

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591440

研究課題名(和文) miRNAによる関節リウマチ滑膜細胞リプログラミングの誘導

研究課題名(英文) Reprograming of rheumatoid synovial cell function by miRNA

研究代表者

山崎 聡士 (Yamasaki, Satoshi)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：30367388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜細胞の機能変換をもたらすサイトカインTGFで誘導されるマイクロRNA、その標的分子である分泌蛋白を同定した。この分泌タンパク質は滑膜細胞が分泌するとともに、パラクラインとして滑膜細胞に作用し、これが分泌する骨再生阻害因子を顕著に誘導することを確認した。すなわち、TGFが特有のmiRNAの発現亢進を介して、滑膜細胞が病変部位で産生している骨再生阻害因子を抑制するという経路が解明された。この結果は、関節リウマチで破壊された関節骨の再生を促進するプロセスに寄与している可能性が示唆されるとともに、これを標的とした関節骨破壊の修復を目指した治療法開発へとつながる可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：We identified miRNAs, which are induced in fibroblastic synovial cell from a patient with rheumatoid arthritis by treatment with TGFbeta1, a cytokine produced from immune cells. One of the miRNAs targets a transcript of secreted protein, which can be secreted from fibroblastic synovial cell. This implies that a miRNA induced by TGFbeta1 can reduce the secreted protein expression in rheumatoid arthritis. Since the secreted protein is involved in osteoblastogenic process, the miRNA is thought to contribute to osteoblast function in the disease. Namely, a method that regulate this miRNA may leads to enhancement of the bone regeneration process in destructed articular bone in rheumatoid arthritis.

研究分野：医歯薬学

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：リウマチ学 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) TGF β は、TNF と同様コラーゲン誘導関節炎モデルにおける関節炎促進因子として知られている。しかし、TNF と比較してその関節リウマチ滑膜細胞に対する意義の解明は遅れている。関節リウマチにおいて滑膜に浸潤しているリンパ球の影響を解明する際に、TGF β の滑膜細胞に対する作用の解明は不可欠である。

(2) miRNA は、関節リウマチにおいても、その病態に関与するという miRNA の報告が相次ぎ、特に miR-146 は関節リウマチに重要な役割を果たしていることが明らかになった。このように、miRNA を介した経路を解析することにより、関節リウマチの未知の病態メカニズムの解明につながる事が期待される。

2. 研究の目的

(1) 関節リウマチ滑膜細胞への TGF β の影響に関する網羅的データを起点として、炎症、細胞増殖、細胞運動、細胞分化などの新たな機序解明に迫る。

(2) miRNA を介する新たな TGF β シグナル経路の同定を試みる。

(3) TGF β 誘導性 miRNA、そしてその標的 mRNA の同定から、新たな RA 病態関連因子の発見と、これを用いた新たな関節リウマチ治療戦略への展開が可能なるシーズを見いだす。

3. 研究の方法

(1) 滑膜細胞を TGF β で刺激し、これにより誘導される miRNA を Array 解析し、TGF β 誘導性の miRNA 候補を同定する。サンプルは、TGF β で刺激した滑膜細胞の全 miRNA と、TGF β で刺激した滑膜細胞から Argonaute2 と結合している miRNA をエンリッチしたサンプルを用いておこなう。

(2) 滑膜細胞における TGF 誘導性 miRNA の標的 mRNA の同定を以下の 3 つの方法で行った。

TGF β 誘導性 miRNA の標的 mRNA を同定する目的で、核酸配列情報からの予測を、miRNA 表的予測ソフトである microRNA.org

(<http://www.microRNA.org/microRNA/home.do>) にて検索する。

TGF β 刺激を行った滑膜細胞の RNA サンプルを用いて、DNA array を行う。TGF β によって変動する、特に減少する遺伝子をスクリーニングする。これらの遺伝子は、TGF β シグナルの下流に位置する mRNA のうち、TGF β により誘導される miRNA によって発現が阻害される分子の候補である。

の確認と整合性の検証を行い、TGF β 刺激をした滑膜細胞でおこりうる、TGF β

miRNA 標的 mRNA の経路として有力な候補の同定を行う。

(3) TGF β 誘導性 miRNA の標的分子と予想される分子、とその分子によってもたらされる効果を予測するため、転写産物や蛋白発現検討を real time PCR, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)、ウェスタンブロットングにて行う。

4. 研究成果

(1) 滑膜細胞を TGF β で刺激し、これにより誘導される全 RNA を用いた miRNA Array 解析により、顕著に誘導された miRNA を 6 種類同定した。

さらに滑膜細胞を TGF β で刺激し、Argonaute2 との結合した状態で顕著に細胞内に存在する miRNA を 4 種類同定した。

これら 2 つのデータに共通して同定された miR424 を TGF によって誘導され、さらに miRNA マシナリーに使用される TGF β 作動性 miRNA と定義した。

(2) TGF 誘導性 miRNA である miR424 の標的 mRNA を microRNA.org にて検索し、767 遺伝子が予測標的遺伝子として同定された。

(3) TGF β で刺激した滑膜細胞 RNA サンプルを用いた DNA array によって、TGF β によって減少する遺伝子のスクリーニングをおこない、以下の変動遺伝子を同定した。

12.5%以下に低下 40 遺伝子

25%以下に低下 150 遺伝子

50%以下に低下 820 遺伝子

これらの遺伝子は、TGF β miRNA シグナルの下流に位置し、miRNA と逆相関して変動すると考えられ、本研究の目的候補遺伝子を含むと想像される。

(4) (3)でえられた 1100 の TGF によって滑膜細胞で減少する遺伝子のパスウェイ解析を行った。その結果 miR424 の標的分子が存在しているパスウェイの存在が確認された。主なものとして、血管新生、アミノ酸代謝経路、2型インターフェロン経路、TGF β 経路、破骨細胞関連、糖鎖修飾関連、炎症経路、接着分子、軟骨内骨化、胆汁酸代謝、などのパスウェイが関与している事が想定され、これらの経路のなかに、TGF β miRNA 標的 mRNA の経路で制御されうる分子が存在していると予測される。

(5) 2013年に miR424 と、これとは別に同定された TGF β 誘導性 miRNA である miR503 が協調して fibroblast growth factor (FGF)-2 とこれの受容体である FGF 受容体の両遺伝子を標的として、これらの発現を低下させる事が報告された (Kim J et al. Nat Med. 2013; 19: 74-82.)

FGF2 は、TGF β 誘導性 miRNA である miR424

の標的 mRNA の microRNA.org によるヒット 767 遺伝子の中でも、ハイスコアでヒットする遺伝子である。

これらの知見から、TGFβ miRNA (miR424, miR503) 標的 mRNA (FGF2, FGFR1) の経路の成立が確認された。FGF2 は TGFβ によって滑膜細胞よりその分泌が誘導される事が知られているが (Thomas JW, et al. Arthritis Rheum. 2000; 43: 2152-9.), 今回の発見はこれに対するネガティブフィードバックメカニズムである事が予想される。

(6) TGFβ は骨芽細胞の分化において重要な機能を果たしている事が知られている。骨芽細胞の機能制御は、関節リウマチにおける破壊された関節骨の修復を目的とした場合、極めて重要である。そこで、滑膜細胞に対する TGFβ の作用の観点から解析を進めた。そのなかで、骨芽細胞分化抑制の液性因子 X1, X2, X3 に対する TGFβ あるいは FGF の効果を解析した。その結果骨芽細胞分化抑制因子 X3 の発現が FGF により他のサイトカインと比較して劇的に変動する事が判明した (図 3)。

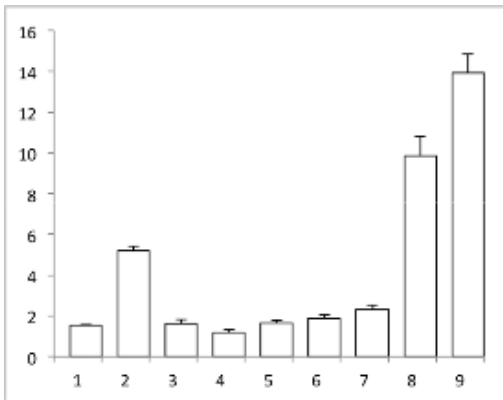


図 1 : サイトカインによる滑膜細胞からの骨芽細胞分化抑制因子 X3 の分泌誘導

1: 無刺激, 2: TNF, 3: IL-6+IL-6 受容体, 4: IL-17A, 5: TGFβ, 6: IFN, 7: IFN, 8: FGF1, 9: FGF2. TNF と FGF1, 2 が骨芽細胞分化抑制因子 X3 を誘導している。特に FGF1, 2 の効果が強い。一方、TGFβ は影響を及ぼさない。

前述の通り、TGFβ は miR424, miR503 を介して FGF を抑制する事が知られているため、TGFβ は間接的に FGF の発現抑制を介して骨芽細胞分化抑制因子 X3 を抑制する事が予想される。今回の測定では TGFβ による X3 の抑制は観察されていない。

(7) (1)-(6) の研究により、TGFβ miRNA (miR424, miR503) 標的 mRNA (FGF2, FGFR1) の経路に加え、その下流で骨芽細胞分化抑制因子 X3 が制御されうる事を見いだす事ができた。X3 は TGFβ によりその発現が抑制される事が、我々独自の DNA array 解析でも確認

されており、TGFβ と X3 をつなぐ経路として上記経路の整合性はとれている。

さらに、FGF による骨芽細胞分化抑制因子 X3 の発現制御の解析を行った (図 2)。

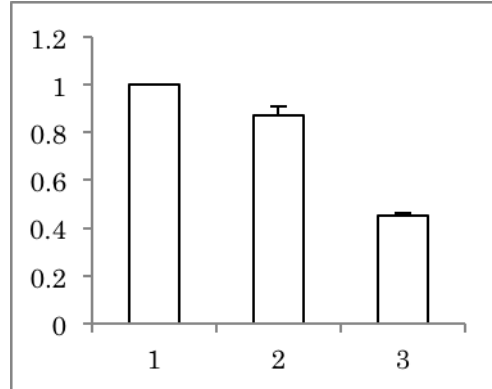


図 2 : FGF による滑膜細胞からの骨芽細胞分化抑制因子 X3 の mRNA 発現抑制

1: 無刺激, 2: FGF1, 3: FGF2. TNF と FGF1, 2 が骨芽細胞分化抑制因子 X3 の mRNA の発現を real time PCR により定量した。無刺激の状態と比較して、FGF1, FGF2 ともに X3 の mRNA 発現を抑制している。

その結果、蛋白レベルでは誘導しているにもかかわらず、mRNA レベルでは FGF1, FGF2 ともに骨芽細胞分化抑制因子 X3 の発現を抑制している事が判明した。これは FGF による X3 発現の制御が、mRNA レベルでは抑制されているが、翻訳レベルでは促進している事を示している。ここにおいて、miRNA を含む新たな転写後制御のメカニズムが寄与している事が想像され、より複雑な制御の存在が予想される。

(8) 滑膜細胞による骨芽細胞の制御において、TGFβ miRNA (miR424, miR503) の経路を介したメカニズムの存在の可能性を示す事に成功した (図 3)。

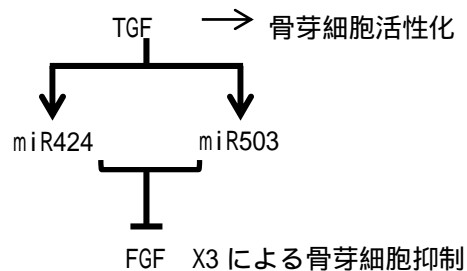


図 3 : miRNA を介した TGFβ 経路

TGFβ は骨芽細胞活性化因子として知られている。本研究により、miRNA を介した TGFβ 経路により、X3 による骨が細胞抑制経路を阻害し、より骨芽細胞形成を促進するメカニズムが予想される。

この経路により、破壊された関節骨の再生に関連する分子の動きの一端を解明する事が

でき、この経路を標的とした治療法の開発の可能性も期待される。一方で、miRNA を介した経路においてはmiRNA と標的分子との関連において膨大な多様性を有している点で、解析の困難さが生じることも明らかとなった。

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 1 件)

Okada A, Yamasaki S, Koga T, Kawashiri SY, Tamai M, Origuchi T, Nakamura H, Eguchi K, Kawakami A. Adipogenesis of the mesenchymal stromal cells and bone oedema in rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol (査読あり), 30, 2012:332-7. <http://www.clinexprheumatol.org/pubmed/find-pii.asp?pii=22325242>

[学会発表](計 5 件)

山崎聡士、遠藤功二、熊谷和彦、野島崇樹、杉山英二：脂肪分化誘導による滑膜細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制。第 41 回日本臨床免疫学会総会，海峡メッセ下関，2013 年 11 月 27 日，山口市。

Satoshi Yamasaki, Kazuhiko Kumagai, Kouji Endo, Takaki Nojima and Eiji Sugiyama : Changes in MMPs in Fibroblast-Like Synoviocytes Following Adipogenesis 79th American College of Rheumatology, San Diego Convention Center, San Diego, USA, October 25-30, 2013.

山崎聡士、岡田覚丈、遠藤功二、大岩 寛、野島崇樹、熊谷和彦、川上 純、杉山英二。脂肪分化誘導による滑膜細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制 (ポスター) 第 57 回日本リウマチ学会総会学術集会 2013 年 4 月 18 日(木)~20 日(土) 京都国際会館、京都。

鈴木貴久、山崎聡士、中島好一、寶來吉朗、岡田覚丈、川尻真也、岩本直樹、一瀬邦弘、玉井慎美、有馬和彦、中村英樹、折口智樹、植木幸孝、川上 純：関節リウマチ (RA) 患者の滑膜における transforming growth factor 1(TGF- 1) による thrombospondin-1(TSP-1) 産生機構の検討：TSP-1 を含む血清免疫複合体がなぜ RA 患者で認められるのか。第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 22 回国際リウマチシンポジウム，国立京都国際会館，2013 年 4 月 18-20 日，京都市

山崎聡士、岡田覚丈、一瀬邦弘、中村英樹、川尻真也、玉井慎美、鈴木貴久、折口智樹、川上 純。滑膜細胞における Kruppel-like

factor 4 の機能解析。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 21 回国際リウマチシンポジウム，2012 年 4 月 26-28 日，グランドプリンスホテル新高輪，東京。

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 聡士 (YAMASAKI Satoshi)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：30367388

(2)研究分担者

杉山 英二 (SUGIYAMA Eiji)

広島大学・病院・教授

研究者番号：70179167

川上 純 (KAWAKAMI Atsushi)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90325639