

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860265

研究課題名(和文) microRNAの網羅的解析を用いた自己免疫疾患発症機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the autoimmune diseases pathogenesis through microRNA exhaustive analysis

研究代表者

早川 国宏 (Hayakawa, Kunihiro)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：00573007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ(RA)および全身性エリテマトーデスを対象とし、microRNA(miRNA)が疾患活動性に関与することを明らかにした。RAを対象とした研究では、アバタセプト治療前後で変動する血中miRNAを網羅的にmiRNAアレイを用いて同定した。これらの機能を明らかにするため、RA滑膜細胞の炎症応答について解析した。治療によって増加するmiRNAは抗炎症作用を、逆に減少したmiRNAは炎症亢進作用を有することを明らかにした。すなわち疾患活動性が高い際の血中miRNAは活動性の維持に、逆に疾患活動性低下時に増加するmiRNAは炎症抑制の後押しをすることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus are typical autoimmune disease. In this study, we revealed the microRNA (miRNA) is associated with these disease activities. In the study targeting of RA, we first performed miRNA array analysis of plasma from patient with before and after treatment of abatacept, and identified the fluctuated miRNA between before and after treatment. Next, we intended to investigate the influence of these miRNAs in RA disease activity, and tested to confirm inflammatory responses using RA synovocyte. Interestingly, up-regulated miRNAs by treatment have anti-inflammatory effect. Conversely, down-regulated miRNAs showed effect to increase inflammation. That is, plasma miRNA from high activity RA patients may contribute the sustention of disease activity, and plasma miRNA in low activity RA patients may conversely assist the suppression of inflammation.

研究分野：免疫学、分子生物学、リウマチ・膠原病内科学

キーワード：miRNA 関節リウマチ 全身性エリテマトーデス 炎症

1. 研究開始当初の背景

近年、関節リウマチ(RA)や全身性エリテマトーデス(SLE)といった自己免疫疾患において、この発症や活動性にノンコーディング RNA の一つである microRNA (miRNA) の関与が示唆されてきている。一方、これらの変動している miRNA が病態形成や疾患活動性にどのような影響を与えているかは報告されていない。

数年前から、申請者らは様々な膠原病の病態を規定する遺伝子を探索する目的で、様々な膠原病疾患治療前後の患者血液を対象とし、網羅的な解析を行っている。特に RA においては、プロテオーム解析から結合組織成長因子(CTGF)を抽出し (*Clin Exp Rheumatol.* 26:261, 2008)、さらに RA への活動性を明らかにしており(*Arthritis Rheum.* 65: 1477, 2013)、この独自の戦略は非常に有用であることが証明されている。よって同様の手法にて、RA や SLE といった自己免疫疾患の発症や活動性に関わる miRNA をもとに、新規治療ターゲットとなる因子(miRNA や遺伝子)を同定し病態形成の分子機序を解明できる可能性と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、まず RA・SLE 治療前と治療後で変動する血漿中の miRNA を網羅的に解析し、どのような miRNA が治療(疾患回復)に伴い顕著に変動するかを明らかにする。次に、これら疾患治療で変動する血漿中 miRNA が果たす役割・機序について検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 疾患治療前後で変動する血液循環 miRNA の網羅的解析

RA 治療前後で変動する血漿中 miRNA の網羅的解析

対象とした RA の検体は、アバタセプト治療の前、投与 3 か月後の血漿を 10 人分用いた。これらの検体は、すべて順天堂大学医学部附属浦安病院リウマチ・膠原病内科より提供を受けた。これらの患者はアバタセプト治療による治療効果が良好であったものに限った。アバタセプト治療を対象とした理由として、インフリキシマブ等抗 TNF- α 抗体製剤は細胞破壊を誘導する効果があるため、細胞内の miRNA が血中に放出されることを予想した。よって細胞破壊を誘導しにくいとされているアバタセプト治療を対象とした。これらの血漿から RNA を抽出し、miRNA アレイ法をもちいて網羅的に解析した。

SLE 治療前後で変動する血漿中 miRNA の網羅的解析

対象とした SLE の検体は、入院時(治療前)と退院時(治療後)の血漿を採集した。これらの患者背景は限定せず、入院した時点と退院時で治療前後と定義づけした。これらの血漿も同様に RNA 抽出を行い、miRNA アレイを行い治療前後で変動する miRNA の同定を試みた。

(2) RA 治療によって変動する血中 miRNA の生理学的意義の解明

(1) で網羅的に同定した miRNA 情報をもとにし、これらの変動する miRNA の生理学的な意義を検証するため、まず具体的に生理作用を検証する miRNA を絞り込んだ。絞り込みの条件として、治療前後で統計学的に有意に変動したもの、アレイ検出が良好であるもの、real-time PCR で検出可能であるものとし、変動上位の miRNA それぞれ(治療後増加または減少)4 種ずつをピックアップした。複数種組み合わせで検証する理由として、これらは血中で単独で存在するわけではなく、競合的または協調的にターゲットとなる細胞に作用しうると考えた。これらの総合的な機能を評価するため、これらの miRNA を RA 滑膜細胞株(MH7A)に前処置(一般的なトランスフェクション試薬による遺伝子導入)し、各種炎症刺激に対する応答を検証した。

4. 研究成果

(1) 疾患治療前後で変動する血液循環 miRNA の網羅的解析

RA 治療前後で変動する血漿中 miRNA の網羅的解析

miRNA アレイデータは、正規化後、対応のある *t* 検定による有意差検定を行った。その結果、治療後に有意に減少する miRNA は 17 種類、治療後に有意に増加する miRNA は 25 種類あった。変動上位の miRNA を表 1 に示す。

表 1 RA 治療後に増減した血漿中 miRNA

治療後減少			治療後増加		
Name	p 値	Fold	Name	p 値	Fold
hsa-miR-4459	0.043	1.991	hsa-miR-4259	0.012	2.425
hsa-miR-625-3p	0.002	1.798	hsa-miR-4664-3p	0.044	2.263
hsa-miR-146a-5p	0.041	1.728	hsa-miR-2276-3p	0.025	2.002
hsa-miR-4505	0.021	1.718	hsa-miR-4326	0.047	1.977
hsa-miR-4520-5p	0.020	1.659	hsa-miR-1231	0.047	1.798
hsa-miR-4739	0.004	1.576	hsa-miR-1203	0.032	1.794
hsa-miR-3616-3p	0.038	1.422	hsa-miR-3622a-3p	0.025	1.657
hsa-miR-766-3p	0.009	1.375	hsa-miR-3942-3p	0.037	1.619
hsa-miR-4442	0.043	1.283	hsa-miR-4299	0.004	1.582
hsa-miR-149-5p	0.026	1.282	hsa-miR-124-3p	0.026	1.490

SLE 治療前後で変動する血漿中 miRNA の網羅的解析

RA と同様にアレイデータを正規化後、対応のある *t* 検定による有意差検定を行った。その結果、治療後に有意に減少する miRNA は 4 種類、治療後に有意に増加する miRNA は 28 種類あった。変動上位の miRNA を表 2 に示す。

表 2 SLE 治療後に増減した血漿中 miRNA

治療後減少			治療後増加		
Name	p 値	Fold	Name	p 値	Fold
hsa-miR-4674	0.008	1.276	hsa-miR-6087	1E-04	3.027
hsa-miR-3665	0.003	1.149	hsa-miR-4294	0.02	2.226
hsa-miR-3151-5p	0.045	1.148	hsa-miR-6131	0.044	2.066
hsa-miR-6846-5p	0.044	1.124	hsa-miR-3135b	0.01	1.987
			hsa-miR-106a-5p	0.041	1.684
			hsa-miR-4723-5p	0.038	1.635
			hsa-miR-204-3p	0.02	1.596
			hsa-miR-1202	0.033	1.578
			hsa-miR-7150	0.003	1.562
			hsa-miR-6763-3p	0.037	1.557

(2) RA 治療によって変動する血中 miRNA の生理学的意義の解明

(1)-1 の結果をもとに、治療後に増加した miRNA 群を suppressive-miRNAs (S-miRs)、減少した miRNA 群を pro-inflammatory-miRs (P-miRs) と名付けた(表 3)。治療後に増加する miRNA 群(S-miRs) は疾患回復に寄与し、治療後に減少する miRNA 群は疾患発症またはその持続(慢性化)に寄与しうることが予想した。また、これらの miRNA の単独での作用についての報告はまだほとんどされていないため、機能未知のものである。

表 3 生理作用検証 miRNA リスト

P-miRs				S-miRs			
順位	Name	p 値	Fold	順位	Name	p 値	Fold
2	hsa-miR-625-3p	0.002	1.798	1	hsa-miR-4259	0.012	2.425
4	hsa-miR-4505	0.021	1.718	6	hsa-miR-1203	0.032	1.794
6	hsa-miR-4739	0.004	1.576	9	hsa-miR-4299	0.004	1.582
8	hsa-miR-766-3p	0.009	1.375	11	hsa-miR-1225-5p	0.015	1.487

そこで、MH7A 細胞にあらかじめ S-miRs、P-miRs、陰性コントロール(NC-miRs)で前処置したのち、活性化マクロファージ(Mφ)、TNF-α、IL-1β で刺激し、MH7A 細胞のこれらの応答への miRNA の影響を検証した。MH7A の炎症応答の指標として、IL-6 および IL-8 の mRNA 発現を real-time PCR を用いて評価した。IL-6 は RA においては炎症の慢性化に寄与するサイトカインでこれをターゲットとした治療薬も多くある。また、IL-8 は RA 発症初期のイベントである関節腔への好中球浸潤を促進するケモカインである。

まず、S-miRs の作用を検証したところ、NC-miRs と比較し、Mφ で刺激した MH7A 細胞の IL-6 の発現が有意に抑制され、Mφ による炎症応答を抑制する効果があった。

特に TNF-α の刺激では、MH7A 細胞の IL-6 および IL-8 の発現が抑制され、TNF-α の刺激に対して優勢的に抑制する作用を持つことを明らかにした。また、IL-1β 刺激による IL-6 の発現も抑制することから、S-miRs はいくつかの炎症性サイトカインシグナルを抑制するポテンシャルがある miRNA 群であることが示唆された。(図 1 黒 vs 青)

次に P-miRs の作用を検証したところ、NC-miRs と比較し、Mφ で刺激した MH7A 細胞の IL-6 および IL-8 の発現が有意に亢進し、Mφ による炎症応答を増強する効果があった。特に TNF-α の刺激では、MH7A 細胞の IL-6 および IL-8 の発現が顕著に亢進し、TNF-α の刺激に対して優勢的にその応答を増強する作用を持つことを明らかにした。一方、IL-1β 刺激は、非常に興味深いことに MH7A 細胞の IL-6 および IL-8 の発現は増強されず、また、抑制もされなかった。この結果は、特に慢性炎症に寄与するとされる TNF-α の応答を増強することから、P-miRs は炎症の慢性化に寄与することが示唆された。(図 1 黒 vs 赤)

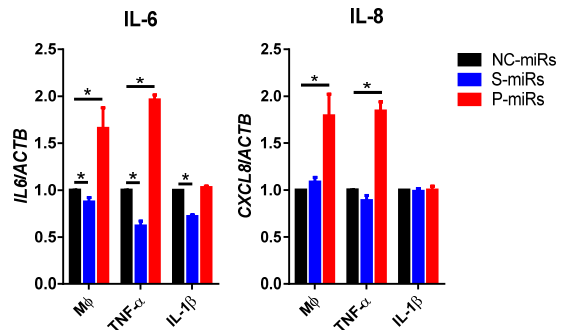


図 1 各種 miRNA 群の MH7A 細胞における作用の検証 MH7A 細胞に各種 miRNA 群で前処置し、それぞれ記載の刺激を行った。その際の IL-6, IL-8 の発現を RT-qPCR 法を用いて測定した。

これら miRNA 群の詳細な作用はいまだ不明なままであるが、少なくとも P-miRs は疾患活動性が高い時(治療前)に多く血中に存在する miRNA であり、これらは疾患活動性の維持(炎症の慢性化)に作用しうることが示唆される。つまり、これらの miRNA を抑制することで活動性を低下させられる可能性がある。逆に S-miRs は疾患活動性が低い時(治療後)に増加することから、関節炎からの回復を補助していることが示唆される。つまり、これらの miRNA の発現を増加させるまたは mimic の投与が治療の補助もしくはそのものが治療薬となりうる。しかし本研究で同定し

た S-miRs の効果は限定的で弱く、今後その他の変動上位 miRNA とともに効果的な組み合わせを探索する必要がある。

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 3 件)

1. Hirai T, Ikeda K, Fujishiro M, Tsushima H, Hayakawa K, Suzuki S, Yamaguchi A, Nozawa K, Morimoto S, Takasaki Y, Ogawa H, Takamori K, Tamura N, Sekigawa I: The effectiveness of new triple combination therapy using synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs with different pharmacological function against rheumatoid arthritis: the verification by an in vitro and clinical study. *Clin Rheumatol* 36:51-58, 2017, 査読有
2. Miyashita T, Morimoto S, Fujishiro M, Hayakawa K, Suzuki S, Ikeda K, Miyazawa K, Morioka M, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I, Takasaki Y: Inhibition of each module of connective tissue growth factor as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 49:109-114, 2016, 査読有
3. Suzuki S, Morimoto S, Fujishiro M, Kawasaki M, Hayakawa K, Miyashita T, Ikeda K, Miyazawa K, Yanagida M, Takamori K, Ogawa H, Sekigawa I, Takasaki Y: Inhibition of the insulin-like growth factor system is a potential therapy for rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 48:251-258, 2015, 査読有

[学会発表](計 11 件)

1. Hayakawa K, Fujishiro M, Yoshida Y, Tsushima H, Hirai T, Ikeda K, Morimoto M, Sekigawa I: The investigation of the Connective Tissue Growth Factor in the pathogenesis of imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis mice. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月、沖縄県宜野湾市 (沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル)
2. 早川国宏、藤城真樹、芳田祐子、宮下知子、津島浩、平井琢也、池田圭吾、森本真司、関川巖: 関節リウマチ炎症局所の脂質メディエーターの測定方法の確立とその役割の検討. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016 年 4 月、神奈川県横浜市 (パシフィコ横浜)
3. 池田圭吾、早川国宏、藤城真樹、川崎美紀子、平井琢也、津島浩、森本真司、高

崎芳成、関川巖: SLE モデルマウスおよび JAK 阻害薬を用いたインターフェロンと転写制御因子の調節に関わる検討. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2016 年 4 月、神奈川県横浜市 (パシフィコ横浜)

4. Hayakawa K, Fujishiro M, Masuzawa M, Yoshida Y, Miyashita T, Ikeda K, Morimoto S, Sekigawa I: The implication of the Connective Tissue Growth Factor (CTGF) in the pathogenesis of psoriasis. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月、北海道札幌市 (札幌コンベンションセンター)
5. Ikeda K, Hayakawa K, Fujishiro M, Kawasaki M, Hiari T, Morimoto S, Takasaki Y, Sekigawa I: Pan JAK Inhibitor Tofacitinib Ameliorate Autoimmunity and Nephritis in Lupus Prone Mice Via Inhibition of Interferon Signaling Pathway. 2015 American College of Rheumatology Annual Meeting, November 6-11, 2015, San Francisco

[図書](計 1 件)

1. 早川国宏、森本真司: タンパク質マイクロアレイ法を用いた SLE における自己抗体の検出. *リウマチ科*, 52:408-413, 2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

早川 国宏 (HAYAKAWA, Kunihiro)
順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員(研究員・ポストドクタークラス)
研究者番号: 00573007