

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591436

研究課題名(和文) マイクロRNAによる新規関節リウマチ治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the novel therapy for rheumatoid arthritis by microRNA.

研究代表者

中町 祐司 (Nakamachi, Yuji)

神戸大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：80379429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスコラーゲン誘導性関節炎(CIA)モデルを用い、miR-124前駆体を全身投与し、関節炎が抑制されるか否かを検討した。その結果、miR-124投与群は対照群と比較して四肢の関節腫脹や関節骨破壊を抑制した。また、miR-124は破骨細胞への分化に重要な転写因子NFATc1蛋白の発現を直接的に抑制することで破骨細胞への分化を抑制し骨破壊を抑制することを見出した。これらによりmiR-124前駆体を用いた関節リウマチの新たな治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility of microRNA-124 precursor as a useful therapeutic drug for the treatment of rheumatoid arthritis. We used the mouse collagen induced arthritis (CIA) model. We found that intravenous injection of miR-124 precursor suppressed mouse CIA demonstrated by reduction of bone destruction. Moreover, we found that miR-124 suppressed the osteoclast differentiation by directly inhibiting the expression of NFATc1 which is the critical transcription factor for osteoclast differentiation. In conclusion, we propose that miR-124a is a future candidate of therapeutic agent for human rheumatoid arthritis.

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

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)は全身性の疾患であり、その病態は炎症性細胞の関節への浸潤、炎症性サイトカインや MCP-1 などのケモカインの異常増加、関節滑膜細胞の炎症性増殖とそれに伴う関節破壊である。RA の発症は遺伝的素因に環境因子が関与していると考えられているがその病因は不明である。

治療においては、従来からの抗リウマチ薬の治療では関節炎の進行を完全に抑制することができず、無効例も多く見られる。また生物製剤においても無効例あるいは効果減弱例が認められること、高額な治療費を必要とすることや治療に至り生物製剤を中止することのできる患者はわずか 2 割程度であることなど問題点が多い。よって、RA の病因を明らかにし、新たな治療法を開発する必要がある。

近年発見されたマイクロ RNA は、メッセンジャー RNA(mRNA)から蛋白への翻訳抑制や mRNA の不安定化をきたす重要な分子である (Carthew RW, et al. Cell. 2009, 136:642-655.)。また多くの発生、分化、増殖や代謝を制御することが知られている (Krutzfeldt J et al. Nat Genet. 2006 Suppl:S14-9. Review)。さらに、マイクロ RNA を用いた創薬の可能も期待されている (Edwards JK et al. J Cardiovasc Transl Res. 2010;3:271-279.)。

われわれは、RA 滑膜細胞と変形性関節症(OA)滑膜細胞の micro RNA を解析した結果、RA で唯一発現が低下している miR-124a を同定した。さらに miR-124a は CDK2、CDK6 蛋白の発現を抑制し細胞増殖を抑制すること、また RA 滑膜細胞からの MCP-1 やアンジオジェニンの産生を抑制することを見出し、RA 滑膜細胞では miR-124a の発現低下が RA の病態に促進的に作用していることを明らかにした(Nakamachi Y, Kawano S, et al, Arthritis Rheum. 2009;60:1294-1304)。次に、miR-124(ヒトの miR-124a に相当)前駆体をラットアジュバンド関節炎モデルの右下肢踵関節局所に投与した結果、miR-124 投与群は対象群に比較し四肢の関節炎の抑制が認められた。また非関節炎誘導ラットで miR-124 投与群と対象群を比較した結果、両群の体重に変化は見られず、miR-124 を投与した全身的影響は認められなかった。

しかし、関節局所への投与では治療法としては限定されることから実用化にむけては全身投与の検討が必須であった。

2. 研究の目的

RAはわが国において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。主に中・壮年層に罹患し関節痛・関節変形による ADL・QOL の低下は、経済的損失とも相俟って医学的にも社会的にも重要な疾患である。

本研究は、マウスコラーゲン誘導性関節炎

(CIA)モデルで miR-124 前駆体を全身投与し関節炎を抑制するか否か、抑制する場合はその機序を研究することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 関節炎の誘導

関節炎は 8-10 週のオス DBA/1 マウスに *Mycobacterium tuberculosis* 含有不完全 Freund アジュバンドとタイプ コラーゲンを添加したエマルジョンを day0 に尾根部に、day28 に LPS を腹腔内投与し関節炎を誘導した。

(2) miR-124 前駆体の投与

Day27 に 30 μ M の miR-124 前駆体または対照 miRNA 前駆体と等量の核酸運搬体:アテロジーン(高研)混合液を 100 μ L 尾静脈より投与した。

(3) 関節炎の評価

4 肢の関節の腫脹を 1 肢あたり 0=関節の発赤、腫脹なし 1=関節の発赤またはわずかな腫脹 2=関節の軽度の腫脹 3=関節の中度の腫脹 4=関節の高度の腫脹の 5 段階、1 匹あたり最高 16 点で評価した。

また、day45 に屠殺しマイクロ CT で骨破壊の状態を検討した。

(4) miR-124 の NFATc1 蛋白発現へあたる影響の検討

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に miR-124 前駆体を導入し、100ng/ml の RANKL で 48 時間刺激後、蛋白を抽出しウエスタンブロット法で検討した。

(5) miR-124 によるヒト単球の破骨細胞分化への影響の検討

ヒト抹消血から分離した CD14 陽性細胞に miR-124 前駆体、miR-124a 前駆体または対照 miRNA 前駆体を導入し、M-CSF 50ng/ml と RANKL 100ng/ml で刺激後、TRAP 染色を行い破骨細胞への分化の影響を検討した。

(6) ルシフェラーゼアッセイ

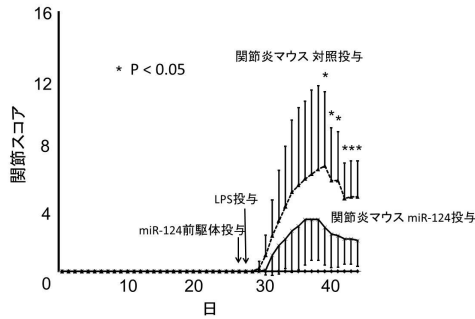
ヒト NFATc1 3' 非翻訳領域に対する miR-124 と miR-124a の影響を検討するためにヒト NFATc1 の 3' 非翻訳領域をルシフェラーゼ発現ベクターに挿入し、E11 細胞にこのベクターと miR-124 前駆体、miR-124a 前駆体や対照 miRNA 前駆体を導入し、ルシフェラーゼ活性を測定し検討した。

4. 研究成果

(1) miR-124 は関節炎を抑制する

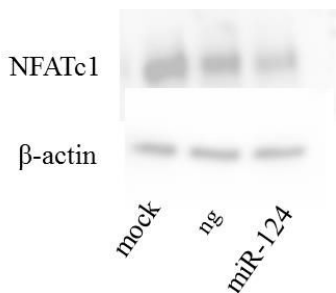
miR-124 前駆体を関節炎マウスに全身投与した結果、対照群と比較して有意に関節炎を抑制した。なお、miR-124 投与関節炎マウス群と対照投与関節炎マウス群で体重の変化に差は見られなかった。

マイクロ CT で骨破壊の程度を比較した。骨表面面積/骨体積は miR-124 投与群は対照群と比較して有意に低下し、miR-124 投与群は骨浸食は抑制されていた。また骨密度(骨体積/骨組織体積)は miR-124 投与群は対照群と比較して有意に高値であった。



(2)miR-124 はマウスマクロファージ細胞株の NFATc1 の発現を抑制する。

破骨細胞の分化に重要な転写因子 NFATc1 の発現に miR-124 が関与しているかを検討した結果、miR-124 は NFATc1 の発現を抑制した。



(3)miR-124、miR-124a はヒト破骨細胞の分化を抑制する。

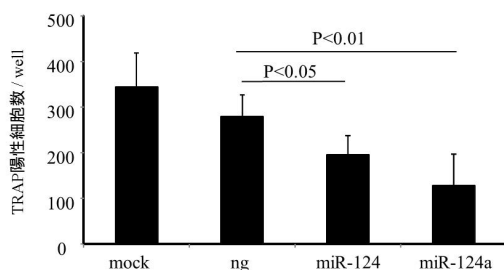
ヒト単核球に M-CSF と RANKL 刺激下で培養を行い検討した結果、miR-124 前駆体や miR-124a 前駆体は破骨細胞への分化を抑制した。

(4)miR-124 と miR-124a は直接ヒト NFATc1 の発現を抑制する。

ヒト NFATc1 3' 非翻訳領域をルシフェラーゼベクターに挿入し miR-124 や miR-124a の影響を検討した結果、対照群に比較して有意にルシフェラーゼ活性の低下がみられ、miR-124 や miR-124a は直接 NFATc1 に作用することが明らかになった。

(5)まとめ

マウス CIA モデルに miR-124 前駆体を投与した結果、関節炎や骨破壊の抑制が認められた。また miR-124 は破骨細胞の分化に重要な転写因子 NFATc1 の蛋白の発現を直接的に抑制し、破骨細胞への分化を抑制した。これらより miR-124a は RA の新たな治療薬の可能性が示唆された。



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 12 件)

1. Matsuo K, Morioka I, Oda M, Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Yamada H, Iijima K. Quantitative Evaluation of Ventricular Dilatation using Computed Tomography in Infants with Congenital Cytomegalovirus Infection. *Brain Dev.* 2014;36:10-5. (査読有)
2. Yamamoto K, Yakushijin K, Nakamachi Y, Miyata Y, Sanada Y, Tanaka Y, Okamura A, Kawano S, Hayashi Y, Matsuoka H, Minami H. Extramedullary T-lymphoid blast crisis of an ETV6/ABL1-positive myeloproliferative neoplasm with t(9;12)(q34;p13) and t(7;14)(p13;q11.2). *Ann Hematol* 2013. (査読有)
3. Yamamoto K, Yakushijin K, Okamura A, Ueda S, Nakamachi Y, Kawano S, Matsuoka H, Minami H. Hyperdiploidy and duplication of der(11)ins(10;11)(p12;q23q14) in acute myeloid leukemia with MLL/MLL10 fusion gene. *Leuk Lymphoma.* 2013;54:2055-8. (査読有)
4. Takenokuchi M, Kawano S, Nakamachi Y, Sakota Y, Syampurnawati M, Saigo K, Tatsumi E, Kumagai S. FLT3/ITD associated with an immature immunophenotype in PML-RAR leukemia. *Hematol Rep.* 2012;19; e22. (査読有)
5. Yamamoto K, Nakamachi Y, Yakushijin K, Miyata Y, Okamura A, Kawano S, Matsuoka H, Minami H. A novel TRB@/NOTCH1 fusion gene in T-cell lymphoblastic lymphoma with t(7;9)(q34;q34). *Eur J Haematol* 2012; 90:68-75 (査読有)
6. 福島美野子、山本哲志、浄慶幸江、迫田 裕之、澤田裕子、五百蔵守、中町祐司、林伸英、河野誠司. 非接触型静脈可視化装置「StatVein(スタットベイン)」を用いた基礎的検討 -超音波診断装置での評価と表示モードの差について- *機器・試薬* 2012;35; 949-951 (査読無)
7. Kawano S, Nakamachi Y. The Role of miRNA in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatoid Arthritis - Etiology, Consequences and Co-Morbidities* 2011 (査読無)
8. Jauharoh SN, Saegusa J, Sugimoto T, Ardianto B, Kasagi S, Sugiyama D, Kurimoto C, Tokuno O, Nakamachi Y, Kumagai S, Kawano S. SS-A/Ro52 promotes apoptosis by regulating Bcl-2 production. *Biochemical and Biophysical*

Research Communication

2012;417:582-7(査読有)

9.野口依子,中町祐司,大藪智奈美,菊間知恵,長谷川大一郎,山下達也,西山将弘,小阪嘉之,河野誠司.小児に発症したt(16;21)(q24;q22)を伴う急性骨髄性白血病.臨床血液 2011;52:1893-1895(査読有)

10.Yamamoto K, Nakamachi Y, Yakushijin K, Funakoshi Y, Okamura A, Kawano S, Matsuoka H, Minami H. Expression of the novel NUP98/PSIP1 fusion transcripts in myelodysplastic syndrome with t(9;11)(p22;p15).Eur J Haematol 2011;244-24(査読有)

11.嘉納由美子,中町祐司,木下承皓,河野誠司.Transcription Reverse transcription Concerted Reaction (TRC)法を用いた結核菌群および mycobacterium avium complex 検出試薬の評価.医学検査 2011;60:922-926(査読有)

12.Kawano S, Nakamachi Y, miR-124a as a key regulator of proliferation and MCP1 secretion in synoviocytes from RA patient. Ann Rheum Dis 2011;70:i88-92(査読無)

[学会発表](計22件)

1.山下智江,小林曜子,野口依子,菊間知恵,城尾可奈,松本久幸,岡崎葉子,東口佳苗,中町祐司,林伸英,河野誠司.TKI投与中にBCR/ABL1 kinase domainの点突然変異を認めたピリミジン拮抗剤による二次性Ph陽性白血病の1症例.第60回日本臨床検査医学会,2013年11月2日.神戸市

2,岡崎葉子,中町祐司,野口依子,城尾可奈,林伸英,柴田暁男,森岡一郎,飯島一誠,河野誠司.新生児電撃性紫斑病を発症した複合ヘテロ接合体プロテインC欠損症の一症例.第56回日本臨床検査医学会近畿支部総会.2013年10月19日.福井市

3.Yamamoto K, Yakushijin K, Nakamachi Y, Miyata Y, Sanada Y, Iwamoto Y, Okamura A, Murayama T, Kawano S, Hayashi Y, Matsuoka H, Minami H, Extramedullary T-lymphoid crisis of ETV6/ABL1-positive myeloproliferative neoplasm with t(7;14),第75回日本血液学会学.2013年10月12日.札幌市

4.Saito A, Hasegawa D, Noguchi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Mori T, Miyata K, Ochi S, Kozaki-Tanaka A, Ishida T, Kawasaki K, Keizo H, Tsuzuki S, Seto M, Kosaka Y. Genomic aberrations identified using whole-genome cytogenetic arrays in monozygotic twins with t(12;21) acute lymphoblastic leukemia.第75回日本血液学会学術集会.2013年10月12日.札幌市

5.山下智江,松本久幸,野口依子,菊間知恵,城尾可奈,岡崎葉子,中町祐司,河野誠司,ETV6/ABL 変異を認めた好酸球増多を伴う

骨髄増殖性腫瘍の一症例.第62回日本臨床医学検査学会.2013年5月18日.高松市

6.中町祐司,林伸英,木下承皓,田中一志,伊藤光宏,荒川創一,藤澤正人,河野誠司.文部科学省科学技術戦略推進費「地域再生人材創出拠点の形成」事業 医師・コメディカル総合人材育成拠点形成 エキスパート・コメディカル育成プログラムについて.第55回日本臨床検査医学会近畿支部総会,2012年,12月1日.京都市

7.小林曜子,中町祐司,山下智江,野口依子,城尾可奈,岡崎葉子,松本久幸,菊間知恵,東口香苗,林伸英,河野誠司.先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症における症候性と無症候性の判別の検討.第59回日本臨床検査医学会.2012年11月30日.京都市

8.中町祐司.遺伝子検査の実践-Primer-Prob の設計から結果の確認まで-.ロシユ遺伝子セミナー,2012年11月17日.大阪市

9.森健,柴田暁男,香田翼,三輪明弘,横田知之,森岡一郎,河野誠司,中町祐司,岡崎葉子,加藤威,神吉直宙,平瀬敏志,山本暢志,久保川育子,矢内友子,早川晶,横山直樹,飯島一誠.電撃性紫斑病にて発症した先天性Protein C欠損症の新生児例.第54回小児血液・がん学会.2012年12月1日.横浜市

10.ISHIDA T, HASEGAWA D, YAMASHITA T, TANAKA A, KAWASAKI K, NAKAMACHI Y, KAWANO S, KOSAKA Y, Imatinib followed by second allogeneic HSCT for relapse of Ph+ALL after the first transplantation,第74回日本血液学会 2012年10月20日.京都市

11.Yamamoto k, Nakamachi Y, Yakushijin K, Kakiuchi S, Inui Y, Kawamori Y, Okamura A, Murayama T, Itoh T, Kawano S, Matsuoka H, Minami H. A novel TRB@/NOTCH1 fusion gene in T-cell lymphoblastic lymphoma with t(7;9)(q34;q34).第74回日本血液学会.2012年10月20日.京都市

12.小林曜子,中町祐司,野口依子,菊間知恵,城尾可奈,松本久幸,岡崎葉子,t(7;9)(q34;q34)をもつT細胞性リンパ芽球性リンパ腫における新規TCR@/NOTCH1融合遺伝子.第52回日臨技関西支部医学検査学会.2012年9月29日.白浜市

13.岡崎葉子,中町祐司,野口依子,城尾可奈,林伸英,柴田暁男,森岡一郎,飯島一誠,河野誠司.新生児電撃性紫斑病を発症した先天性プロテインC欠損症の一症例.第13回日本検査血液学会.2012年7月28日.高槻市

14.岡崎葉子,中町祐司,野口依子,城尾可奈,林伸英,柴田暁男,森岡一郎,飯島一誠,河野誠司,新生児電撃性紫斑病を発症した先天性プロテインC欠損症の一症例.第97回近畿血液学地方会.2012年6月23日.大阪市

15.Jauharoh SN, 三枝淳,笠木伸平,杉山大典,栗本千代,中町祐司,信原由美子,杉本健,森信曉雄,熊谷俊一,河野誠司.自己抗原SS-A/Ro52はBcl-2の発現を低下させること

により細胞のアポトーシスを促進する.第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会.2012 年 4 月 27 日.東京

16.内藤記子.中町祐司.城尾可奈.野口依子.大藪智奈美.林伸英.河野誠司.当院で実施したアンチトロンビン遺伝子変異検査について.第 58 回日本臨床検査医学会 2011 年 11 月 19 日.岡山市

17.山下智江.小林曜子.菊間知恵.岡崎葉子.東口佳苗.中町祐司.林伸英.河野誠司.活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)3 試薬の比較検討.第 58 回日本臨床検査医学会.2011 年 11 月 18 日.岡山市

18.小林曜子.中町祐司.城尾可奈.河野誠司.流産に合併した静脈血栓にて発見された Protein S Tokushima (K196E)変異の一症例.第 54 回日本臨床検査医学会近畿支部総会.2011 年 10 月 29 日.大津市

19.Kikuma T, Yamamoto K, Funakoshi Y, Yakushijin K, Shimomura D, Oono Y, Kawakami F, Itoh T, Nakamachi Y, Kawano S, Matsuoka H, Minami H.A new case of acute prpmyelocytic leukemia with NPM/RARA fusion gene. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 15 日.名古屋市

20.Tanaka A,Hasegawa D, Noguchi Y, Nakamachi Y, Oyabu C, Kikuma T, Miyata K, Yamashita T, Ishida T, Kawasaki K, Kawano S, Kosaka Y. Acute myeloid leukemia with t(16;21)(q24;q22) and the gene analysis of the chromosomal aberration. 第 73 回日本血液学会学術集会.2011 年 10 月 15 日.名古屋市

21.Yamamoto k, Nakamachi Y, Yakushijin K, Funakoshi Y, Kawamori Y, Inui Y, Okamura A, Murayama T, Kawano S, Matsuoka H,Minami H. Expression of novel NUP98/PSIP1 fusion transcripts in myelodysplastic syndrome with t(9;11)(p22;p15).第 73 回日本血液学会学術集会.2011 年 10 月 15 日.名古屋市

22.宮田憲二.長谷川大一郎.水田麻雄.山下達也.田中愛子.石田敏章.川崎圭一郎.中町祐司.河野誠司.小阪嘉之.単一施設におけるフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病の治療成績第 53 回日本小児血液・がん学会.2011 年 11 月 26 日.前橋市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6.研究組織
(1)研究代表者
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

(2)研究分担者
河野 誠司 (KAWANO SEIJI)
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：20351512

(3)連携研究者
()

研究者番号：