

令和元年6月18日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09894

研究課題名(和文) マイクロRNAの関節リウマチ関連標的分子に関する研究

研究課題名(英文) Study of target molecules of rheumatoid arthritis-associated miRNA.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年関節リウマチの病態にマイクロRNAによる制御の破綻が深く関与していることがあきらかになっている。われわれは関節リウマチの滑膜で特異的に減少するmiR-124.3pを発見し着目している。われわれは、miR-124.3pが、MCP1やCDK2などのmRNA発現を制御し、サイトカイン発現や細胞周期の制御に関与していることを従来明らかにしてきたが、今回、miR-124.3pがMAPK14mRNAやRANKLmRNAの発現を制御していることをルシフェラーゼレポーターアッセイにて証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれは、関節リウマチの滑膜細胞にて特異的に発現低下しているmiR-124.3pに注目してきた。これまでに、ケモカインであるMCP1や細胞周期制御因子のCDK2のmRNA発現がmiR-124.3pにて抑制されるため、ケモカインや細胞周期を制御することにより関節リウマチの病態に抑制的に働くことを明らかにしてきたが、今回MAPK14がmiR-124.3pの標的分子であることが明らかとなり、miR-124.3pの多彩な生理学的活性の存在を示した。miR-124.3pの関節リウマチの治療薬としての可能性がさらに高まった。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs are deeply involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. We are interested in miR-124.3p, which is a specifically decreased miRNA in the synovium of rheumatoid arthritis patients. We discovered MCP1, a inflammatory cytokine, and CDK2, a cell cycle regulator, as the specific target mRNAs of miR-24.3p before. In this study, we newly discovered MAPK14 and RANKL as target mRNAs of miR-124.3p using Luciferase reporter assay.

研究分野：膠原病リウマチ学

キーワード：マイクロRNA 関節リウマチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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自己免疫疾患である。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 miRNA を網羅的に解析し、RA で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 (miR-124.3p) を同定した。我々は miR-124a に注目し、miRBase database の miRNA 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うと、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、MCP-1 の産生を抑制した。また 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。さらに、我々はラット・アジュバント関節炎モデルを用いて、ヒト miR-124a のホモログである miR-124 の前駆体を投与することにより、関節炎の軽減、骨破壊の軽減、破骨細胞の減少がみられ、破骨細胞の減少の原因として局所で miR-124a のターゲットである NFATc1 のレベルが減少していることを示した。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の可能性が高いことが示唆されるにいたった。

我々は、アップデートされた miRBase database 検索にて、miR-124.3p の標的候補分子として新たに CTGF、Adiponectin receptor2 (AdipoR2)、MAPK14 を抽出した。CTGF は近年、RA 関節炎に促進的に働くことが見出され注目されている。Adiponectin には向炎症作用があり、RA のバイオマーカーとして注目されており、Adiponectin receptor 発現細胞の炎症による活性化を促進する。P38MAPK(MAPK14)は、TLR を介する炎症性刺激の経路の重要分子で NFkB の活性化につながる。いずれも miR-124.3p が標的 mRNA として制御すれば、RA 抑制的に作用することが推定される。以上のように CTGF、AdipoR2、MAPK14 が miR-124.3p の標的分子である可能性があること、各分子が RA 病態への関与が知られていることから、RA では miR-124.3p の発現低下のために CTGF、AdipoR2、MAPK14 などの発現が調節されないことが RA 滑膜の炎症を促進しているのではないかと、miR-124.3p を高発現させればそれらの媒介する多彩な炎症機転を阻止でき、miR-124.3p の新たな薬理学的効果が明らかにできるのではないかとという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、RA にて特異的に減少する miRNA-124.3p の標的 mRNA に狙いを定め、RA の病態の中心である滑膜繊維芽細胞を用いて、RA の病態における miRNA-124.3p の作用機序を詳細に明らかにすることを目的とした。本研究では、RA の病態における miR-124.3p の関与を滑膜線維芽細胞の機能抑制という視点から解析した。具体的には、1)miR-124.3p が CTGF、AdipoR2、MAPK14 の mRNA に直接結合し翻訳抑制作用をしているか。2)miR-124.3p を強制発現させると、ヒト滑膜線維芽細胞において CTGF、AdipoR2、MAPK14 の細胞生理機能が阻害されるか、を目的とした。

3. 研究の方法

研究方法は、まず CTGF、AdipoR2、MAPK14 が miRNA-124.3p の標的分子であるかを検討する方針を立てた。E11 に miRNA-124.3p 前駆体をリポフェクタミン 2000 と混合して添加し、miRNA-124.3p を強制発現させて、CTGF、AdipoR2、MAPK14、RANKL 各 mRNA の 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(CTGF-Luc、AdipoR2-Luc、MAPK14-Luc、RANKL-Luc、CTGF-Luc) E11 細胞に pre-miRNA-124.3p とそれぞれのルシフェラーゼベクターを共強制導入して、CTGF-Luc の活性が低下するか検討した。活性が低下した場合、3' UTR の配列の変異体をつくり

特異性を確認した。

4 . 研究成果

E11 において、MAPK14-Luc のルシフェラーゼ活性を miR124-3p が抑制し、MAPK14mRNA のシードシーケンス変異を入れた MAPK14-Luc(mut) では、miR124.3p による抑制が解除された(図 1)。RANKL においても、同様に RANKLmRNA のシードシーケンス変異を入れた RANKL-Luc(mut) では、miR124.3p による抑制が解除された(図 2)。以上により、少なくとも MAPK14 や RANKL が miR124.3p の新たな標的分子であることが明らかになった。CTGF や AdipoR2 では、miR124.3p による同様の抑制結果は認められなかった。

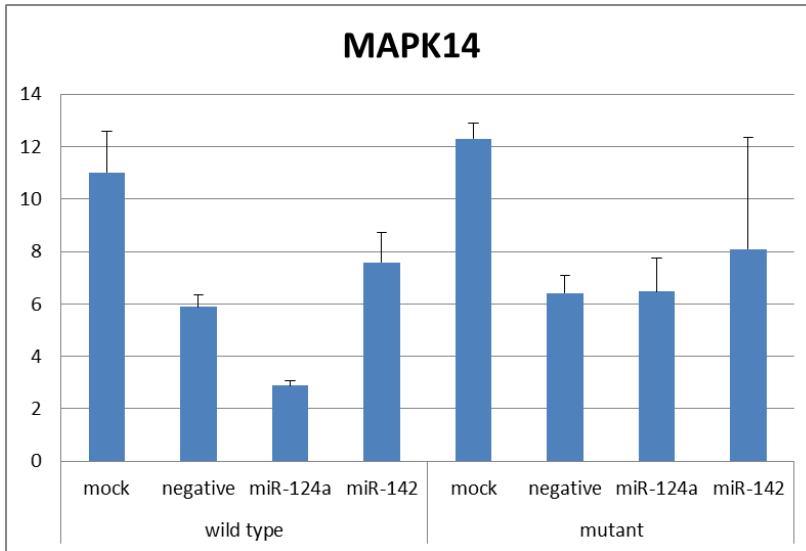


図1 MAPK-Luc への miR-124a の抑制効果

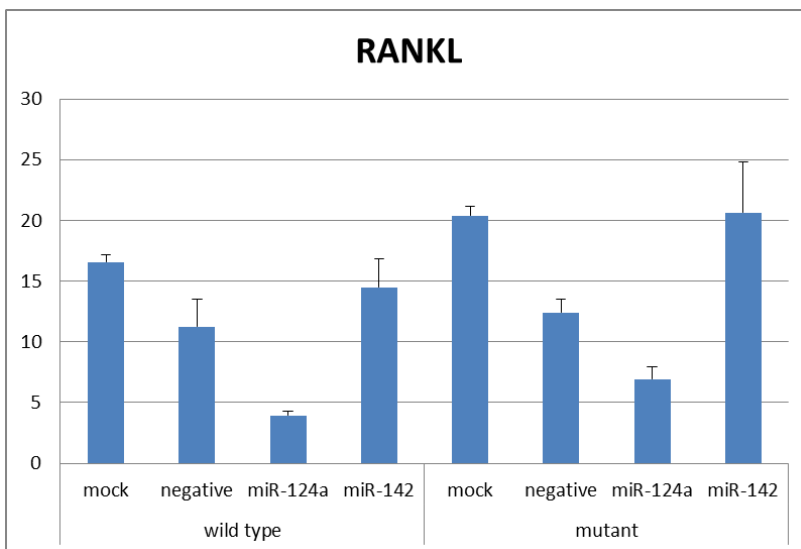


図2 RANKL-LucへのmiR-124aの抑制効果

以上の結果より、これまで知られているCDK2、MCP1以外にMAPK14やRANKLがmiR124.3pの下流分子であることがわかった。これらの成果は、リウマチ関連miRNAの下流分子として世界で初めて明らかになったものであり、RA病態解析に大きな意味を持つ。他疾患では同じくsmall RNAの一種であるsiRNAについて臨床薬として実用化(パチシランやデフィプロチド)が始まっていることから、今後は、このように多彩なRA病態に関与することが明らかになっているmiR124.3pについて、RA治療への応用に弾みがつく研究成果と考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Ohnuma K, Saegusa J, Nakamachi Y, Kawano S, et al. MicroRNA-124 inhibits TNF- and IL6-induced osteoclastogenesis. Rheumatol int. 10.1007/s00296-018-4218-7. (査読あり)
2. Nakamachi Y, Saegusa J, and Kawano S. MicroRNA-124: a promising therapeutic agent for various human diseases, including rheumatoid arthritis. RNA & Disease. 2016, 3: e1252. Doi:14800/rd 1252. (査読なし)

〔学会発表〕(計1件)

大沼 健一郎, 笠木 伸平, 生戸 健一, 野口 依子, 中町 祐司, 三枝 淳, 河野 誠司. マイクロ RNA-124 は TNF- /IL-6 依存性破骨細胞分化を抑制する. 日本臨床検査医学会学術集会 (2018)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 三枝淳

ローマ字氏名: Saegusa Jun

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 講師

研究者番号(8桁): 20514970

研究分担者氏名: 中町祐司

ローマ字氏名: Nakamachi Yuji

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 臨床検査技師

研究者番号(8桁): 80379429

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 野口依子

ローマ字氏名: Noguchi Yoriko

研究協力者氏名: 笠木伸平

ローマ字氏名: Kasagi Shimpei

研究協力者氏名: 大沼健一郎

ローマ字氏名: Onuma Kenichiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。