

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591443

研究課題名(和文) microRNAを標的とした関節リウマチの新規治療法開発と新病態機序解明への挑戦

研究課題名(英文) microRNA as a target to develop a novel treatment for rheumatoid arthritis and to clarify a new pathology in rheumatoid arthritis

研究代表者

宮坂 信之 (Miyasaka, Nobuyuki)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：30157622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ(RA)の新規治療法開発を目指し、RA滑膜線維芽細胞(RASF)においてMMP-3とIL-6の発現を制御するmicroRNA(miRNA)とその標的遺伝子を同定し、RAでの作用機序解明を目標とした。miRNA阻害剤libraryを用いて、miR-AとmiR-Bの阻害剤がTNF-a存在下で培養したRASFからのMMP-3産生を抑制し、さらにmiR-A阻害剤がIL-6産生も抑制することを見出した。miRデータベースから、miR-AとmiR-Bの標的遺伝子として転写抑制因子Xを推定し、実際miR-A又はmiR-B阻害は、TNF-a存在下でのRASFのXタンパク発現の減少を抑制した。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel treatment for rheumatoid arthritis (RA), we set a goal to identify microRNAs (miRNA) that control the expression of MMP-3 and IL-6 from RA synovial fibroblasts (RASF) and to clarify the mode of action of the miRNAs in RA through the identification of target genes of the miRNAs.

By using a miRNA inhibitor library, we revealed that miR-A inhibitor and miR-B inhibitor suppressed the production of MMP-3 from RASF cultured with TNF-a, respectively. Additionally, miR-A inhibitor suppressed the production of IL-6 from RASF. Gene X, which is a transcription repression factor and suppresses MMP-3 expression, was presumed as the common target gene of miR-A and miR-B from miRNA database analysis. In fact, miR-A inhibitor or miR-B inhibitor suppressed the decrease of protein X expression from RASF cultured with TNF-a. We identified miRNAs that control the expression of MMP-3 and IL-6 from RASF. Inhibition of these miRNAs may be a novel therapeutic strategy for RA.

研究分野：膠原病・リウマチ内科

キーワード：関節リウマチ microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 関節リウマチに対する治療の現況と課題

関節リウマチ(RA)は、関節滑膜組織の炎症と増生により多関節炎と関節破壊を来す疾患であるが、疾患の発症や進展に関与する機序は依然不明な点が多い。近年、様々なサイトカインやそのシグナル伝達分子、免疫細胞を標的とした治療法の誕生により、RAの治療成績は飛躍的に向上した。しかし、治療抵抗例も存在し、またいずれの薬剤も易感染性を伴うなど、依然課題は多く、RAの病態生理学における新たな標的を対象とした安全性の高い新規治療法の開発が求められている。

### (2) 関節リウマチ治療における標的細胞

RAにおいて滑膜線維芽細胞は、炎症性サイトカインやプロテアーゼを産生し、他の免疫細胞を制御するなど、RAの病態の中心を担っている。従って、活性化した滑膜線維芽細胞を適切に制御することが可能となれば、免疫抑制を作用機序とする既存の薬剤とは異なる新規治療法となることが期待され、様々なアプローチにより滑膜線維芽細胞標的療法の開発が試みられている。我々の研究室でも、滑膜細胞の細胞周期抑制による滑膜増殖抑制と、炎症性メディエーターや骨軟骨破壊を担うプロテアーゼ産生抑制とによる、関節炎への治療効果を報告している(Taniguchi, Nat Med 1999. Nasu, J Immunol 2000. Nonomura, Arthritis Rheum 2006. Sekine, J Immunol 2008)。そして、滑膜細胞を標的とした治療は有効であるのみならず、免疫細胞やサイトカインを標的とした治療とは異なり易感染性の危険性が少なく、高い安全性が期待される。

### (3) 関節リウマチにおける micro RNA

microRNA (miRNA)は生体内に存在する約22塩基の内因性の non-coding RNAであり、複数の標的遺伝子の発現を主に転写後レベルで抑制することにより、様々な生理的・病的状態において重要な役割を担っている。近年、RAにおいても、患者の末梢血細胞や滑膜組織に発現するmiRNAとその標的遺伝子や役割についての報告が複数なされ、特定のmiRNAを標的とすることによる関節炎モデルマウスへの治療効果も報告されている。

しかし、これらの報告は、血球系細胞において既に発現や機能が報告されている特定のmiRNAや、網羅的発現解析でRAの組織・細胞において異常な発現レベルを示したmiRNAに着目し、阻害剤や過剰発現等による表現型の変化を解析した研究が大半であり、これらの手法ではRAの病態におけるmiRNAの役割の一端を解明できるにすぎない。また、異常な発現レベルを示したmiRNAの機能が必ずしも治療標的に結びつくものではない。RAの病態に関与し、治療標的となり得るmiRNAを同定するためには、単に

発現レベルに基づく解析ではなく、病態に大きく関わる特定の細胞機能に着目し、その機能を制御するmiRNAを網羅的手法にて同定するアプローチがより有効と考えられる。

本研究は、既存のmiRNA網羅的発現解析による限界点を、miRNA阻害剤 libraryを用いた網羅的機能解析法により解決し、RAを制御するmiRNAを標的とした新規治療法の可能性を明らかにする研究であると同時に、依然多くが未知であるRAの病態生理学における新たな分子メカニズム解明へのプレイクスルーとなる研究である。

## 2. 研究の目的

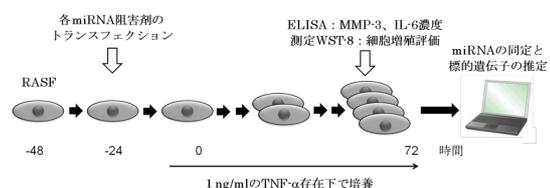
滑膜線維芽細胞におけるmiRNAを標的とした新規治療法の開発を目指し、RAの病態に関わる matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)と interleukin-6 (IL-6)の発現を制御するmiRNAを同定し、その作用機序を標的遺伝子の同定を通して明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) miRNA 阻害剤ライブラリーによる網羅的機能解析:

RA患者から樹立した滑膜線維芽細胞(RASF)株と924種類のヒトmiRNA阻害剤ライブラリー(miRCURY LNA™ microRNA Inhibitor Library-Human v.12.0, EXIQON)を使用した。RASF培養開始24時間後に、各miRNA阻害剤をRASFにそれぞれトランスフェクションした。さらにその24時間後より1 ng/mlのTNF-α存在下でRASFを72時間培養後、上清中のMMP-3とIL-6をELISAにて、また細胞増殖をWST-8法にて評価した。阻害剤によりMMP-3やIL-6の産生・細胞増殖を抑制したmiRNAはその標的遺伝子を推定し、タンパク発現に対するmiRNA阻害剤による影響を評価した(図1)。

図1



**(2) RASFの培養:** 5~10継代後のRASFを、 $4.0 \times 10^3$  cells/wellで96well plate上に、または $14.4 \times 10^4$  cells/dishで60mm dish上に播種し、培養した。

**(3) miRNA 阻害剤のトランスフェクション:** 各miRNA阻害剤は、Fugene HD (Roche)を用いて100 nMにてRASFにトランスフェクションした。

**(4) ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) :** 培養上清中の MMP-3 または IL-6 の濃度は、human MMP-3 DuoSet と human IL-6 DuoSet (R&D)を用いて測定した。

**(5) WST-8 法(細胞増殖 assay) :** RASF の増殖は、Cell Counting Kit-8(DOJINDO)を用いて評価した。

**(6) miRNA の標的遺伝子の推定 :** miRNA の標的遺伝子は、TargetScan (<http://www.targetscan.org>) と Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity)ソフトを用いて推定した。

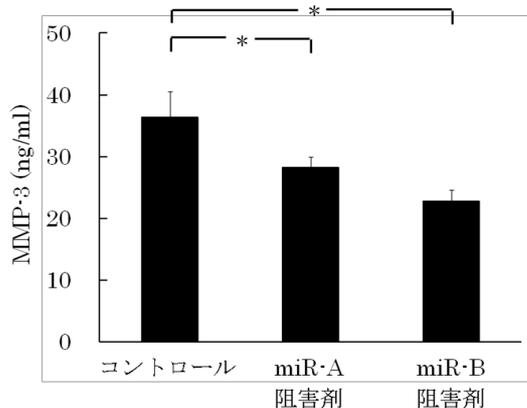
**(7) Western blotting :** RASF における標的遺伝子 X と  $\beta$ -actin のタンパク発現量は、抗 X 抗体(Aviva Systems Biology)と抗ラビット IgG HRP (Amersham Bio)、抗  $\beta$ -actin 抗体 (AC-15, SIGMA) と抗マウス IgG HRP (SouthernBiotech)を用いて定量した。

**(8) 統計解析 :** 一元配置分散分析にて有意差の有無を評価した後、各 2 群間の違いは F-test の結果に基づき、Student-t test にて評価した。各値は mean $\pm$ SD にて示した。

#### 4. 研究成果

**(1) miRNA 阻害剤ライブラリーによる網羅的機能解析で同定した miR-A と miR-B の阻害は RASF からの MMP-3 産生を抑制した**

図 2



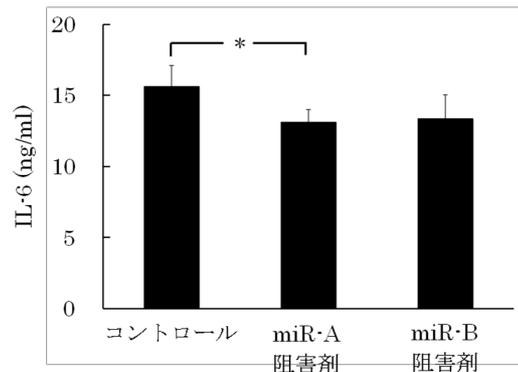
ELISA にて、RASF 培養上清中の MMP-3 濃度を測定したところ、miRNA 阻害剤ライブラリーによる網羅的機能解析より、TNF- $\alpha$  存在下で培養した RASF からの MMP-3 産生を抑制する miRNA 阻害剤が複数抽出された。それぞれの miRNA は、RA の病態に關与する可能性がある治療標的候補 miRNA と考えられた。

RASF からの MMP-3 産生を抑制するとし

て抽出された複数の miR 阻害剤のうち、miR-A 阻害剤と miR-B 阻害剤(都合により、実際の miR 番号は伏せさせていただきます)を、RASF からの MMP-3 産生をコントロールと比較して有意に減少させる miRNA として同定した。(図 2. n=4/群、\* : p<0.05)

**(2) miR-A の阻害は RASF からの IL-6 産生を抑制した**

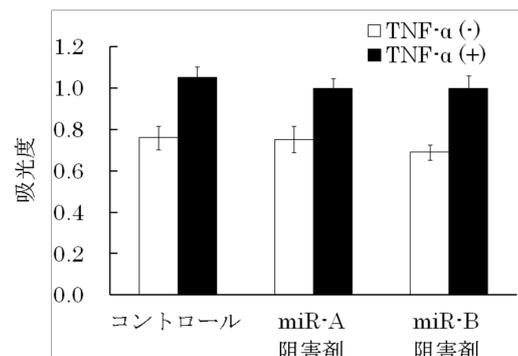
図 3



miR-A 阻害剤は、コントロールと比較し、TNF- $\alpha$  存在下で培養した RASF からの IL-6 産生を有意に減少させた。一方、miR-B 阻害剤による RASF からの IL-6 産生の抑制は認められなかった。(図 3. n=4/群、\* : p<0.05)

**(3) miR-A と miR-B の阻害は RASF の増殖を抑制しなかった**

図 4



WST-8 法により miR-A と miR-B の RASF の増殖阻害の有無を評価したところ、miR-A 阻害剤と miR-B 阻害剤は、TNF- $\alpha$  刺激の有無に関わらず、RASF の増殖に影響を与えなかった。(図 4. n=4/群)

**(4) miR-A と miR-B の標的遺伝子として遺伝子 X が推定された**

miR-A と miR-B の RA の病態における役割の機能解析のため、miR-A と miR-B の標的遺伝子を探索した。

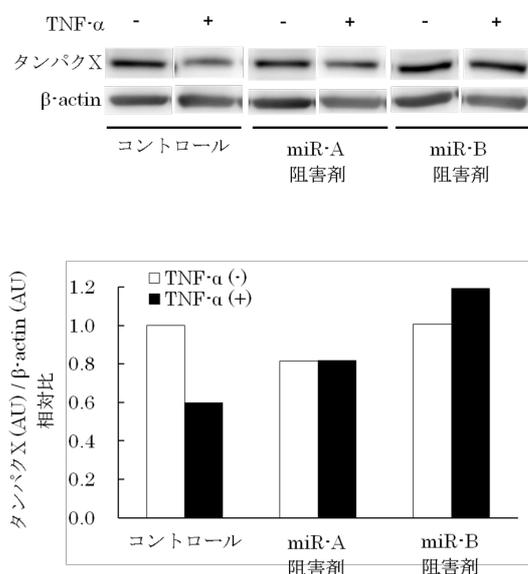
Ingenuity Pathway Analysis ソフトを用

いて、MMP-3 と IL-6 産生に対する直接的、または間接的な抑制因子を抽出した。その中で、miR-A と miR-B に相補的な seed sequence を持ち、標的遺伝子になりうる遺伝子を miRNA データベースの TargetScan を用いて検索した結果、遺伝子 X(都合により実際の遺伝子名は伏せさせていただきます)が推定された。

推定された遺伝子 X は転写抑制因子として働くことが知られており、また、NIH 3T3 細胞において MMP-3 mRNA の発現を直接減少させることが報告されている。

**(5) miR-A または miR-B の阻害は TNF-α 存在下での RASF の X タンパク発現量の減少を抑制した**

図 5



次に、遺伝子 X が実際に miR-A または miR-B の標的遺伝子である可能性を検証するため、miR-A または miR-B の阻害が、標的遺伝子として推定された遺伝子 X のタンパク発現に影響を与えるかを Western blotting 法で確認した。

TNF-α 非存在下での培養では、RASF におけるタンパク X の発現量は、miR-A や miR-B の阻害による影響を受けなかった。

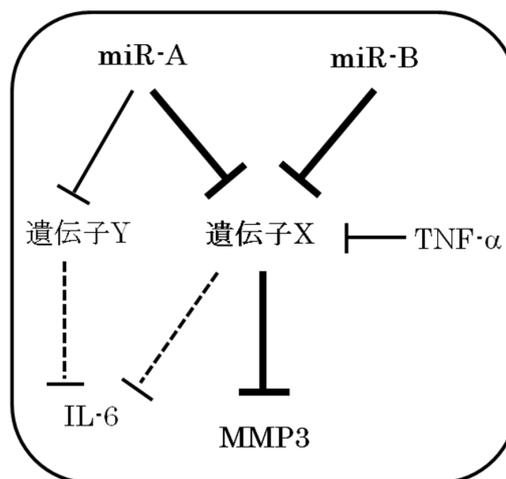
TNF-α 存在下では、コントロール群では RASF からの X タンパクの発現量は減少したが、miR-A または miR-B の阻害により X タンパクの発現量は回復した。上図は、TNF-α 非存在下のコントロール群のタンパク X / β-アクトニン比を基準に、他の群を相対的に示した。

**(6) 考察**

RASF において、MMP-3 の発現を制御する miRNA として miR-A と miR-B を同定した。更に miR-A は IL-6 の発現も制御した。miR-A と miR-B は、RASF において遺伝子

X の発現を抑制し、タンパク X の MMP-3 に対する転写抑制作用を弱めることにより、MMP-3 産生を亢進させる機能が示唆された(図 6)。TNF-α によりタンパク X の発現が低下し、更に miR-A または miR-B の阻害によるタンパク X の発現亢進が、TNF-α 存在下においてのみ認められたことから、TNF-α 存在下では、これらの miRNA の発現が亢進している可能性が考えられ、現在、miR-A と miR-B の mRNA の発現レベルが亢進しているかを RT-PCR 法にて検証中である。

図 6



miR-A と miR-B が遺伝子 X を直接標的とすることや、これらの miRNA の阻害による MMP-3 産生抑制作用が実際に遺伝子 X を介している可能性については、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法による更なる検討が必要であると考えている。

遺伝子 X が IL-6 の転写を直接抑制するという既報はないため、miR-A 阻害剤による IL-6 の発現抑制の機序として、タンパク X が IL-6 の発現を制御する他の分子の発現を制御している可能性や、miR-A が遺伝子 X 以外の他の遺伝子発現(例えば、遺伝子 Y)を調節することにより IL-6 産生を制御している可能性が考えられた。

今回、網羅的機能解析法により RASF からの MMP-3、IL-6 発現の制御に関わる miRNA を同定することができ、その阻害は RA の新規治療戦略に成り得ると考えられた。

**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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

発表者: 長谷川 久紀、溝口 史高、宮坂 信之、上阪 等

表題：転写抑制因子 ets variant 6 の発現を抑制する microRNA の阻害は、関節リウマチ滑膜線維芽細胞からの matrix metalloproteinase-3 と interleukin-6 産生を抑制する

学会名：第 42 回日本臨床免疫学会総会

発表年月日：2014 年 9 月 25 日～27 日

発表場所：京王プラザホテル、新宿、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者：宮坂 信之

(Miyasaka Nobuyuki)

東京医科歯科大学・医学部

附属病院・非常勤講師

研究者番号：30157622

(2) 研究分担者：溝口 史高

(Mizoguchi Fumitaka)

東京医科歯科大学・大学院

医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60510360