

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19605

研究課題名(和文) MicroRNAによる種々の細胞レベルでの関節リウマチの病態修飾の試み

研究課題名(英文) Modulation of cell function by microRNA 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチ患者由来滑膜細胞(RA-FLS)はmiR-218の強制発現により骨芽細胞へ分化を認めた。また、この骨芽細胞への分化はmiR-218のRA-FLSにおける標的遺伝子であるROBO1の発現抑制および、Wnt- /カテニン経路の抑制因子であるDKK1の分泌を抑制することによりもたらされていることが示唆された。

MTXはRA-FLSにおいて、miR-887の発現を増強しており、microRNAを介した作用機序が示唆された。さらに、このmiR-887をRA-FLSに強制発現したところGM-CSF、MIP-1 の分泌抑制および浸潤能の減弱を認め、miR-887による新規治療の可能性が示唆された。

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 ROBO1 expression. Conversely, the knockdown of miR-218 increased the expression of ROBO1. 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 ROBO1/DKK-1 axis.

In RA-FLS, miR-887 was upregulated in response to MTX. Overexpression of miR-887 decreased cytokine/chemokine production such as GM-CSF, MIP-1a. Furthermore, overexpression of miR-887 reduced migratory activity in scratch assay. MiR-887 might be downstream effector of MTX in suppression of its cytokine production and invasive phenotype. This knowledge may also be useful for the development of novel therapeutic strategies based on other treatments able to boost the cellular reservoir of miR-877.

研究分野：リウマチ・膠原病内科学

キーワード：関節リウマチ microRNA 骨芽細胞 滑膜細胞 MTX miR-218 miR-887

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(以下 RA)の臨床上の問題点として、関節破壊による ADL の低下、薬剤不応などがあり、関節再生や薬剤感受性の改善などの新たな治療法が切望されている。近年、micro RNA(miRNA)が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、さらには薬剤応答にも関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制御や薬剤応答性における miRNA の役割を研究することは、RA の病態解明および新たな治療法の開発において著しく有用になると考えた。

2. 研究の目的

関節リウマチ滑膜細胞における骨芽細胞分化および薬剤応答性に関する microRNA を同定し、その機能解析を行うことにより病態解明および治療応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) microRNA による骨芽細胞分化の検討
 関節リウマチ患者由来滑膜細胞(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。

RA-FLS に miR-218 の強制発現/抑制を行い、miR-218 による骨芽細胞分化誘導の検証および 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。
 miR-218 強制発現による DKK-1 の分泌能および得られた標的遺伝子の knockout による DKK-1 分泌能への影響を ELISA 法および RT-PCR 法にて解析した。

(2) RA-FLS における MTX 薬剤応答性 miRNA の解析

RA-FLS を MTX と共培養し、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。

RA-FLS に miR-887 の強制発現/抑制を行い、miR-887 の標的遺伝子を検索した。

miR-887 の強制発現による RA-FLS のサイトカインケモカイン産生能および浸潤能への影響を multiplex bead assay および scratch assay により解析した。

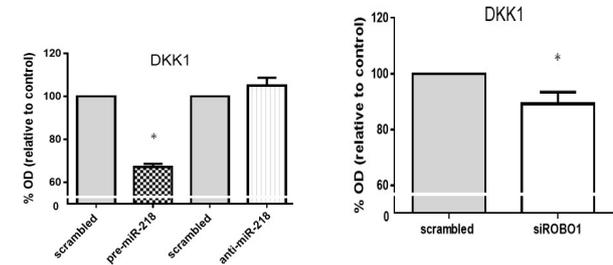
4. 研究成果

(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 RUNX2 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-218 の発現低下を著明に認めた。miR-218 は分化の過程での miR-218 の変動は 12 時間後まで上昇を認めその後低下していた。

(1) 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。標的遺伝子解析では ROBO1 が miR-218 の RA-FLS への強制発現にて発現低下、ノックダウンにより発現上昇を認め RA-FLS における miR-218 の標的遺伝子であると思われた

(1) ROBO1 の knockout および mir-218 の強制発現いずれにおいても骨形成の強力な抑制因子である DKK-1 の発現低下を認め、miR-218 は DKK-1 の低下を介して骨芽細胞への分化を誘導していると思われた(下図)

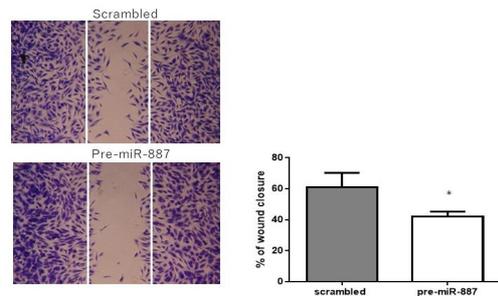


(2) MTX1uM を 48 時間 RA - FLS と共培養したところ miR-887 の著大な上昇を認めた。

(2) 74 の遺伝子が miR-887 の強制発現で低下し、抑制で低下したためこれらの遺伝子が標的遺伝子と考えられた、これらの遺伝子を用い gene ontology 解析をおこなったところ、cell signaling や細胞応答関連の遺伝子が発現していた。

(2) RA-FLS への miR-887 の強制発現により GM-CSF、MIP-1 の産生が抑制され浸潤能の低下を認めた(下図)。以上より miR-887 は RA-FLS のケモカイン、サイトカイン産生能、浸潤能を低下させることが示され、miR-887 を用いた新たな関節リウマチの治療の可能性および MTX はこの miR-887 の発現上昇によりその治療効果を発揮している可能性が示唆された。

Method: scratch assay



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 30 件)

1. Ichinose K, Sato S, Kitajima Y, Horai Y, Fujikawa K, Umeda M, Fukui S, Nishino A, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Yasuhi I, Masuzaki H, Kawakami A. The efficacy of adjunct tacrolimus treatment in pregnancy outcomes in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2018 Jan 1;961203318770536 (査読有).
2. Kawashiri SY, Nishino A, Igawa T, Takatani A, Shimizu T, Umeda M, Fukui S, Okada A, Suzuki T, Koga T, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakashima M, Mizokami A, Matsuoka N, Migita K, Ogawa F, Ikeda S, Maemura K, Nakamura H, Origuchi T, Maeda T, Kawakami A. Prediction of organ involvement in systemic sclerosis by serum biomarkers and peripheral endothelial function. *Clin Exp Rheumatol*. 2018 Apr 12 (査読有)
3. Endo Y, Koga T, Suzuki T, Hara K, Ishida M, Fujita Y, Tsuji S, Takatani A, Shimizu T, Sumiyoshi R, Igawa T, Umeda M, Fukui S, Nishino A, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Kuwana M, Kawakami A. Successful treatment of plasma exchange for rapidly progressive interstitial lung disease with anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Apr;97(15):e0436 (査読有)
4. Nishino A, Kawashiri SY, Koga T, Iwamoto N 4 番目, Ichinose K 5 番目, Tamai M 6 番目 (省略人数 14 人、川上 20 番目) Ultrasonographic efficacy of biologic and targeted synthetic DMARDs therapy in RA from multicenter RA ultrasound and prospective cohort in Japan. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018 Feb 26. (査読有)
5. Suzuki T, Fukui S, Umekita K, Miyamoto J, Umeda M, Nishino A, Okada A, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N 10 番目, Ichinose K 11 番目, Tamai M 12 番目 (省略人数 12 人、川上 23 番目). Attenuated effectiveness of tumor necrosis factor inhibitors for anti-human T-lymphotropic virus type 1 antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Feb 22. (査読有)
6. Fukui S, Iwamoto N 2 番目 (省略人数 18 人、玉井 12 番目、一瀬 13 番目、川上 19 番目) M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis. *Front Immunol*. 2018 Jan 8;8:1958. doi: 10.3389/fimmu.2017.01958. eCollection 2017. (査読有)
7. Fujita Y, Iwamoto N 11 番目, Ichinose K 12 番目, Tamai M 13 番目 (省略人数 17 人、川上 20 番目) Peripheral Ulcerative Keratitis Associated with Granulomatosis with Polyangiitis Emerging Despite Cyclophosphamide, Successfully Treated with Rituximab. *Intern Med*. 2018 Jan 11. doi: 10.2169/internalmedicine.0215-17. [Epub ahead of print] (査読有)
8. Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Fukui S, Kawashiri SY, Iwamoto N 9 番目, Ichinose K 10 番目, Tamai M 11 番目 (省略人数 9 人、川上 20 番目) MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase γ pathway. *Rheumatology (Oxford)*. 2018 Apr 1;57(4):718-726. (査読有)
9. Umeda M, Koga T, Ichinose K 3 番目, Igawa T, Sato T, Takatani A, Shimizu T, Fukui S, Nishino A, Horai Y, Hirai Y, Kawashiri SY, Iwamoto N 14 番目, Tamai M 16 番目 (省略人数 7 人、川上 21 番目). CD4⁺ CD52^{lo} T-cell expression contributes to the development of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2018 Feb;187:50-57. (査読有)
10. Fukui S, Iwamoto N 2 番目, Kawakami A 3 番目. Drug-induced large vessel vasculitis with carotid arterial ring sign. *Scand J Rheumatol*. 2018 Jan;47(1):83-84. (査読有)
11. Ichinose K 1 番目, Ohyama K, Furukawa K, Higuchi O, Mukaino A, Satoh K, Nakane S, Shimizu T, Umeda M, Fukui S, Nishino A, Nakajima H, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N 15 番目, Tamai M 16 番目 (省略人数 5 人、川上 21 番目) Novel anti-suprabasin antibodies may contribute to the pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2017 Nov 21. pii: S1521-6616(17)30593-4. (査読有)
12. Kawashiri SY, Fujikawa K, Nishino A, Okada A, Aramaki T, Shimizu T, Umeda M, Fukui S, Iwamoto N 10 番目, Ichinose K 11 番目, Tamai M 12 番目 (省略人数 12 人、川上 23 番目) Attenuated effectiveness of tumor necrosis factor inhibitors for anti-human T-lymphotropic virus type 1 antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2018 Feb 22. (査読有)

- a M, Fukui S, Suzuki T, Koga T, Iwamoto N 11 番目, Ichinose K 12 番目, Tamai M 13 番目 (省略人数 7 人、川上 20 番目) Ultrasound-detected bone erosion is a relapse risk factor after discontinuation of biologic disease-modifying antirheumatic drugs in patients with rheumatoid arthritis whose ultrasound power Doppler synovitis activity and clinical disease activity are well controlled. *Arthritis Res Ther*. 2017 May 25;19(1):108. (査読有)
13. Koga T, Iwamoto N 19 番目, Ichinose K 20 番目, Tamai M 21 番目 (省略人数 23 人、川上 27 番目) Japanese RA Patients with RRP Study Group. Anti-citrullinated peptide antibodies are the strongest predictor of clinically relevant radiographic progression in rheumatoid arthritis patients achieving remission or low disease activity: A post hoc analysis of a nationwide cohort in Japan. *PLoS One*. 2017 May 15;12(5):e0175281. (査読有)
14. Iwamoto N 1 番目, (省略人数 19 人、二瀬 12 番目、玉井 14 番目、川上 20 番目) Efficacy and safety at 24 weeks of daily clinical use of tofacitinib in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2017 May 4;12(5):e0177057. (査読有)
15. Tamai M 1 番目, Arima K 2 番目, Nakashima Y, Kita J, Umeda M, Fukui S, Nishino A, Suzuki T, Horai Y, Okada A, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N 13 番目, Ichinose K 14 番目 (省略人数 7 人、川上 21 番目) Baseline MRI bone erosion predicts the subsequent radiographic progression in early rheumatoid arthritis patients who achieved sustained good clinical response. *Mod Rheumatol*. 2017 Nov;27(6):961-966. (査読有)
16. Nishino A, Kawashiri SY, Shimizu T, Umeda M, Fukui S, Koga T, Iwamoto N 7 番目, Ichinose K 8 番目, Tamai M 9 番目 (省略人数 6 人、川上 15 番目) Assessment of both articular synovitis and tenosynovitis by ultrasound is useful for evaluations of hand dysfunction in early rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol*. 2017 Jul;27(4):605-608. (査読有)
17. Kawashiri SY, Nishino A, Shimizu T, Umeda M, Fukui S, Nakashima Y, Suzuki T, Koga T, Iwamoto N 9 番目, Ichinose K 10 番目, Tamai M 11 番目 (省略人数 4 人、川上 15 番目) Ultrasound disease activity of bilateral wrist and finger joints at three months reflects the clinical response at six months of patients with rheumatoid arthritis treated with biologic disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Mod Rheumatol*. 2017 Mar;27(2):252-256. (査読有)
18. Fukui S, Nakamura H, Takahashi Y, Iwamoto N 4 番目 (省略人数 5 人、川上 9 番目) Tumor necrosis factor alpha inhibitors have no effect on a human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I)-infected cell line from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *BMC Immunol*. 2017 Feb 3;18(1):7. (査読有)
19. 岩本直樹, 千葉恒, 川上純. HR-pQCT がもたらす関節リウマチ骨破壊新発見 The allergy in practice. 2017;37:468-472. (査読無)
20. Fukui S, Iwamoto N 2 番目 (省略人数 17 人、一瀬 8 番目、玉井 10 番目、川上 19 番目) Fewer subsequent relapses and lower levels of IL-17 in Takayasu arteritis developed after the age of 40 years. *Arthritis Res Ther*. 2016 Dec 13;18(1):293. (査読有)
21. Umeda M, Kawashiri SY, Nishino A, Koga T, Ichinose K 4 番目, Iwamoto N 10 番目, Aramaki T, Tamai M 12 番目 (省略人数 9 人、川上 17 番目) Synovitis of Sternoclavicular and Peripheral Joints Can Be Detected by Ultrasound in Patients with SAPHO Syndrome. *Mod Rheumatol*. 2016 Nov 16:1-12. (査読有)
22. Fukui S, Iwamoto N 2 番目 (省略人数 12 人、一瀬 8 番目、玉井 10 番目、川上 14 番目) Antineutrophilic cytoplasmic antibody-associated vasculitis with hypocomplementemia has a higher incidence of serious organ damage and a

- poor prognosis. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Sep;95(37):e4871. (査読有)
23. Kawashiri SY, Iwamoto N 16 番目, Ichinose K 17 番目, Tamai M 18 番目 (省略人数 20 人、川上 23 番目) Rapid improvement of Clinical Disease Activity Index (CDAI) at 3 months predicts a preferable CDAI outcome at 1 year in active rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab: results from an observational investigation of daily clinical practice. *Clin Exp Rheumatol*. 2016 Sep-Oct;34(5):808-812. (査読有)
24. Nakashima Y, Tamai M, Kita J, Michitsuji T, Shimizu T, Fukui S, Umeda M, Nishino A, Suzuki T, Horai Y, Okada A, Nishimura T, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Hirai Y, Arima K, Yamasaki S, Nakamura H, Origuchi T, Takao S, Uetani M, Aoyagi K, Eguchi K, Kawakami A. Magnetic Resonance Imaging Bone Edema at Enrollment Predicts Rapid Radiographic Progression in Patients with Early RA: Results from the Nagasaki University Early Arthritis Cohort. *J Rheumatol*. 2016 Jul;43(7):1278-84. (査読有)
25. Origuchi T, Fukui S, Umeda M, Nishino A, Nakashima Y, Koga T, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Kawakami A. The Severity of Takayasu Arteritis Is Associated with the HLA-B52 Allele in Japanese Patients. *Tohoku J Exp Med*. 2016;239(1):67-72. (査読有)
26. Koga T, Okada A, Fukuda T, Hidaka T, Ishii T, Ueki Y, Koderia T, Nakashima M, Takahashi Y, Honda S, Horai Y, Watanabe R, Okuno H, Aramaki T, Izumiyama T, Takai O, Miyashita T, Sato S, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Origuchi T, Nakamura H, Aoyagi K, Eguchi K, Kawakami A; Japanese RA Patients with RRP Study Group. Prognostic Factors Toward Clinically Relevant Radiographic Progression in Patients With Rheumatoid Arthritis in Clinical Practice: A Japanese Multicenter, Prospective Longitudinal Cohort Study for Achieving a Treat-to-Target Strategy. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Apr;95(17):e3476. (査読有)
27. Koga T, Migita K, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Kawashiri SY, Iwamoto N 7 番目, Ichinose K 8 番目, Tamai M 9 番目, (省略人数 9 人、川上 18 番目) Multiple Serum Cytokine Profiling to Identify Combinational Diagnostic Biomarkers in Attacks of Familial Mediterranean Fever. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Apr;95(16):e3449. (査読有)
28. Todoroki K, Nakano T, Eda Y, Ohyama K, Hayashi H, Tsuji D, Min JZ, Inoue K, Iwamoto N, Kawakami A, Ueki Y, Itoh K, Toyo'oka T. Bioanalysis of bevacizumab and infliximab by high-temperature reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection after immunoaffinity magnetic purification. *Anal Chim Acta*. 2016 Apr 15;916:112-9. (査読有)
29. **岩本 直樹**, 鈴木 貴久, 大山 要, 黒田 直敬, 川上純. 関節リウマチにおける thrombospondin-1 の意義. *リウマチ科* 56(2);193-196, 2016 (査読無)
〔学会発表〕(計 10 件)
1. Naoki Iwamoto, Shoichi Fukui, Tomohiro Koga, Shinya Kawashiri, Kunihiro Ichinose, Mami Tamai, Hideki Nakamura, Tomoki Origuchi, Atsushi Kawakami; MICRORNA PROFILING OF MTX-TREATED

- FIBROBLAST-LIKE SYNOVIAL CELLS
IN RHEUMATOID ARTHRITIS
REVEALED A POSSIBILITY OF
MICRORNA-887-3P AS NOVEL
THERAPEUTIC TARGET OF RA.
2017欧州リウマチ学会 2017年
2. 岩本直樹、千葉恒、川上純；MicroRNAによる関節リウマチ滑膜線維芽細胞の骨芽細胞分化誘導の検討。第38回日本炎症再生学会 2017年
 3. 岩本直樹、高谷亜由子、清水俊匡、福井翔一、梅田雅孝、西野文子、寶來吉郎、古賀智裕、川尻真也、一瀬邦弘、平井康子、玉井慎美、中村英樹、折口智樹、植木幸孝、川上純；ステロイド性骨粗鬆症におけるビスホスホネート、テリパラチドからデノスマブへの切り替え療法の有用性の検討。第31回日本臨床リウマチ学会 2017年
 4. 岩本直樹；自己免疫疾患とmicroRNA 第3回JCRベーシックリサーチカンファレンス 2016年
 5. 岩本直樹、右田清志、植木幸孝、川上純；関節リウマチにおける実臨床でのトファシチニブの作用および免疫制御のpros and cons 2016年臨床免疫学会 2016年
 6. Naoki Iwamoto, Shoichi Fukui, Astrid Jüngel, Steffen Gay, Atsushi Kawakami；Osteogenic differentiation of fibroblast-like synovial cells in Rheumatoid arthritis is induced by microRNA-218 through ROBO/Slit pathway. 2016アジア太平洋リウマチ学会 2016年
 7. 岩本直樹、道辻徹、清水俊匡、福井翔一、梅田雅孝、西野文子、中島好一、古賀智裕、川尻真也、一瀬邦弘、平井康子、玉井慎美、中村英樹、折口智樹、植木幸孝、川上純；関節リウマチ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

8. Naoki Iwamoto, Astrid Jüngel, Steffen Gay, Atsushi Kawakami；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

〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

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： 80427897

(3)連携研究者

川上 純 (KAWAKAMI, Atsushi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号： 90325639

玉井 慎美 (TAMAI, Mami)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号： 60380862

一瀬 邦弘 (ICHINOSE, Kunihiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号： 60437895

有馬 和彦 (ARIMA, Kazuhiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師

研究者番号： 30423635