

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08407

研究課題名(和文) 関節リウマチにおけるエクソソームの病態への関与の解明

研究課題名(英文) Role of exosomes in the pathology of rheumatoid arthritis

研究代表者

中町 祐司 (Nakamachi, Yuji)

神戸大学・医学部・再雇用職員

研究者番号：80379429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 関節リウマチの病態にはマクロファージの遊走が関与している。マイクロRNA-124はラットアジュバンド関節炎モデルにおいて関節炎を抑制するが、詳細な機序は不明である。

関節リウマチ滑膜細胞、変形性関節炎滑膜細胞、マイクロRNA-124高発現関節リウマチ滑膜細胞から分泌されるエクソソームを用いて検討した。その結果、関節リウマチ滑膜細胞から分泌されるエクソソームはマクロファージの遊走を促進し、マイクロRNA-124高発現滑膜細胞から分泌されるエクソソームはこれを抑制した。このことから、マイクロRNA-124による関節炎抑制の一因はエクソソームによるマクロファージ遊走の抑制が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチは関節滑膜へのマクロファージなどの炎症細胞の浸潤および滑膜細胞の増殖をともなう原因不明の自己免疫疾患である。

エクソソームは細胞間コミュニケーション物質として注目されているが、関節リウマチの病態におけるエクソソームの役割は不明な点も多い。

関節リウマチ滑膜細胞から分泌されるエクソソームがマクロファージの遊走を促進することは新たに知見であり、今後、関節リウマチの新たに治療法や診断法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Macrophage migration is involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. MicroRNA-124 ameliorated rat adjuvant-induced arthritis, but the detailed mechanism is unknown.

We investigated the effect of exosome derived from fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with rheumatoid arthritis (RA-FLS), FLS from patients with osteoarthritis, and microRNA-124 high-expressing RA FLS (RA-FLS miR-124) on macrophage migration. As a result, RA-FLS-derived exosomes promoted macrophage migration, but RA-FLS-miR-124-derived exosomes suppressed macrophage migration. Therefore, it was considered that one of the reasons for the suppression of arthritis by microRNA-124 is due to the suppression of macrophage migration by microRNA-124 high-expressing exosome.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は関節滑膜細胞へのマクロファージなどの炎症細胞の浸潤とそれに伴う滑膜細胞の増殖および関節の骨破壊を伴う原因不明の自己免疫疾患である。わが国においては 70 万人以上が罹患しており、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。治療においては生物製剤の有効例は多いが無効例や効果減弱例がみられること、治療費が高額であることが問題である。また、早期に診断するマーカー、治療効果予測するマーカーが存在しないなど課題が見られる。

エクソソームは蛋白質やマイクロ RNA を内包する脂質 2 重膜の物質で細胞間コミュニケーション物質として注目されている。がんの転移先はがん細胞由来のエクソソームによって決定されている¹⁾など、エクソソームは全身の生命維持や各種病態に深く関与している。RA では滑膜細胞 (FLS) や免疫細胞から分泌されるエクソソームは向炎症性物質が多く、局所の異なる細胞に取り込まれ RA の病態を促進すること²⁾が報告されている。

我々はヒト RA 関節滑膜細胞でマイクロ RNA-124(miR-124) が低発現であり、これが RA FLS の増殖および細胞走化性物質 monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1) の分泌を促進させ RA の病態に促進的に作用していること報告した³⁾。さらに 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局所に投与し、関節局所の miR-124 レベルを上昇させることにより関節滑膜への炎症細胞の浸潤や滑膜細胞の増殖を抑制し全身の関節炎や骨破壊を抑制することを明らかにした。また、骨破壊の抑制は破骨細胞の分化に重要な receptor activator of nuclear factor- κ B ligand(RANKL) や nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1) の発現を miR-124 が抑制するものであった⁴⁾。しかし、関節局所投与にもかかわらず、全身の関節炎および骨破壊を抑制する機序は不明であった。

この現象を説明するにはエクソソームの関与が強く示唆される。つまり、関節局所の炎症細胞内や滑膜細胞内の miR-124 濃度が上昇し、これらの細胞からの向炎症物質を多く含むエクソソームの分泌の減少や抗炎症物質を含むエクソソームの分泌増加などが考えられた。

2. 研究の目的

本研究は RA 滑膜細胞 (RA FLS)、RA FLS に miR-124 を高発現させた細胞 (RA FLS miR-124) 及び変形性関節炎関節滑膜細胞 (OA FLS) から分泌されるエクソソーム中の蛋白質やマイクロ RNA を網羅的に解析し、エクソソームが RA の病因にどのように関与しているかを解明し、新たな診断法や治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 滑膜細胞

人工関節置換術または滑膜切除術を受けた RA 患者および OA 患者から切除し破棄する FLS を用いた。RA FLS miR-124 は RA FLS に miR-124 mimic (Thermo fisher scientific) を RNAiMAX (Thermo fisher scientific) を用いてトランスフェクションして作成した。また、FlexiTube siRNA、Hs_PSM5_11、Hs_TNFAIP_6、Hs_PTX3_1 (QIAGEN) を RNAiMAX 用いて RA FLS または OA FLS にトランスフェクションし、蛋白発現を低下させた FLS を作成した。正常関節滑膜細胞 (NH FLS) は Cell Applications Ins から購入した。

(2) エクソソームの分離

細胞を無血清培地 AIM V medium (Thermo fisher scientific, MA) で 2~3 日培養後、培養上清を 300g 10 分間遠心後、上清を 2,000g 20 分間遠心し、その上清を 10,000g 30 分間遠心後、上清を 210,000g 4 で 60 分間超遠心を行い、エクソソームを分離した。

(3) 分離したエクソソームの確認

分離したエクソソームを PBS で懸濁し qNano (メイワフォーシス) で粒子径分布を確認した。

(4) 細胞から分泌されるエクソソーム粒子数の検討

RA FLS、RA FLS miR-124 および OA FLS 5×10^5 細胞を 3ml の AIM V medium で 2 日間培養し、エクソソームの分離を行った後、qNano で測定した。

(5) エクソソーム中蛋白の解析

5 人の患者から採取した RA FLS、RA FLS miR-124 および OA FLS を AIM V medium で 3 日間培養後、エクソソームを分離し RA FLS、RA FLS miR-124 および OA FLS ごとにまとめた。その後、前処理を行い、ペプチドを 200ng/ μ l に調整後、nanoLC-MS で分析を行い、Scaffold DIA (Proteome Software) で解析を行った。また、RA FLS と比べ 2 倍異なる蛋白については DAVID を用いて解析を行った。

(6) エクソソーム中のマイクロ RNA の解析

5 人の患者から採取した RA FLS、RA FLS miR-124 および OA FLS を AIM V medium で 3 日間培養後、RA FLS、RA FLS miR-124 および OA FLS ごとにまとめ、エクソソームを分離し、mirVanaTM miRNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific) で各エクソソームから small RNA を抽出した。マイクロ RNA の逆転写は miScript II RT Kit (QIAGEN) で行い、検出は miRNome PCR panels (QIAGEN) で 757 種類のマイクロ RNA の検出を行った。

(7) マクロファージの作成

THP-1 細胞 (理科学研究所) を PMA (Sigma-Aldrich) 150nM で 37、2 日間刺激しマクロファ-

ジを誘導した。

(8) エクソソームがマクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響の検討

マクロファージに終濃度 15 µg/ml の RA FLS、RA FLS miR-124 および OA FLS エクソソームを 1 日反応後、IFN- (R&D system) 20 ng/ml と LPS 0111 (Sigma-Aldrich) 10 pg/ml で 24 時間刺激した後、TRIZOL (ThermoFisher Scientific) で RNA を抽出後、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) で逆転写後、IL1、IL6、TNF、IL10 および GAPDH mRNA を QuantiTect SYBR® Green PCR Kits (QIAGEN) で測定し、GAPDH mRNA でノーマライズして評価した。

(9) エクソソームがマクロファージの遊走に及ぼす影響の検討

0.8 µm のカルチャーインサート(corning)にマクロファージ 1×10^5 個とエクソソーム 9 µg を含む無血清 RPMI (富士フィルム和光純薬) 200 µl、アウターウエルに無血清 RPMI 700 µl を入れ、24 時間反応後、カルチャーインサートを 700 µm の 10%FBS RPMI の入ったウエルに移動し 24 時間培養した。その後、カルチャーインサートの内側を綿棒でふき取り、カルチャーインサートの外側をメタノールで固定後、ギムザ染色を行い、100 倍で 5 視野の細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの確認

qNano で測定したエクソソームの粒径分布を図 1 に示す。6 例の RA FLS の中央値の平均は 89nm, 90%信頼区間の下限は 85nm, 上限は 143nm であった。

(2) RA FLS、RA FLS-miR124 から分泌されるエクソソーム粒子数

RA FLS(n=3)および RA FLS-miR124(n=3)から分泌されるエクソソームの粒子数に有意な差は見られなかった。また、OA FLS(n=1)から分泌されるエクソソームの粒子数にも差は見られなかった(図 2)

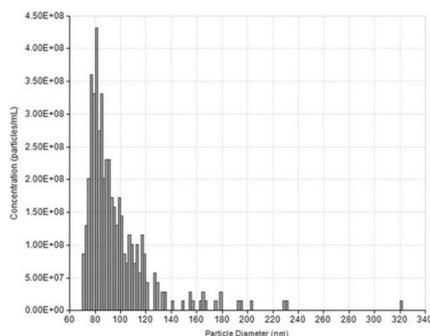


図1 エクソソームの粒子分布

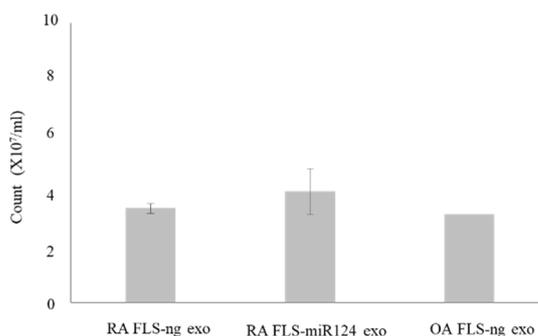


図2 エクソソーム粒子数

(3) エクソソーム中マイクロ RNA の検討

757 種類のマイクロ RNA を検討した結果、RA FLS エクソソーム、RA FLS miR124 エクソソーム、OA FLS エクソソーム間で CT 値が 2 以上の差があるマイクロ RNA は、RA FLS-miR124 の miR124-3p だけであった。

(4) エクソソーム中蛋白の検討

RA FLS エクソソーム、RA FLS miR-124 エクソソームおよび OA FLS エクソソーム含有の蛋白を解析した結果、1628 個の蛋白を検出した。その相関図を図 3 に示す。RA FLS miR-124 エクソソームが RA FLS エクソソームより 2 倍高値の蛋白を DAVIS で解析した結果、細胞の遊走に関与する蛋白が多いことが判明した。図 4 に RA FLS と比較して 4 倍以上異なる蛋白のベン図を示す。

(5) マクロファージのサイトカイン産生に及ぼす影響

OA FLS エクソソーム、RA FLS エクソソーム、RA FLS-miR124 エクソソーム 3 例づつで IL1、IL6、TNF および IL10 について検討した結果、全てのサイトカインで群間の有意な差は見られなかった。

(6) マクロファージの遊走に及ぼす影響

6 例の RA FLS、RA FLS miR-124 および OA FLS エクソソームおよび NH FLS のエクソソームで検討した結果、RA FLS エクソソームは NH FLS エクソソームや OA FLS エクソソームと比較して有意に遊走が亢進しており、RA FLS miR124 エクソソームは RA FLS エクソソームの遊走性の亢進を抑制した(図 5)。

また、RA FLS の PTX3 および TNFAIP2 と OA FLS の PSMB5 の発現を抑制させた細胞から分泌するエクソソームで検討を行った結果、PTX3 の発現を抑制した RA FLS から分泌するエクソソームは RA FLS エクソソームと比較してマクロファージの遊走を抑制した。また、PSMB5 の発現を抑制させた OA FLS から分泌されるエクソソームは OA FLS エクソソームと比較してマクロファージの遊走を亢進させた(図 6)。

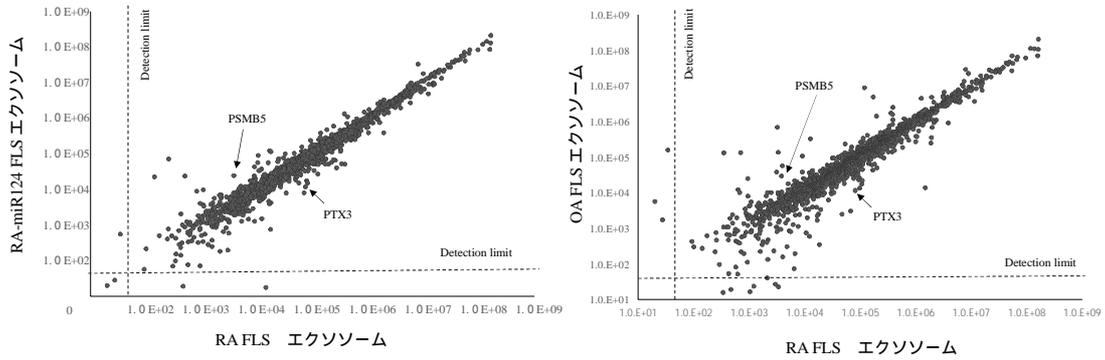


図3 エクソソームに含まれる蛋白の相関図

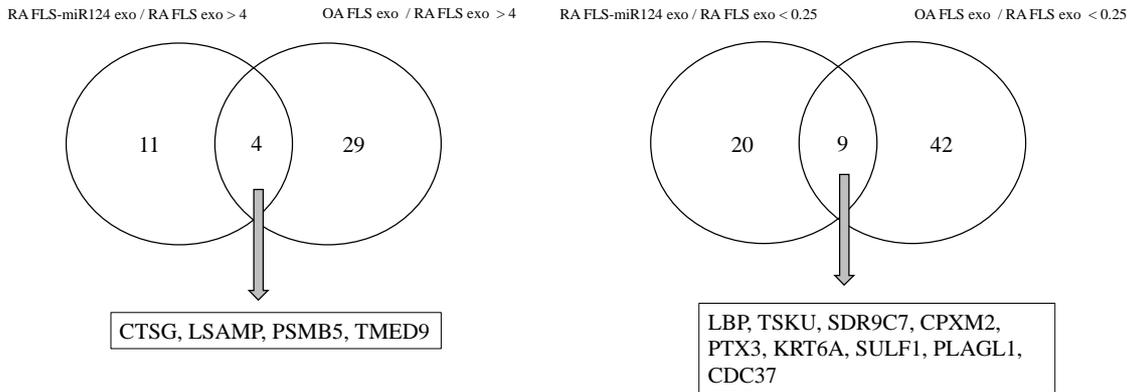


図4 エクソソームに含まれる蛋白のベン図

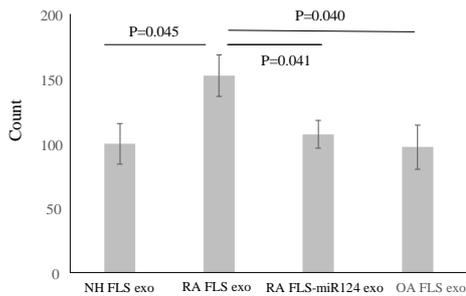


図5 THP-1誘導マクロファージの遊走

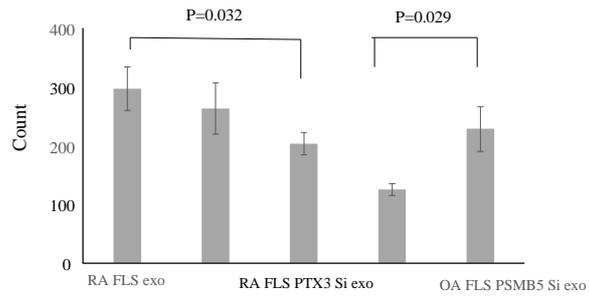


図6 THP-1誘導マクロファージの遊走に影響する蛋白

これらより、RA FLS はエクソソームを分泌することによりマクロファージの遊走を亢進させて RA の病態に促進的に作用している可能性が示唆された。また、miR-124 はこの RA FLS から分泌されるエクソソームの遊走作用を抑制することが示唆された。さらに、これらの現象には PTX3 や PSMB5 が関与していることが示唆された。

<引用文献>

- 1) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Nature. 2015 Nov 19;527(7578):329-35.
- 2) Pathogenic or Therapeutic Extracellular Vesicles in Rheumatic Diseases: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Vesicles. Cosenza S, Ruiz M, Maumus M et al, Int J Mol Sci. 2017 Apr 22;18(4):889.
- 3) MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. Nakamachi Y, Kawano S, Takenokuchi M, et al. Arthritis Rheum. 2009 May;60(5):1294-304.

4) MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats.
Nakamachi Y, Ohnuma K, Uto K, et al. Ann Rheum Dis. 2016 Mar;75(3):601-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河野 誠司 (Kawano Seiji) (20351512)	神戸大学・医学部附属病院・特命教授 (14501)	
研究分担者	三枝 淳 (Saegusa Jun) (20514970)	神戸大学・医学部附属病院・講師 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関