合すると報告された。インテグリンは、細胞接着受容体であり、白血球・上皮細胞の細胞間接着や細胞と細胞外マトリックスとの接着分子として機能し、T リンパ球では白血球の移動や活性化を媒介している。またインテグリンは Th1 誘導性のケモカインであるオステオポンチン (OPN) の受容体として働くなど、多彩な生理機能を持っている。 $\beta 1$  に注目すると、RA 滑膜細胞においては  $\beta 1$  鎖からの刺激が滑膜細胞に ICAM1 や Fas の発現を促すこと、 $\alpha 5 \beta 1$  がミュータンス菌体成分 protein I/II (RA のトリガーの候補の一つ) の受容体として働き IL-6・IL-8 が産生されること (11)、滑膜細胞の VLA4 ( $\alpha 4 \beta 1$ ) と B 細胞上の VCAM1 の相互作用により B 細胞のアポトーシスが抑制されること (12)、などが報告されている。また、 $\alpha 1 \beta 1$  は T リンパ球とコラーゲンとの接着に関与していて、RA 滑膜浸潤 CD4+T リンパ球には VLA1 ( $\alpha 1 \beta 1$ ) が高発現しており (13)、抗 VLA1 抗体投与がマウスのコラーゲン誘発性関節炎を改善すること (14)、 $\alpha 1 \beta 1$  と IL-7R は協調して T 細胞から RANKL を分泌させ破骨細胞への分化を促すこと (15)、などが報告されている。

以上のように  $\beta 1$  インテグリンが miR-124 の標的分子である可能性が高いことと、RA 病態への  $\beta 1$  インテグリンの広汎な関与から、RA では miR-124 の発現低下のために  $\beta 1$

インテグリンの発現が調節されないことが RA 滑膜の炎症を促進しているのではないかと、miR-124 を高発現させれば  $\beta 1$  インテグリンの媒介する多彩な炎症機転を阻止できるのではないかと、という着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、RA の病態における miR-124 の関与を  $\beta 1$  インテグリンの発現制御という視点から解析し、miRNA を標的とした新しい RA 治療法・診断法の可能性を探る。期間内に、次のことを明らかにしたい。

1) 滑膜細胞・リンパ球・単球で、miR-124a が  $\beta 1$  インテグリンの発現を直接制御しているか。

2) miR-124 を強制発現させると、 $\beta 1$  インテグリンの発現調節を通じて、滑膜細胞やリンパ球の増殖や相互作用、サイトカイン/ケモカイン分泌機能に影響を与えるか。

3) ラット関節炎モデルにおいて、miR-124 の投与が関節局所で  $\beta 1$  インテグリンの発現を低下させ関節炎を抑制させるかどうか、関節炎の滑膜・軟骨・骨組織にどのような影響を与えるか。

## 3. 研究の方法

本研究では、RA の病態における miR-124 の関与を  $\beta 1$  インテグリンの発現制御という視点から解析し、miRNA を標的とした新しい RA 治療法・診断法の可能性を探る。期間内に、次のことを明らかにしたい。

1) 滑膜細胞・リンパ球・単球で、miR-124a が  $\beta 1$  インテグリンの発現を直接制御しているか。

2) miR-124 を強制発現させると、 $\beta 1$  インテグリンの発現調節を通じて、滑膜細胞やリンパ球の増殖や相互作用、サイトカイン/ケモカイン分泌機能に影響を与えるか。

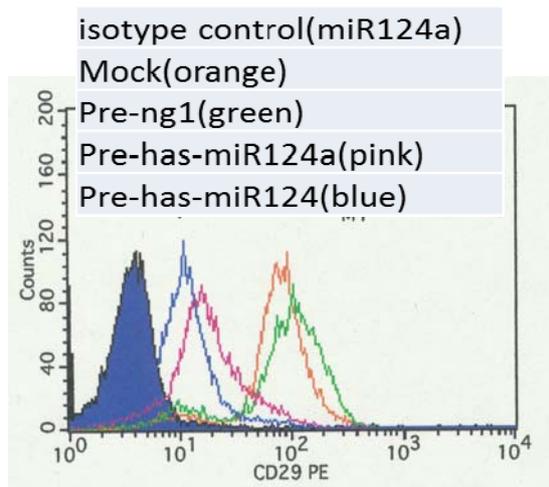
3) ラット関節炎モデルにおいて、miR-124 の投与が関節局所で  $\beta 1$  インテグリンの発現を低下させ関節炎を抑制させるかどうか、関節炎の滑膜・軟骨・骨組織にどのような影響を与えるか。

## 4. 研究成果

インテグリン  $\beta 1$  への作用を中心に明らかにするために培養細胞およびラットを用いて実験を行い、以下の結果を得た。(1) インテグリン  $\beta 1$  への miR-124 の効果の検討。RA 患者由来滑膜の組織染色にてインテグリン  $\beta 1$  の発現増強を確認した。患者培養滑膜細胞 (RA-FLS) に miR-124 の前駆体 pre-miR-124 を Lipofectamine2000 と混合して添加し miR-124 を RA-FLS に強制発現させて、インテグリン  $\beta 1$  の発現の変化を FCM で検討したところ、インテグリン  $\beta 1$  の発現減少が見られた (図 1)。(2) ラット・アジュバント関節炎モデルでの miR-124 発現の評価。ラット・アジュバント関節炎モデルで、miR-124 を投

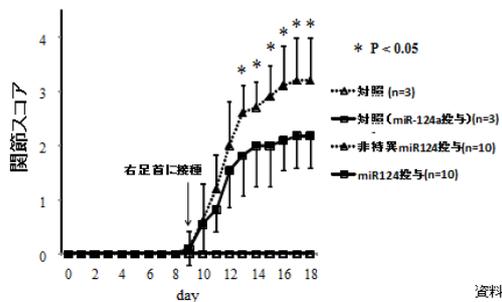
与したところ、関節炎誘導ラットの関節炎の軽減が認められた。(図2)さらに組織学的検討により、関節組織において、インテグリンβ1の発現低下を認めた。現在、組織中で主にインテグリンβ1を発現している細胞の同定と、その細胞におけるインテグリンβ1の発現低下を確定する実験を進めている。以上の結果より、インテグリンβ1の発現を減少させる機序によりmiR-124をリウマチ関節炎に使用できる可能性が強く示唆される。

(図1)



(図2)

miRNA-124を関節注射すると、ラット・アジュバント関節炎にて関節腫脹が軽減する



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計15件)

- ① Onishi A, Sugiyama D, Tsuji G, Nakazawa T, Kogata Y, Tsuda K, Naka I, Nishimura K, Misaki K, Kurimoto C, Hayashi H, Kageyama G, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Kumagai S, and Morinobu A. Mycophenolate mofetil versus intravenous cyclophosphamide for induction treatment of proliferative

lupus nephritis in a Japanese population: a retrospective study. *Mod Rheumatol*. 2012 Mar 25. [Epub ahead of print] (査読有)

- ② Jauharoh SA, Saegusa J, Sugimoto T, Ardianto B, Kasagi S, Sugiyama D, Kurimoto C, Tokuno O, Nakamachi Y, Kumagai S, and Kawano S. SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochem Biophys Res Comm*. 2012 Jan 6;417(1):582-7. (査読有)
- ③ Sugimoto T, Nobuhara Y, Kawano S, and Morinobu A. Trimethoprim-Sulfamethoxazole-Induced Hepatitis in Mixed Connective Tissue Disease. *International Journal of Clinical Medicine*, 2011, 2, 629-632. (査読有)
- ④ Onishi A, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, and Kumagai S. Diagnostic Accuracy of Serum 1,3-β-D-Glucan Aspergillosis: Systematic Review and Meta-Analysis. for Pneumocystis Jiroveci Pneumonia, Invasive Candidiasis and Invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2012 Jan;50(1):7-15. Epub 2011 Nov 9. (査読有)
- ⑤ Kasagi S, Kawano S, and Kumagai S. PD-1 and Autoimmunity. Review. *Critical Reviews in Immunology*. 2011;31(4):265-95. (査読有)
- ⑥ Kawano S and Nakamachi Y. Andrew B. Lemmey (Ed.), The Role of miRNA in Rheumatoid Arthritis, Rheumatoid Arthritis - Etiology, Consequences and Co-Morbidities. ISBN: 978-953-307-847-2, p171-186, 2011. InTech. (査読有)
- ⑦ Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, Ichinose K, Nakamura H, Tsujino A, Kawakami A, Matsunaka M, Kasagi S, Kawano S, Kumagai S, Ohmura K, Mimori T, Hirano M, Ueno S, Tanaka K, Tanaka M, Toyoshima I, Sugino H, Yamakawa A, Tanaka K, Niikawa N, Furukawa F, Murata S, Eguchi K, Ida H, and Yoshiura K. Assembly defect due Q:1 to a PSMB8 mutation ; 2 reduces proteasome activity and causes the

- autoinflammatory disorder,  
Nakajo-Nishimura syndrome. *PNAS USA*. 2011;6;108(36):14914-9. (査読有)
- ⑧ Kawano S and Nakamachi Y. miR-124a as a key regulator of proliferation and MCP-1 secretion in synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Mar;70 Suppl 1:i88-91. Review. (査読有)
- ⑨ Morinobu A, Tsuji G, Kasagi S, Saegusa J, Hayashi H, Nakazawa T, Kogata Y, Misaki K, Nishimura K, Sendo S, Miura N, Kawano S, and Kumagai S. Role of imaging studies in the diagnosis and evaluation of giant cell arteritis in Japanese: report of eight cases. *Mod Rheumatol*. 2011 Aug;21(4):391-6. Epub 2011 Jan 21. (査読有)
- ⑩ Ohyabu C, Morinobu A, Sugiyama D, Saegusa J, Tanaka S, Morinobu S, Tsuji G, Kasagi S, Kawano S, and Kumagai S. Plasma platelet derived microparticles in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol*. 2011, 38(4):680-4. (査読有)
- ⑪ Mamehara A, Sugimoto T, Sugiyama D, Morinobu S, Tsuji G, Kawano S, Morinobu A, and Kumagai S. Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J Med Sci*. 2010 Sep 30;56(3):E98-107. (査読有)
- ⑫ Kuroki Y, Kaji H, Kawano S, Kanda F, Takai Y, Kajikawa M, and Sugimoto T. Prospective short-term effects of glucocorticoid treatment on glucose and lipid metabolism in Japanese. *Intern Med*. 2010; 49(10):897-902. (査読有)
- ⑬ Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, Honjo T, Morinobu A, Hatachi S, Shimatani K, Tanaka Y, Minato N, and Kumagai S. Anti-PD-1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 micel. *J Immunol*. 2010; 84(5):2337-47. (査読有)
- ⑭ マイクロ RNA 調節からみた関節リウマチ病態の理解. 河野 誠司. 自己抗体と自己免疫' 10. 29-34, 2010 (査読無)

- ⑮ 関節リウマチにおける microRNA の意義と役割. 河野 誠司, 中町 祐司, 熊谷 俊一. リウマチ科. 44, 105-11, 2010 (査読無)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Kawano S. miR-124 as a key regulator of proliferation and MCP1 secretion in synoviocytes from RA patients. The 12th Congress of Advances in Target Therapies. 2010 年 4 月 16 日 Pullman Cannes Mandelieu Royal Casino Ex Sofitel, Mandelieu, France
- ② 河野 誠司, 中町 祐司, 熊谷 俊一. 自己免疫疾患の診断の進歩 マイクロ RNA と自己免疫疾患. 第 58 回日本臨床検査医学会総会. 2011 年 11 月 19 日. 岡山市、岡山コンベンションセンター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 1 件)

名称: MICRO RNA ASSOCIATED WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

発明者: seiji Kawano, yuji nakamachi

権利者: Kobe university

種類: United states patent

番号: US8, , 324, 183

取得年月日: 2012/12/4

国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 誠司 (KAWANO SEIJI)

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号: 20351512

### (2) 研究分担者

中町 祐司 (NAKAMACHI YUJI)

神戸大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号: 80379429

笠木 伸平 KASAGI SHIMPEI)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号: 84057051