

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461476

研究課題名(和文) マイクロRNAによるリウマチ関節破骨細胞制御に関する研究

研究課題名(英文) Study of the role of miRNA in the regulation of osteoclast differentiation in rheumatoid arthritis joints

研究代表者

河野 誠司 (Kawano, Seiji)

神戸大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：20351512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、関節リウマチの病態におけるmiR-124の関与を破骨細胞の分化抑制という視点から解析した。我々は、miR-124がラットのアジュバント関節炎モデルにおいて、関節炎、破骨細胞の分化ならびに骨破壊を抑制すること、ヒトの破骨細胞分化系においても破骨細胞分化をおさえることを証明した。また、miR-124が転写因子NFATc1の発現をmRNAレベルやタンパクレベルで抑制することを証明した。これらの成果により、miR-124と破骨細胞分化との関係を証明できたと考えており、miR-124が関節リウマチの治療薬候補として有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) are small endogenous, noncoding RNAs that act as post-transcriptional regulators. We analyzed the in vivo effect of miRNA-124 (miR-124, the rat analog of human miR-124a) on adjuvant-induced arthritis (AIA) in rats. We found that miR-124 suppressed AIA in rats, as demonstrated by decreased synoviocyte proliferation, leukocyte infiltration, and cartilage or bone destruction. Osteoclast counts were reduced in AIA rats treated with pre-miR-124, and protein level of NFATc1 was reduced in AIA joints. Luciferase analysis showed that miR-124 directly targeted the 3' -UTR of the rat NFATc1 mRNAs. MiR-124 also directly targeted the 3' -UTR of human NFATc1 mRNA, and suppressed the differentiation of human osteoclasts. Conclusion. We found that miR-124 ameliorated AIA by suppressing critical prerequisites for arthritis development, such as NFATc1. Thus, we concluded that miR-124a is a candidate for therapeutic use for human rheumatoid arthritis.

研究分野：リウマチ膠原病学

キーワード：マイクロRNA 破骨細胞 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

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。RA 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増加、関節滑膜細胞の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。近年、RA の診断に抗 CCP 抗体が有用であるとされているが感度は高くない。さらに早期に治療開始することが望まれ、2009 年に新たに ACR/EULAR 分類基準が提唱されているが、早期 RA を確実に検出できる適切な分子マーカーは存在しない。治療においても、従来の抗リウマチ薬は関節炎の進行を完全に抑制することができず、また近年開発された生物製剤においても無効例や効果減弱例が認められることや高額な治療費を必要とすることなど問題点が多い。よって、RA の病因にかかわる重要な因子を明らかにし、新たな診断法・治療法を開発する必要がある。

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。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、miRNA を用いた創薬の期待も高い。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 の標的分子検索プログラムで 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、ケモカイン 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。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が期待される。その後の研究で、我々はさらに miR-124a が、RA の病態に密接に関与しているインテグリン 1 の発現を抑制すること、miR-124 の局所投与がラット・アジュバント関節炎(AIA)を改善することを発見した。

2. 研究の目的

ラット・AIA への miR-124 投与実験にて、炎症細胞浸潤が抑制されたが、骨組織に注目すると骨破壊が抑制された。これは miR-124 が関節炎局所で破骨細胞の分化を抑制し、その結果骨破壊が抑えられた可能性を示唆している。一方、Target scan で miR-124 (現在 miR-124a の表記はデータベースから消えているので、以下 miR-124 とする)標的分子の検索を行うと、標的候補分子として NFATc1 が挙がった。NFATc1 は、RANKL 刺激の下流に位置して破骨細胞分化の中核を担う転写因子であり、miR-124 が直接 NFATc1 の産生を低下させれば破骨細胞分化を抑制することができるかと予想できる。最近 MafB や IRF8 などの活性化マクロファージを誘導する転写因子が、NFATc1 の転写活性を抑えることで破骨細胞分化を負に制御すること、BlimP1 は NFATc1 の標的因子として発見され、MafB・IRF8・Bcl6 などの破骨細胞分化抑制因子の発現を抑制すること、が相次いで報告され、RANKL-NFATc1 系は破骨細胞分化を支配すると考えられている。以上のように、miR-124 により破骨細胞分化が抑制されること、NFATc1 が miR-124 の標的分子である可能性が高いこと、破骨細胞分化において

NFATc1 が必須の分子であること、RA では miR-124 の発現低下のために NFATc1 の活性が制御されないことが破骨細胞分化・骨破壊の進行を促進しているのではないかと、という着想に至った。

本研究では、RA の病態における miR-124 の関与を破骨細胞の機能抑制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ため、次のことを目標とした。

1) miR-124a が破骨細胞の分化に影響を与える分子の発現に影響しているか。とくに破骨細胞分化のマスター・レギュレーターである RANKL-RANK-NFATc1 系にどのような影響を与えているか。

2) ラット関節炎モデルにおいて、miR-124 の投与が関節局所で、破骨細胞分化に影響を与えているか。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞分化への miR-124 の効果の検討

ヒト・ラットの末梢血単球を M-CSF/RANKL 存在下に破骨細胞へと分化させる培養系に miR-124 の前駆体の pre-miR-124a (Ambion) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) と混合してトランスフェクションし、TRAP 染色にて破骨細胞分化が抑制されるかを検討した。NFATc1 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) の配列を PCR にて増幅しルシフェラーゼベクターに組み込み (NFATc1-Luc)、ラット RAW 細胞 (不活化した RA-FLS) に pre-miR-124a と NFATc1-Luc をコトランスフェクションして、NFATc1-Luc の活性が低下するか検討した。

(2) ラット・AIA での miR-124 発現の評価

ラット・AIA モデルで、関節炎誘導直後、関節炎発症時、関節炎増悪時、関節炎極期の関節局所および脾臓中単核球で RA 特異的 miRNA の変動、関与する細胞を検討した。miRNA は特異性、検出感度および検出範囲に優れてい

る Taq Man 法 (Applied Biosystems 社, Chen C, et al, Nucleic Acids Res. 2005) を用いて行った。関節局所では RA 特異的 miRNA の標的蛋白 (NFATc1 など) の変動をウエスタンブロット法と組織染色で検出した。

(3) ラット AIA モデルにおける miRNA を標的とした治療の関節炎抑制効果の検討

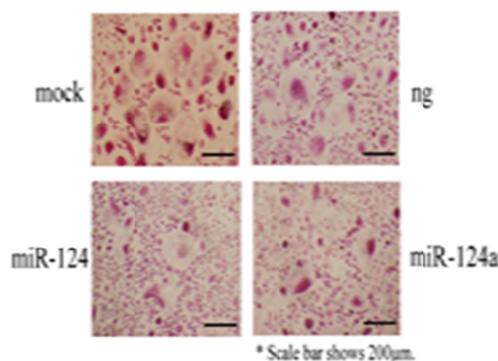
RA 特異的 miR-124 を AIA モデルに遺伝子導入を行い、関節炎発症の有無およびその程度を関節炎スコア・体重・病理組織像により評価した。遺伝子導入は pre-miR-124 と atelocollagen (KOKEN) の複合体を関節に局所投与した (Honma et al. Biochem Biophys Res Commun. 2001)。

4. 研究成果

(1) miR-124 は単球の破骨細胞への分化を抑制する。

M-CSF/RANKL 存在下に破骨細胞へと分化させる培養系に miR-124 の前駆体の pre-miR-124a を投与すると、図 1 のように破骨細胞分化が抑制された。pre-miR-124a と NFATc1-Luc をコトランスフェクションすると NFATc1-Luc の活性が低下し、NFATc1 の mRNA の 3' UTR の配列の mutant では、その作用がキャンセルされた。このことから、miR124a が特異的に NFATc1 の mRNA からの翻訳を制御していることがであることが証明された

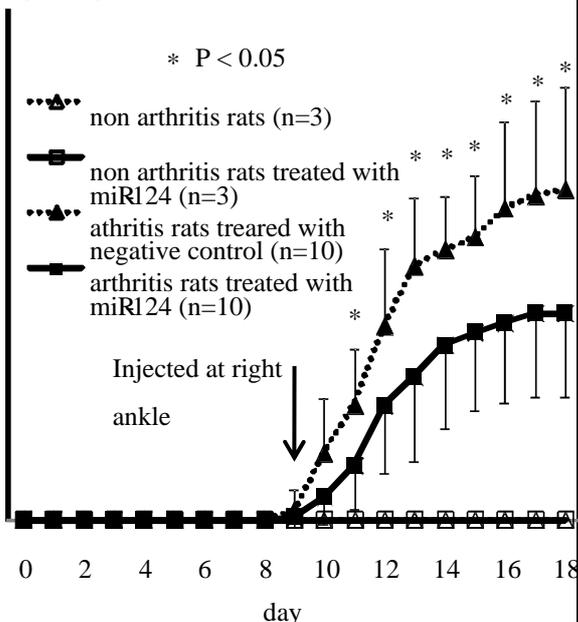
(図 1)



(2) miR124 はラット AIA の関節炎を抑制する。

図2に示すように、pre-miT-124 をラット AIA モデルの踵関節に注射すると、関節炎が改善した。

(図2)



(縦軸：関節炎スコア)

(3) miR124 は、AIA の破骨細胞数を減少させた

AIA に miR124 を投与すると、組織学的評価により、炎症関節におけるは骨細胞数が減少し手いることが明らかになった。また関節で NFATc1 の発現が減少していることを、定量 PCR とウェスタンブロットで、mRNA およびタンパクレベルで確認した。

(研究成果のまとめ) miR124 は、関節リウマチモデルにおいて、破骨細胞の分化を抑え骨破壊を抑制した。分子機序として NFATc1 が miR124 の標的分子であることを証明した。この研究から、miR124 が関節リウマチ治療の有力な治療薬の候補であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Nakamachi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124: a promising therapeutic agent for various human diseases, including rheumatoid arthritis. RNA & DISEASE. 2016,3:e1252.

Doi:10.14800/rd.1252(査読あり)

Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi

Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. Ann Rheum Dis. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206417. (査読あり)

[学会発表](計1件)

Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S: MICRORNA-124 INHIBITS PROGRESSION OF ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS IN RATS, Annual European Congress of Rheumatology, ローマ(イタリア), 2015

[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]なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 誠司 (KAWANO, Seiji)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20351512

(2) 研究分担者

三枝 淳 (SAEGUSA, Jun)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20514970

(3) 研究分担者

中町 祐司 (NAKAMACHI, Yuji)

神戸大学・医学部附属病院・その他

(臨床検査技師)

研究者番号：80379429