

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09526

研究課題名(和文) マイクロRNA含有エクソソームを用いた関節リウマチの新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of the novel therapy for rheumatoid arthritis by micro RNA-containing exosomes

研究代表者

中町 祐司 (Nakamachi, Yuji)

神戸大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：80379429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はmiR-124が踵関節局所投与でラットアジュバンド関節炎を抑制することを報告した。今回、マウスコラーゲン誘導関節炎(CIA)で、miR-124を含むエクソソームを全身投与し、関節炎が抑制されるかを検討した。Mir-124を含むエクソソームはmiR-124をトランスフェクションした関節リウマチ(RA)滑膜細胞株とマウス脂肪由来幹細胞株から分泌されるエクソソームを用いた。関節炎発症前後でエクソソーム10µg単回投与と5µg 3回投与を行ったが関節炎の抑制は認めなかった。RAの治療にエクソソームをマイクロRNAの運搬体として用いる場合、エクソソームの改変または質の改善が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)： We have reported that miR-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis rats by the ankle injection. In this study we investigated whether systemic administration of miR-124-containing exosomes could ameliorate arthritis of mouse collagen induced arthritis (CIA) model. Exosomes carrying miR-124 were separated from culture supernatants of a rheumatoid arthritis synovium cell line and mouse adipose-derived stem cell line which were transfected with miR-124. A single administration of 10µg miR-124-containing exosomes, or multiple administration (three times) of 5µg exosomes did not significantly inhibit the progression of arthritis in CIA.

It was considered that further qualitative improvement would be necessary to efficiently deliver micro RNA to arthritic joints.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リウマチ学 エクソソーム 関節リウマチ

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) はわが国において 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。主に中・壮年層に罹患し関節痛・関節変形による ADL・QOL の低下は、経済的損失とも相俟って医学的にも社会的にも重要な疾患である。

治療においては、従来からの抗リウマチ薬の治療では関節炎の進行を完全に抑制することができず、無効例も多く見られる。また近年開発された生物製剤においても無効例あるいは効果減弱例が認められること、高額な治療費を必要とすることや治療に至り生物製剤を中止することのできる患者はわずか 2 割程度であることなど問題点が多い。よって、新たな治療法を開発する必要がある。

マイクロ RNA は、メッセンジャー RNA (mRNA) から蛋白への翻訳抑制や mRNA の不安定化をきたす重要な分子である (Carthew RW, et al. Cell. 2009, 136:642-655.)。また多くの発生、分化、増殖や代謝を制御することが知られている (Krutzfeldt J et al. Nat Genet. 2006 Suppl:S14-9. Review)。さらに、マイクロ RNA を用いた創薬の可能性も期待されている (Edwards JK et al. J Cardiovasc Transl Res. 2010;3:271-279.)。しかし、RA に関するマイクロ RNA を用いた創薬の研究成果はまだ見られない。

我々は miR-124 前駆体をラットアジュバンド関節炎モデルの右下肢踵関節に局所投与した結果、miR-124 投与群は対象群に比較し四肢の関節炎の抑制が認められた。また、receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)、nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1) の発現低下を認め破骨細胞が有意に低下し骨破壊を抑制していることを明らかにした (Nakamachi Y et al. Ann Rheum Dis. 2016;75:601-8)。これらは miR-124 を用いた RA の治療の有効性を示すものである。

次に miR-124 の全身投与の検討を行った。コラーゲン誘導関節炎モデル (CIA) マウスに運搬体としてアテロコラーゲンを主成分とする AteloGene (KOKEN) を使用し、miR-124 前駆体の静脈内投与を行った結果、関節炎を抑制するがその程度は弱く miR-124 を炎症局所および担当細胞に運ぶ適切な運搬体の検討が必要であることが明らかになった。

microRNA を細胞外へ分泌する運搬体として脂質二重膜で囲まれた膜小胞エクソソームが発見された (Trams EG et al, Biochim Biophys Acta 1981;645:63-70.)。さらに細胞から分泌されたエクソソームは異なる種類の細胞へ取り込まれ、エクソソーム内のマイクロ RNA は取り込まれた細胞で機能することが明らかになっている (Mittelbrunn et al, Nat Commun. 2011;2:282-)。

よって、miR-124 を豊富に含むエクソソームを用いることにより新たな関節リウマチ

の治療法が開発が期待できた。

## 2. 研究の目的

本研究は、近年発見された non-coding RNA のひとつであるマイクロ RNA を豊富に含むエクソソームを用いた RA の新たな治療法を開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) miR-124 が豊富なエクソソームの作成

miR-124 前駆体を含むウイルスベクターを関節リウマチ滑膜細胞細胞株 (E11) にトランスフェクションした細胞株 (vE11-miR124) を作成した。また、骨髄由来幹細胞株 (MSC)、マウス脂肪由来幹細胞 (mADSC)、E11、vE11-miR124 に miR-124 mimic を Lipofectamin RNAiMAX (ThermoFisher) を用いてトランスフェクションした (各々 MSC-miR124, mADSC-miR124, E11-miR124, E11-miR124 h)。

各細胞を無エクソソーム培地で培養した後、培養上清から超遠心法でエクソソームを分離した。

エクソソーム中の miR-124 はリアルタイム PCR 法で確認した。

### (2) エクソソームによる増殖抑制

MSC エクソソームを E11 培養上清に添加し、増殖の抑制を XTT テストで検討した。

### (3) 関節炎の誘導

関節炎は 8-10 週のオス DBA/1 マウスに *Mycobacterium tuberculosis* 含有不完全 Freund アジュバンドとタイプ コラーゲンを添加したエマルジョンを day0 に尾根部に、day28 に LPS を腹腔内投与し関節炎を誘導した。

### (4) エクソソームの投与

day29 に E11, E11-miR124, mADSC, mADSC-miR124 から分泌されたエクソソーム 10  $\mu$ g を尾静脈より投与した。

Day27, day30, day33 に E11, E11-miR124, E11-miR124 h, mADSC, mADSC-miR124 から分泌されたエクソソーム 5  $\mu$ g を尾静脈より投与した。

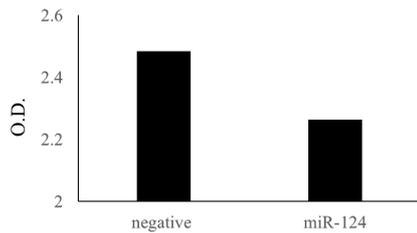
### (5) 関節炎の評価

4 肢の関節の腫脹を 1 肢あたり 0=関節の発赤、腫脹なし 1=関節の発赤またはわずかな腫脹 2=関節の軽度の腫脹 3=関節の中度の腫脹 4=関節の高度の腫脹の 5 段階、1 匹あたり最高 16 点で評価した。

## 4. 研究成果

### (1) エクソソームによる増殖抑制

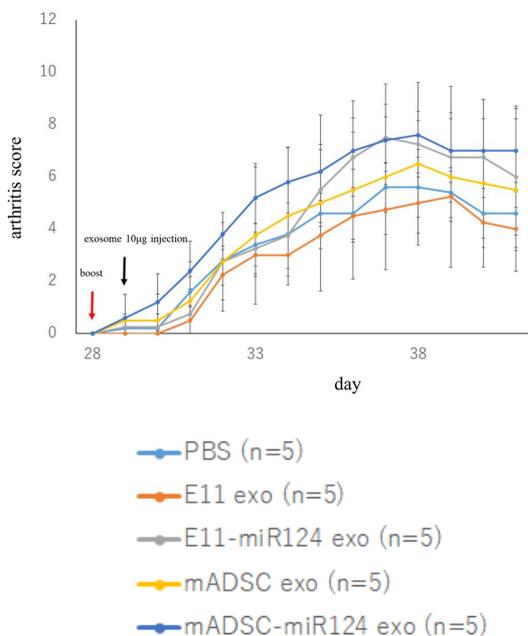
MSC エクソソームは関節リウマチ細胞株 E11 の増殖を抑制した。



## (2) エクソソーム投与による関節炎抑制効果

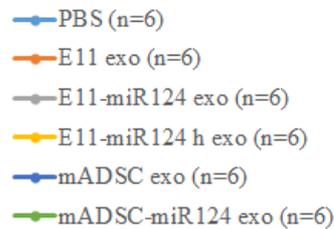
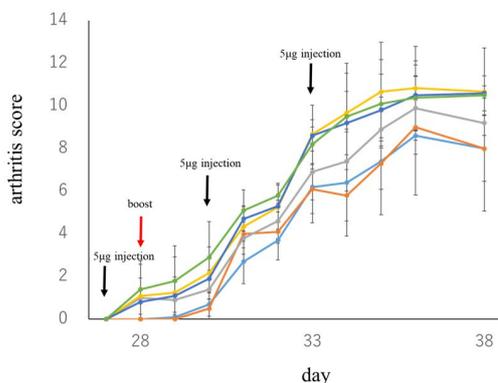
### 10 μg エクソソーム単回投与

PBS および E11、E11-miR124、mADSC、mADSC-miR124 から分泌されたエクソソームを免疫惹起した翌日の day 29 に投与したが、miR-124 を多く含むエクソソームで関節炎の抑制は見られなかった。なお、各群において体重の差も見られなかった。



### 5 μg エクソソーム 3 回投与

PBS および E11、E11-miR124、E11-miR124 h、mADSC、mADSC-miR124 5 μg を免疫惹起前日、2 日後、5 日後に投与したが、miR-124 を多く含むエクソソームの関節炎の抑制は認められなかった。なお、各群において体重の差も認められなかった。



## (3) まとめ

マイクロ RNA の運搬体としてエクソソームが知られている。我々はエクソソームを運搬体として miR-124 を用いた関節リウマチの治療をマウスコラーゲン誘導関節炎モデルで検討した。

2 種類の細胞株から miR-124 を多く含むエクソソームを作成し、2 種類の投与方法で実験を行ったが関節炎の抑制は認められなかった。

miR-124 を用いた全身投与による関節リウマチの治療にエクソソームを利用するにはエクソソームの改変または質の向上が必要と思われた。

## 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 15 件)

Kusuki M, Osawa K, Arikawa K, Tamura M, Shigemura K, Shirakawa T, Nakamura T, Nakamachi Y, Fujisawa M, Saegusa J, Tokimatsu I. Determination of the antimicrobial susceptibility and molecular profile of clarithromycin resistance in the Mycobacterium abscessus complex in Japan by variable number tandem repeat analysis. Diagn Microbiol Infect Dis.2018, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.008. 査読有

Uemura S, Nishimura N, Hasegawa D, Shono A, Sakaguchi K, Matsumoto H, Nakamachi Y, Saegusa J, Yokoi T, Tahara T, Tamura A, Yamamoto N, Saito A, Kozaki A, Kishimoto K, Ishida T, Nino N, Takafuji S, ETV6-ABL1 fusion combined with monosomy 7 in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Int J Hematol. 2018.107(5). 604-609. 査読有

Oki T, Tanaka H, Imanishi T, Nakamachi Y, Saegusa J, Kawano S, Hirata KI, Nishimura Y. Associations between left ventricular diastolic function and right ventricular function in patients with and without preserved left ventricular ejection fraction. J Echocardiogr. 2017 doi: 10.1007/s12574-017-0363-3. 査読有

Nagai H, Takaoka Y, Sugano A, Nakamachi Y, Kawano S, Nishigori C. Identification of a heterozygous p.Gly568Val missense

mutation in the TRPV3 gene in a Japanese patient with Olmsted syndrome: In silico analysis of TRPV3. *J Dermatol.* 2017;44(9):1059-1062. 査読有

Yamamoto K, Minami Y, Yakushijin K, Mizutani Y, Inui Y, Kawamoto S, Matsui K, Nakamachi Y, Kawano S, Matsuoka H, Minami H. Coexpression of NUP98/TOP1 and TOP1/NUP98 in de novo Acute Myeloid Leukemia with t(11;20)(p15;q12) and t(2;5)(q33;q31). *Cytogenet Genome Res.* 2016;150(3-4):287-292. 査読有

Yamamoto K, Kawamoto S, Mizutani Y, Yakushijin K, Yamashita T, Nakamachi Y, Kawano S, Hayashi Y, Matsuoka H, Minami H. Mixed Phenotype Acute Leukemia with t(12;17)(p13;q21)/TAF15-ZNF384 and Other Chromosome Abnormalities. *Cytogenet Genome Res.* 2016;149(3):165-170. 査読有

Noguchi Y, Onishi A, Nakamachi Y, Hayashi N, Harahap NI, Rochmah MA, Shima A, Yanagisawa S, Morisada N, Nakagawa T, Iijima K, Kasagi S, Saegusa J, Kawano S, Shinohara M, Tairaku S, Saito T, Kubo Y, Saito K, Nishio H. Telomeric Region of the Spinal Muscular Atrophy Locus Is Susceptible to Structural Variations. *Pediatr Neurol.* 2016;58:83-9. 査読有

Akashi K, Saegusa J, Nakamachi Y, Nakazawa T, Kumagai S, Morinobu A. Hepatitis B Virus Reactivation Following Salazosulfapyridine Monotherapy in a Patient with Rheumatoid Arthritis. *Intern Med.* 2016;55(10):1371-3. 査読有

Nakamachi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124: a promising therapeutic agent for various human diseases, including rheumatoid arthritis. *RNA & DISEASE.* 2016 doi: 10.14800/rd.1252 may. 査読有

Kikuma T, Nakamachi Y, Noguchi Y, Okazaki Y, Shimomura D, Yakushijin K, Yamamoto K, Matsuoka H, Minami H, Itoh T, Kawano S. A new transcriptional variant and small azurophilic granules in an acute promyelocytic leukemia case with NPM1/RARA fusion gene. *Int J Hematol.* 2015 Dec;102(6):713-8. 査読有

Nagai H, Oiso N, Tomida S, Sakai K, Fujiwara S, Nakamachi Y, Kawano S, Kawada A, Nishio K, Nishigori C. Epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation with noncicatricial alopecia: identification of a recurrent p.P25L mutation in KRT5 in four affected family members. *Br J Dermatol.* 2016;174(3):633-5. 査読有

Nishida K, Morioka I, Nakamachi Y, Kobayashi Y, Imanishi T, Kawano S, Iwatani S, Koda T, Deguchi M, Tanimura K, Yamashita

D, Nibu K, Funakoshi T, Ohashi M, Inoue N, Iijima K, Yamada H. Neurological outcomes in symptomatic congenital cytomegalovirus-infected infants after introduction of newborn urine screening and antiviral treatment. *Brain Dev.* 2016;38(2):209-16. 査読有

Fujiwara S, Nagai H, Nakamachi Y, Kawano S, Nishigori C. Refractory metastasis of cutaneous angiosarcoma showing complete response to pazopanib. *Eur J Dermatol.* 2015;25(1):71-3. 査読有  
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.* 2016;75(3):601-8. 査読有

Tairaku S, Taniguchi-Ikeda M, Okazaki Y, Noguchi Y, Nakamachi Y, Mori T, Kubokawa I, Hayakawa A, Shibata A, Emoto T, Kurahashi H, Toda T, Kawano S, Yamada H, Morioka I, Iijima K. Prenatal genetic testing for familial severe congenital protein C deficiency. *Hum Genome Var.* 2015 25;2:15017. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

山下 智江、小林 曜子、菊間 知恵、東口 佳苗、岡崎 葉子、中町 祐司、三枝 淳、河野 誠司、家子 正裕. 当院で経験したループスアンチコアグラント・低プロトロンビン血症症候群(LAHPS)の一症例、第 18 回日本検査血液学会学術集会 2017.7.22、札幌コンベンションセンター-(北海道)

鯉田 祐佳里、山本 克也、山下 智江、野口 依子、菊間 知恵、岡崎 葉子、中町 祐司、河野 誠司、三枝 淳、t(12;17)(p13;q21)とその他染色体異常を有する Mixed Phenotype Acute Leukemia(MPAL)の 1 症例、第 18 回日本検査血液学会学術集会 2017.7.22、札幌コンベンションセンター-(北海道)

松本 久幸、松井 啓治、山下 智江、菊間 知恵、岡崎 葉子、中町 祐司、山本 克也、三枝 淳、t(10;17)(p15;q21)を有する AML の一例、第 64 回日本臨床検査医学会学術集会、2017.11.18、国立京都国際会館(京都府)

大藪 智奈美、佐藤 伊都子、東口 佳苗、中町 祐司、三枝 淳、電気化学発光免疫測定法によるエベロリムス血中濃度測定試薬“エクルーシス®試薬エベロリムス”の基礎的検討、第 57 回日本臨床化学学会年次学術集会、2017.107 北海道大学(北海道)

岡崎 葉子、中町 祐司、野口 依子、松井 啓治、松本 久幸、小林 曜子、菊間 知恵、東口 佳苗、林 伸英、三枝 淳、稀な切断点を認めた CFBF-MYH11 融合遺伝子の一症例、第 17 回日本検査血液学会学術集会、2016.8.6、福岡国際会議場(福岡)

山下 智江、鯉田 祐佳里、小林 曜子、菊

間 知恵, 松本 久幸, 東口 佳苗, 下村 大樹, 大野 仁嗣, 中町 祐司, 河野 誠司、Hairly cell leukemia の一症例、第 17 回日本検査血液学会学術集会、2016.8.6、福岡国際会議場(福岡)

Noguchi Y, Nakamachi Y, Hyashi N, Saegusa J, Kawano S, Nakagawa T, Ai Shima, Nishio H. Telomeric regions of the spinal muscular atrophy locus are susceptible to structural variations. IFBLS、2016.9.1. 神戸国際会議場(兵庫県)

Jikimoto T, Sakota H, Ohta Y, Nakamachi Y, Hayashi N, Kasagi S, Saegusa J、TRIPS technology using RFID tags in the phlebotomy room of Kobe University hospital、IFBLS、2016.9.1. 神戸国際会議場(兵庫県)

Matsui K, Noguchi Y, Okazaki Y, Nakamachi Y, Masaki T, Nakano E, Nishikigori C. Xeroderma pigmentosum (XP) genetic screening in Kobe University Hospital. IFBLS、2016.9.1. 神戸国際会議場(兵庫県)

山下 智江、鯉田 祐佳里、坂庭 里子、長濱 裕、東口 佳苗、中町 祐司、林 伸英、三枝 淳、従来と異なるエピトープを認識する抗体を用いた D ダイマー測定試薬の基礎的検討、第 65 回日本医学検査学、2016 .9.3、神戸国際会議場(兵庫県)

中町 祐司、大沼 健一郎、生戸 健一、野口 依子、三枝 淳、河野 誠司、MicroRNA-124 はラットアジュバント関節炎モデルでの関節炎を抑制する、第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2015.4.25、名古屋国際会議場(愛知県)

Noguchi Y, Nakamachi Y, Joo K, Okazaki Y, Higashiguchi K, Hayashi N, Katsuya Yamamoto K, Kawano S、Conversion from nuclear bilobation to indentation in BCR/ABL1-positive AML.第 64 回日本医学検査学会.2015.5.17.福岡国際会議場(福岡)

Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, Noguchi Y, Saegusa J, Kawano S. MicroRNA-124 Inhibits Progression of Adjuvant-induced Arthritis in Rats.EULAR Congress. 2015.6.11.roma(Italy)

蝦名 康彦、中町 祐司、谷村 憲司、森實 真由美、平久 進也、出口 雅士、河野 誠司、山田 秀人、先天性アンチトロンピン欠乏症合併妊婦における遺伝子解析結果と臨床像の検討、第 1 回産婦人科遺伝診療学会、2015.12.18.長崎ブリックホール(長崎県)

岡崎 葉子、池田 真理子、平久 進也、中町 祐司、野口 依子、林 伸英、笠木 伸平、三枝 淳、河野 誠司、森岡 一朗、山田 秀人、戸田達史、飯島一誠、出生前に診断した複合ヘテロ接合体先天性プロテイン C 欠損症の遺伝子解析、第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、2015.11.21.長良川国際会

議場(岐阜県)

〔図書〕(計 1 件)  
生戸 健一、中町 祐司、河野 誠司、エヌ・ディー・エス、エクソソーム機能研究最前線、2017、282(187-193)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
中町 祐司(NAKAMACHI YUJI)  
神戸大学・医学部附属病院・臨床検査技師  
研究者番号：80379429

(2)研究分担者  
河野 誠司(KAWANO SEIJI)  
神戸大学・医学部附属病院・特命教授  
研究者番号：20351512

(3)連携研究者  
三枝 淳(SAEGUSA JUN)  
神戸大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20514970

(4)研究協力者  
笠木 伸平(KASAGI SHINPEI)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80457051