

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860753

研究課題名(和文) microRNAによる滑膜細胞の制圧-骨分化誘導および薬剤応答の改善の検討-

研究課題名(英文) MicroRNA modulate the function of fibroblast-like cells in Rheumatoid Arthritis

研究代表者

岩本 直樹 (IWAMOTO, Naoki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：80437897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ患者由来滑膜細胞は骨芽細胞への分化能を有しており、その分化の過程においてmicroRNA-218(miR-218)の発現低下を認めた。miR-218は骨芽細胞分化の初期に上昇を認め、miRNA-218を強制発現することにより骨芽細胞への分化を誘導した。miR-218は滑膜細胞においてROB01を標的遺伝子とし、Wnt- /カテニン経路の抑制因子であるDKK-1の分泌を抑制していた。今後は関節リウマチ動物モデルでのmiR-218による骨破壊抑制/修復の検証が必要である。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast-like synovial cells from RA patients (RA-FLS) can differentiate into osteoblast and miR-218 was down-regulated during osteogenic differentiation of RA-FLS. Induction of miR-218 in RA-FLS decreased ROB01 expression. Conversely, the knockdown of miR-218 increased the expression of ROB01. Finally, miR-218 promoted osteogenic differentiation of RA-FLS through DKK-1 suppression. Our results showed that miR-218 modulate osteogenic differentiation of RA-FLS through ROB01/DKK-1 axis. This attractive hypothesis needs to be further tested in animal models.

研究分野：リウマチ・膠原病内科

キーワード：関節リウマチ microRNA 骨芽細胞 滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)の病態形成において滑膜細胞は主要な役割を果たしており、アポトーシス抵抗性を獲得し異常に増殖した滑膜細胞は炎症性サイトカインの分泌による炎症の惹起やRANKL分泌による破骨細胞形成の促進、滑膜細胞を中心としたパンヌスによる直接的な軟骨・骨破壊をもたらす。また、この滑膜細胞は関節固有の間葉系細胞であり、脂肪細胞をはじめ様々な細胞への分化能を有し、骨芽細胞への分化能も有している。骨芽細胞は骨形成を担当する細胞であり、破骨細胞により破壊された骨の修復に参与する。RA患者関節組織において異常に増殖している滑膜細胞を骨芽細胞へ分化誘導することができれば、骨破壊の抑制のみならず骨修復も期待できる。microRNA(miRNA)は約22塩基からなるnon-coding RNAであるが、近年、組織の分化や細胞増殖、疾患形成など様々な段階での細胞応答に参与していることが明らかとなりつつある。異常制御/発現されたmiRNAの是正による影響は病態特異的なことが多く、生理的な状態であれば、正常細胞へのmiRNAの導入/阻害による影響は少ない。すなわち、治療応用した際、有効性のみならず、安全性が期待できる。以上の点よりRAで主要な病態をなす滑膜細胞の骨芽細胞分化誘導におけるmiRNAの役割を研究することは、今後のRA患者の治療において著しく有用になると考え本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

関節リウマチ患者由来滑膜細胞の骨芽細胞分化にかかわるmicroRNAを明らかとする。

3. 研究の方法

- 1) 関節リウマチ患者由来の滑膜細胞(RA-FLS)を骨芽細胞へ分化誘導し、分化の過程において変動するmiRNAをマイクロアレイおよびRT-PCR法にて解析した。
- 2) RA-FLSにmiR-218の強制発現/ノックダウンを行い、miR-218による骨芽細胞分化を検討した。
- 3) 2)と同様の方法を用い、RA-FLSにおけるmiR-218の標的遺伝子をマイクロアレイおよびRT-PCR法にて解析した。
- 4) miR-218によるDKK-1の分泌能をELISA法にて測定した。

4. 研究成果

1) RA-FLSを骨芽細胞分化誘導培地にて培養後にALP染色を行ったところ、controlに比べALPの発現を強度に認め、また、ALPおよびRUNX mRNAの発現上昇を認め、骨芽細胞への分化が確認された。また、分化後のmiRNAの発現変動を解析したところ、12のmiRNAの発現上昇と24のmiRの発現低下を認め、その中でmir-218miR-218の発現低下を認めた。

2)RA-FLSにmiR-218の強制発現/ノックダウンを行ったところ、miR-218の強制発現により骨芽細胞への分化を認めた(図1)

ALP染色

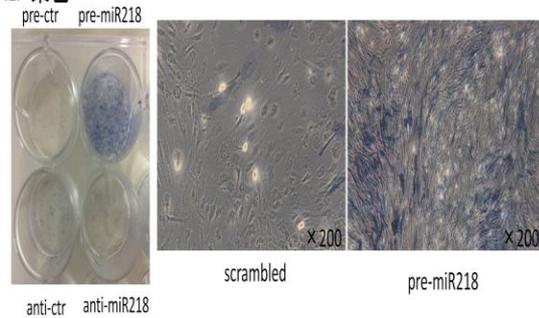


図1

3)ROB01はmiR-218のRA-FLSへの強制発現にて発現低下があり、ノックダウンにより発現上昇を認めた、RA-FLSにおけるmiR-218の標的遺伝子であると思われた(図2)。

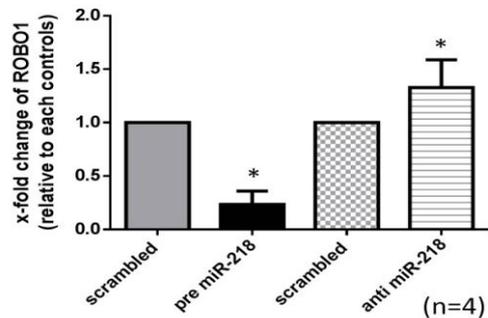


図2

4)骨形成抑制因子であるDKK-1のRA-FLSの分泌はmiR-218の強制発現にて低下を認め、miR-218による骨芽細胞分化誘導はWnt/ β -カテニン経路の活性化を介しているものと思われた。

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21件)

1. 岩本 直樹, 川上純. (1番目/2人) 関節リウマチ薬物治療の最新知見 “アバタセプト” 日本臨床. 2016;74(6);968-973. (査読無し)
2. Ichinose K, Iwamoto N (11番目/18人) Predictors of clinical outcomes in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. Cytokine. 2016 Mar;79:31-7.(査読有)

3. **Iwamoto N**, Vettori S(1 番目/12 人)
Downregulation of miR-193b in systemic sclerosis regulates the proliferative vasculopathy by urokinase-type plasminogen activator expression. *Ann Rheum Dis.* 2016 ;75(1):303-10(査読有)
4. **Iwamoto N**, Fukui S, (1 番目/24 人)
Evaluation of Switching from Intravenous to Subcutaneous Formulation of Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mod Rheumatol.* 2015 Dec 27:1-22. [Epub ahead of print] (査読有)
5. Fukui S, Hirota S, **Iwamoto N** (3 番目/5 人) Takayasu Arteritis With Antiphosphatidylserine/Prothrombin Antibody-Positive Antiphospholipid Syndrome: Case Report and Literature Review. *Medicine (Baltimore).* 2015 Dec;94(51):e2345. (査読有)
6. Ichinose K, **Iwamoto N**(9 番目/18 人)
Lupus nephritis IgG induces the expression of calcium/calmodulin-dependent kinase type IV in podocytes and alters their function. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(4):944-52(査読有)
7. Fukui S, **Iwamoto N** (2 番目/17 人)
Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis with thrombotic microangiopathy: Is simultaneous systemic lupus erythematosus associated with clinical manifestations? a case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore).*2015;94(45):e1943 (査読有)
8. Umeda M, **Iwamoto N** (4 番目/11 人)
Tocilizumab is effective in a familial Mediterranean fever patient complicated with histologically proven recurrent fasciitis and myositis. *Int J Rheum Dis.* 2015 Oct 20. [Epub ahead of print] (査読有)
9. **岩本 直樹**, 川上純(1 番目/2 人).
CTLA4-Ig(T 細胞選択的共刺激調薬) と関節リウマチの骨・軟骨病変の制御. *Clin Calcium.* 2015;25(12):1817-23. (査読無し)
10. Fukui S, **Iwamoto N** (2 番目/16 人)
Diffuse alveolar hemorrhage emerging one week after starting high-dose corticosteroid therapy for GPA with SLE. *Intern Med.* 2015;54(20):2681-6. (査読有)
11. Fukui S, **Iwamoto N**(11 番目/22 人)
Hypocholesterolemia predicts relapses in patients with Takayasu arteritis. *Mod Rheumatol.* 2015;Sep 18:1-6. (査読有)
12. Fukui S, **Iwamoto N**(2 番目/16 人)
RS3PE Syndrome with Iliopsoas Bursitis Distinguished from an Iliopsoas Abscess Using a CT-guided Puncture. *Intern Med.* 2015;54(13):1653-6. (査読有)
13. Suzuki T, **Iwamoto N** (2 番目/17 人)
Upregulation of Thrombospondin 1 Expression in Synovial Tissues and Plasma of Rheumatoid Arthritis: Role of Transforming Growth Factor-β1 toward Fibroblast-like Synovial Cells. *J Rheumatol.* 2015 Jun;42(6):943-7. (査読有)
14. Kawashiri SY, **Iwamoto N**(6 番目/14 人)
Automated Breast Volume Scanner, a new automated ultrasonic device, is useful to examine joint injuries in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol.* 2015 May;28:1-5. (査読有)
15. Ichinose K, **Iwamoto N**(10 番目/15 人)
Distinguishing the cerebrospinal fluid cytokine profile in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus from other

- autoimmune neurological diseases. Clin Immunol. 2015 Apr;157(2):114-20. (査読有)
16. Nonaka F, **Iwamoto N**(6 番目/14 人)
Increased prevalence of MEFV exon 10 variants in Japanese patients with adult onset Still's disease. Clin Exp Immunol. 2015;179(3):392-7 (査読有)
 17. Tamai M, **Iwamoto N**(9 番目/19 人)
Combination of MRI-detected bone marrow oedema with 2010 rheumatoid arthritis classification criteria improves the diagnostic probability of early rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2014 Dec;73(12):2219-20. (査読有)
 18. Takagi Y, **Iwamoto N**(4 番目/7 人)
Ultrasonography as an additional item in the American College of Rheumatology classification of Sjögren's syndrome. Rheumatology(Oxford).2014;53(11):1977-83 (査読有)
 19. Umeda M, **Iwamoto N**(6 番目/13 人)
Increased expression of vascular endothelial growth factor in a case of protein-losing enteropathy with undifferentiated connective tissue disease. Int J Rheum Dis. 2014 Jun 5 [Epub ahead of print] (査読有)
 20. **岩本直樹**, 川上 純(1 番目/2 人). 自己免疫性血液疾患:診断と治療の進歩] 病態の基礎 自己抗体の産生機序. 日本内科学会雑誌. 103(7):1564-1569,2014. (査読無し)
〔学会発表〕(計 11 件)
1. **岩本直樹**, 川上純 他、関節リウマチ患者におけるトファシチニブの有効性および安全性の検討第 60 回日本リウマチ学会 2016 年 4 月 21 日 4 月 23 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
 2. **岩本直樹**, 川上純 他、Osteogenic differentiation of fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis is induced by microRNA-218 through ROBO/Slit pathway. 第 60 回日本リウマチ学会 2016 年 4 月 21 日 4 月 23 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
 3. **岩本直樹**, 川上純 他 関節リウマチ患者におけるトファシチニブの有効性および安全性の検討、第 30 回日本臨床リウマチ学会 2015 年 11 月 21 日 11 月 22 日、神戸国際会議場(兵庫)
 4. **Iwamoto N**, Kawakami A et al. Osteogenic differentiation of fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis is induced by microRNA-218 through ROBO/Slit pathway. Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2015 10-13 June 2015. Rome, Italy.
 5. **岩本直樹**, 川上純 他、関節リウマチ患者におけるトファシチニブの有効性および安全性の検討第 49 回九州リウマチ学会 2015 年 3 月 21 日-3 月 22 日、アクロス福岡(福岡)
 6. **岩本直樹**, 川上純 他 関節リウマチ患者におけるトファシチニブの有効性および安全性の検討 第 59 回日本リウマチ学会 2015 年 4 月 22 日-4 月 25 日、名古屋国際会議場(愛知)
 7. **岩本直樹**, 川上純 他異なる生物学的製剤投与による血清サイトカイン、ケモカイン、血管新生因子プロファイルの比較検討 第 59 回日本リウマチ学会 2015 年 4 月 22 日-4 月 25 日、名古屋国際会議場(愛知)
 8. **岩本直樹**, 川上純 他 microRNA による関節リウマチ滑膜細胞の骨芽細胞分化誘導の検討 第 1 回日本マイクロ RNA 学会 2015 年 2 月 7 日、名古屋市立大学(愛知)
 9. **岩本直樹**, 川上純 他 トシリズマブ投与経路変更の有用性及び安全性の検討 第 29 回日本臨床リウマチ学会 2014 年 11 月 29 日-11 月 30 日、福岡国際会議場(福岡)
 10. **岩本直樹**, 川上純 他 多角的画像診断によるシェーグレン症候群関節症の検討 2014 日本シェーグレン症候群学会 2014 年 9 月 12 日-9 月 13 日 長崎ブリックホール(長崎)
 11. **Iwamoto N**, Kawakami A et al. MicroRNA-218 regulates osteogenic differentiation of fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014 11-14 June 2015. Paris, France
〔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〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 直樹 (IWAMOTO Naoki)

長崎大学医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：80437897