

令和元年6月19日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20038

研究課題名(和文)滑膜における14番染色体microRNA clusterの機能解明

研究課題名(英文)The function of microRNA cluster on 14 chromosome of synovium

研究代表者

田中 陽子(Tanaka, Yoko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞老化プロジェクト・研究員

研究者番号：40647434

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)：本研究は、関節リウマチ(RA)の病態においてmicroRNAがどのような機能を果たしているかを明らかにすることが目的である。RAにおいて免疫細胞や滑膜細胞に発現するmiRNAは調べられてきたが、詳細な機能は十分に明らかにされていなかった。我々はRA病態の本体である滑膜細胞に発現するmiRNAに注目して研究を行った。次世代シーケンシングという方法を用いて滑膜において発現が低下しているmiRNAを検出し、患者由来滑膜細胞や動物モデルを用いてその機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンシングを用いることによって、網羅的にmiRNA発現を調べることができ、塩基変換や付加についても同時に調べることができた。関節リウマチ滑膜において発現が下がっているmiRNAのうち、miR-381は塩基変換を受けており、総量の20%ほどのmiRNAにA-to-I RNA editingが誘導されていることが明らかとなった。これらのmiRNAの機能を解析することにより、RA滑膜細胞におけるmiRNAの機能を明らかにすることに貢献した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify how miRNAs play in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). MicroRNA is a small untranslated RNA around 20 base pairs that binds target mRNAs and suppress translation into protein. Although miRNAs expressed in immune cells and synoviocytes in RA have been examined, their detailed function have not been fully elucidated. We focused on miRNAs expressed in synoviocytes, which are the main player of RA pathogenesis. Next-generation sequencing was used to detect miRNAs that are down-regulated in synovium, and their functions were elucidated using synoviocytes derived from patients with RA and animal models.

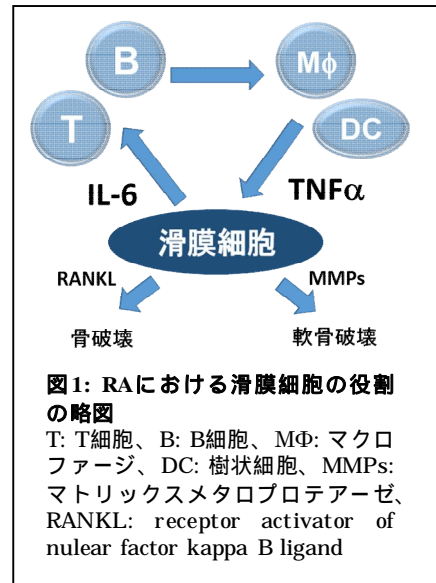
研究分野：細胞生物学

キーワード：rheumatoid arthritis synovium microRNA A-to-I RNA editing NGS

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

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA: rheumatoid arthritis) は人口のおよそ 1% を占め、日本では約 70 万人が罹患していると推測されている。免疫細胞が炎症を誘導し、滑膜細胞による軟骨破壊、破骨細胞の活性化による骨破壊によって関節が破壊される疾病である。自己抗原反応性の T 細胞や自己抗体を産生する B 細胞により臓器に炎症が誘導され、関節の破壊に至ると考えられている。近年では関節破壊までに関わる TNF α (Tumor necrosis factor α) IL-6 (interleukin-6) などの細胞間シグナルを司る分子を生物学的製剤によって抑えることにより RA の治療が改善した。これらの分子が RA 病態にとって非常に重要な分子であることはその結果より明らかである (図 1)。RA の関節内炎症において TNF α を受容



容することによって IL-6 を産生し、炎症を助長している細胞が滑膜細胞である。その他にも滑膜細胞は炎症によって活性化され軟骨基質をタンパク質分解酵素により分解する事で関節を破壊する。滑膜細胞は滑液の産生により関節内の恒常性を保っている細胞群と考えられているが、RA 病態では炎症シグナルの一端を担っている。しかしながら病態における詳細なメカニズムは十分に明らかではない。滑膜細胞を研究に使用する場合は生体内から取り出した滑膜組織をコラゲナーゼなどにより分解し、血球細胞を取り除き、培養皿に接着したものが RA 関連の多くの実験で用いる。これらの細胞は滑膜繊維芽細胞 (FLS: fibroblast-like synoviocyte) と呼ばれる。申請者はこの細胞、ヒト滑膜サンプル、動物モデルを用いて miRNA が RA 病態にどのように関与しているかを明らかにしてきた。解析のスタートは次世代シーケンシングである (NGS; next generation sequencing)。NGS を使用することにより array では検出されてこなかった miRNA の塩基置換を RA 滑膜由来の RNA から検出することができた。データベースに登録のない新規 miRNA も検出し、解析を行ってきた (論文未発表)。A-to-I RNA editing は転写後に ADAR (adenosine deaminases acting on RNA) という酵素によりアデノシンがイノシンに置換される現象であり、20 塩基ほどの短い RNA である miRNA においても A-to-I RNA editing が誘導されることが 2007 年に報告された。2015 年には miR-455 において editing が誘導されないことによりターゲット遺伝子を抑制することができなくなり、がん細胞の増殖を抑制できなくなることが報告された。申請者のこれまでの研究より、RA/OA 滑膜に発現する miR-381、376c、411 に A-to-I RNA editing が誘導されていることが明らかにされてきており、RA 病態における機能を明らかにすることが期待される。

2. 研究の目的

MicroRNA (miRNA) の関節リウマチ (RA) の病態における機能を明らかにし、治療・診断に発展させる土台を築くことが目的である。2008 年以降、コントロール群と比較して RA の滑膜や末梢血単核球に特異的に発現している miRNA がいくつか報告されているが、これらの miRNA の RA における機能は未だに明らかになっておらず、各々の miRNA ターゲット遺伝子の実験的な特定もようやく世界中のデータがまとめられ始めた。本研究では miR-381 などを含む miR-379/410 クラスターの RA における機能を明らかにするとともに、自己免疫性疾患の miRNA の役割を解析する技術の開発を行う。

3 . 研究の方法

これまでに RA 滑膜において miR-381、-376c、-411 の発現が低下していることを明らかにしてきた。特に miR-381 は 2 か所に A-to-I RNA editing が誘導されていたことから、この miRNA に注目して解析を行うことにした。MiR-381 発現ベクター (pcDNA3.1 ベクター使用) を作成し、FLS における過剰発現解析を行った。調べる項目は TargetScan などの予測ソフトを用いてターゲット遺伝子をリストアップし、DAVID による ontology 解析によって影響を与える可能性のある機能について解析を行った。MiR-381 を含む miR-379/410 クラスターは過去の報告より (Formpasa A et al., *Oncogene*, 2014) 細胞増殖や細胞遊走などに関与していると考えられ、軟骨・骨破壊に重要な要素であるため、解析を行った。

ターゲット遺伝子の特定は浅原研究室にあるルシフェラーゼアッセイ用ターゲット遺伝子ライブラリー(約 1 万遺伝子)を使用した。このライブラリーは 5'UTR (untranslated region) 、CDS (coding sequence) 、3'UTR を含んでいる。MiRNA の多くは 3'UTR に結合しターゲット遺伝子の翻訳を抑制していると考えられているが、Kameswaran V ら (*Cell Metab.* 2014) の報告によると HITS-CLIP (High-throughput sequencing of crosslinked and immunoprecipitated RNA) により、miRNA とターゲット遺伝子が結合している RISC に含まれるターゲット遺伝子配列の 46% が 3'UTR であり、それ以外は 5'UTR や CDS である。そのため、5'UTR-CDS-3'UTR の領域を網羅したルシフェラーゼアッセイが適当であると考えた。申請時の研究室では miR-34a のターゲット遺伝子をこの方法を用いて同定した。

4 . 研究成果

本研究のこれまでの結果より、次世代シーケンシングによって miRNA エディティングが 4 種類検出されており、miRNA エディティングが誘導されている miRNA は RA 滑膜に特異的に発現が低いことが明らかとなっていた。4 種類のうち 2 種類は miR-381 のシード配列に誘導されており、wild type (WT)、edit1、edit2 をそれぞれ滑膜細胞に過剰発現させ機能を解析した。その結果、WT と edit1 は細胞遊走、edit1 と edit2 は細胞増殖を抑制することが明らかとなり、関節炎動物モデルに miR-381 mimic を投与したところ治療効果がある事が明らかとなった。しかしながら、これら 3 つのタイプの miR-381 のターゲット遺伝子は従来の予測ソフトでは特定が難しかったため、5000 遺伝子のルシフェラーゼレポーターベクターを用いてターゲット遺伝子の特定を行った。このベクターは遺伝子の 5' UTR (untranslated region)、CDS (coding sequence)、3' UTR を含んでおり、従来考えられてきた miRNA の結合領域 3' UTR に加えて、近年報告がある 5'UTR や CDS が含まれる新しいスクリーニングシステムである。この手法により、注目する miRNA の機能がさらに明らかになると考えられる。5000 遺伝子のレポーターベクターを 384 well に滴下し、miR-381 (empty/WT/edit1/edit2) 発現ベクターとトランスフェクション試薬、細胞の順に滴下し、ルシフェラーゼアッセイを行った。過剰発現によりルシフェラーゼ活性の低下したもののうち、それぞれ低下率上位の遺伝子 259 個を抽出した。さらに 384 well を用いて 259 遺伝子について 4 回ルシフェラーゼアッセイを行い、2 回以上同じ傾向が得られた遺伝子を 52 個抽出した。次にスケールをアップし、96 well にて同様の結果が得られた遺伝子を 23 個抽出した。23 遺伝子のうち、滑膜細胞を用いた実験で miR-381 (WT/edit1/edit2) 過剰発現により発現が低下している遺伝子は 17 遺伝子ある事が明らかとなった。遺伝子 A については WT と edit1 により発現が抑制されることによって細胞増殖に影響を与えている事が明らかとなり、遺伝子 B については edit1 と edit2 により発現が抑制されることによって細胞増殖影響を与えていることが明らかとなった。これらの発見により、関節リウマチの病態を制御する miRNA の機能の一端を明らかにすることができ、日本リウマチ学会

ベーシックリサーチカンファレンスにおいて優秀演題賞を受賞した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Mitsumura T, Ito Y, Chiba T, Matsushima T, Kurimoto R, Tanaka Y, Kato T, Uchida K, Ito T, Yamamoto K, Eishi Y, Kitagawa M, Miyazaki Y, Inase N, Asahara H. Ablation of miR-146b in mice causes hematopoietic malignancy. *Blood Adv.* 2(23): 2018

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 田中陽子、高田修治、飯笹久、Artemis Hatzigeorgiou、宮澤慎一、古松毅之、西田圭一郎、浅原弘嗣: microRNA-381 の A to I RNA editing による関節炎制御メカニズムの解明. 第 40 回日本分子生物学会. 神戸. 12 月 9 日, 2017
2. 田中陽子、高田修治、宮澤慎一、古松毅之、西田圭一郎、浅原弘嗣: microRNA-381 による関節炎制御と新規レポーターライブラリーシステムを用いたターゲット遺伝子の特定: 第 4 回日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス. 東京. 10 月 13 日, 2017
3. 田中陽子、高田修治、飯笹久、Artemis Hatzigeorgiou、宮澤慎一、古松毅之、西田圭一郎、浅原弘嗣: 関節炎における microRNA-381 の機能解明. 第 39 回日本分子生物学会. 横浜. 11 月 30 日 2016
4. Yoko Tanaka-Watanabe, Shuji Takada, Hiroshi Asahara: A to I RNA editing of microRNA-381 dysregulates proliferation of fibroblast-like synoviocytes. *Cell Symposia: Functional RNAs, Guangzhou (China), Nov7 2016*
5. Yoko Tanaka-Watanabe, Shuji Takada, Shin-ichi Miyazawa, Takauki Furumatsu, Keiichiro Nishida, Hiroshi Asahara: MicroRNA-381 mimic resulted in a therapeutic effect on arthritis by controlling several functions of fibroblast-like synoviocytes. *Cold Spring Harbor Asia conference on Bone & Cartilage: From Development to Human Diseases, Suzhou (China), Oct 25 2016*
6. 田中陽子、高田修治、宮澤慎一、古松毅之、西田圭一郎、浅原弘嗣. microRNA-381 による関節炎の制御: 第 3 回日本リウマチ学会ベーシックカンファレンス. 東京. 10 月 14 日, 2016
7. Yoko Tanaka-Watanabe, Shuji Takada, Iizasa Hisashi, Artemis Hatzigeorgiou, Shin-ichi Miyazawa, Takayuki Furumatsu, Keiichiro Nishida, Hiroshi Asahara: MicroRNA-381 ameliorates arthritis by controlling functions of fibroblast-like synoviocytes, which are affected by A to I RNA editing. *EULAR 2016, London (UK), Jun 8 2016*

〔図書〕(計 1 件)

1. 三ツ村隆弘、田中陽子、浅原弘嗣: microRNA と疾患. *Clinical Immunology & Allergy*. 67(6):629-635. 2017

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

特になし

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。