

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08906

研究課題名(和文) 関節リウマチ特異的ノンコーディングRNA相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Inetraction of non-coding RNA specific for rheumatoid arthritis

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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：miR124-3pは、軟骨細胞、破骨細胞、造骨細胞の増殖分化に影響を与えることが明らかになっており、RA病態に重要な分子として、我々はmiR124-3pの治療応用について研究を進めている。近年がん研究の領域を中心にmiR124-3pと相互作用する長鎖ノンコーディングRNA(IncRNA)の報告が見られるようになり、またIncRNAが臓器特異的に発現するという特性が指摘されている。本研究はヒトRAにおいて滑膜細胞におけるmiRNAとIncRNAの相互作用に着目し、RA滑膜におけるmiR124-3pと結合するIncRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAとIncRNAの相互作用に着目した本研究は、RA病態研究や治療応用に新しい展望を開くものである。本研究では、RNAデータベースを使ってRAの病態に特異的なmiR-124aと結合するIncRNAの候補を見つけ出し、これらの相互作用をヒトリウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞を用いて証明した。今後、条件の精密化により、真にmiR124-3pに結合しRA病態を制御するIncRNAを選別できるものと考えている。本研究は、IncRNA-miRNA相関を標的とした新しいRA診断・治療法の可能性を探るものであり、極めて新規性の高い創薬研究であり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA (miR)-124a is known to affect the growth or differentiation of chondrocytes, osteoclasts, and osteoblasts. We have been investigating this molecule because of its importance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Recently, long non-coding RNAs(IncRNAs) are reported to interact with miRNA in cancer research field. In addition, IncRNAs are expressed in an organ-specific manner. In this study, we isolated IncRNAs which bind to miR124-3p in RA-FLS by screening with RNA database analysis and miRNA-IncRNA binding assay followed by quantitative RT-PCR.

研究分野：Rheumatology

キーワード：長鎖ノンコーディングRNA 関節リウマチ マイクロRNA

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、研究者個人に帰属します。

## 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) の病態は、関節滑膜細胞 (FLS) の増殖・浸潤とそれに伴う関節破壊、炎症性サイトカイン・ケモカインの増加・炎症性細胞の関節への浸潤である。近年、RA の診療は急速に進歩したが、抗 CCP 抗体は早期 RA への感度は高くなく<sup>1)</sup>、近年開発された生物製剤・JAK 阻害薬においても無効例や効果減弱例が認められるなど、まだ解決すべき問題があり、RA の病態理解を深め、新たな診断・治療法を開発する必要がある。

マイクロ RNA (miRNA) は、メッセンジャー RNA (mRNA) から蛋白への翻訳を抑制する重要な分子であり<sup>2)</sup>、発生・分化・増殖・代謝などの生命現象を制御することが知られ<sup>3)</sup>、miRNA を用いた創薬の期待も高い<sup>4)</sup>。我々は RA-FLS で有意に発現量が低下している miR124-3p を同定し、miR124-3p を RA-FLS に強制導入を行うと、RA の病態に促進的に作用する CDK2 蛋白の発現を抑え、MCP-1 の産生を抑制することを見出した。また miR124-3p が CDK2 や MCP1 の mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、蛋白への翻訳を直接制御していることも明らかにした<sup>5)</sup>。次にラット・アジュバント関節炎モデルにて、miR124-3p の前駆体を局所投与することにより、関節炎の軽減・骨破壊の軽減・破骨細胞の減少を示すことを見出した。また RA の病態に促進的に作用する ITGB1、NFAT1、CBFBA、Sp-1 を miR124-3p が直接的に抑制することを明らかにした<sup>6)</sup>。このように RA-FLS の miR124-3p の低発現が RA の病態に促進的に作用している。

近年、同定された長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) は、クロマチン修飾因子と相互作用し、ターゲット遺伝子の発現を活性化あるいは不活性化することや、がんの領域では miR124-3p を制御する lncRNA あるいは、miR124-3p に制御される lncRNA が報告されている。また、ある種の lncRNA は miR124-3p と結合し miR124-3p の機能を抑制することが報告されている<sup>7)</sup>。RA においても NEATc1 や TUG1 などの lncRNA が発現していることが報告されているが<sup>8)</sup>、lncRNA が RA の病態に関与する意義や miRNA と lncRNA の相互作用については明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

RA において異常増殖し、骨破壊など RA の病態に強く関与している FLS における miRNA と lncRNA の相互作用に着目し、RA の病態における lncRNA の役割を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 滑膜細胞

同意の得られた、人工関節置換術または滑膜切除術を受けた RA 患者から切除し破棄する FLS を用いた。

#### (2) RA-FLS 中 miR124-3p に結合する lncRNA の検出

2 例の RA-FLS を対象として検討を行った。Opti-MEM (Invitrogen) に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) と 3' ビオチン化 miR124-3p 模倣核酸または 3' ビオチン化 scramble 模倣核酸を添加し、室温で 30 分間反応させた後、 $1 \times 10^6$  個の RA-FLS に細胞導入し、37、24 時間反応後、PBS で洗浄を行った。回収した細胞は  $\beta$ -Mercaptoethanol を加えた RNA Lysis Buffer (Promega) で溶解後、Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) と 4 で 5 時間アビジン・ストレプトアビジンと反応させた後、洗浄を行った。

Dynabeads 結合 RNA は TRIzol Reagent (Thermo Fisher) で抽出後、RNeasy mini kit (Qiagen) で DNA の除去と RNA のクリーンアップを行った。逆転写は RT2 First Strand kit (Qiagen) で行い、RT2 SYBER Green ROX qPCR mastermix (Qiagen) と RT2 lncRNA PCR Array (Qiagen) によるリアルタイム PCR 法で 84 種類の lncRNA を測定した。

3' ビオチン化 miR124-3p 模倣核酸に結合した RNA 量より 3' ビオチン化 scramble 模倣核酸に結合した RNA 量を差し引いた後、2 例の平均値で評価した。

#### (3) RA-FLS 中の lncRNA の発現量の検討

3 例の RA-FLS から TRIzol Reagent (Thermo Fisher) を用いて RNA を抽出し、DNase I (Thermo Fisher) で DNA を除去した後、QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) で逆転写を行い、QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) を用いてリアルタイム PCR 法で測定を行った。各 lncRNA の発現量は GAPDH 発現量で補正し評価した。

#### (4) lncRNA のノックダウンによる miR124-3p 発現量の検討

Opti-MEM (Invitrogen) に Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen) と 15 pmol の Hs\_PVT1\_5 FlexiTube siRNA (Qiagen)、Hs\_FLJ20618\_2 FlexiTube siRNA (Qiagen)、Hs\_H19\_3 FlexiTube siRNA (Qiagen)、Hs\_XIST\_1 FlexiTube siRNA (Qiagen)、Hs\_MGC4677\_3 FlexiTube siRNA (Qiagen)、Hs\_NEAT1\_2 FlexiTube siRNA (Qiagen) および AllStars Negative Control siRNA (Qiagen) を反応後、 $2 \times 10^5$  個の RA-FLS に細胞導入し、37 で 24 時間反応させた後、PBS で洗浄を行った。

RNA の抽出は TRIzol Reagent を用いて行い、逆転写は Mircuy LNA RT Kit (Qiagen) で行い、has-miR-124-3P miRCURY LNA miRNA PCR Assay、U6 snRNA (v2) miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen) および miRCIRU LNA SYBER Green PCR Kit (Qiagen) を用いて miR124-3p および RNUB6

の定量を行った。miR124-3p 発現量を RNUB6 発現量より補正して評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) RA-FLS 中 miR124-3p に結合する lncRNA の検出

- CT 値が 1 以上の miR124-3p に結合している lncRNA は NFAT1、TUG1、XIST、SNHG16、ZFAS1、JADRR、PVT1、CRNDE、RMRP、NBR2、HOTAIR、H19、MEG3 の 13 種類で NFAT1 の RNA 量が最大であった(図 1)。

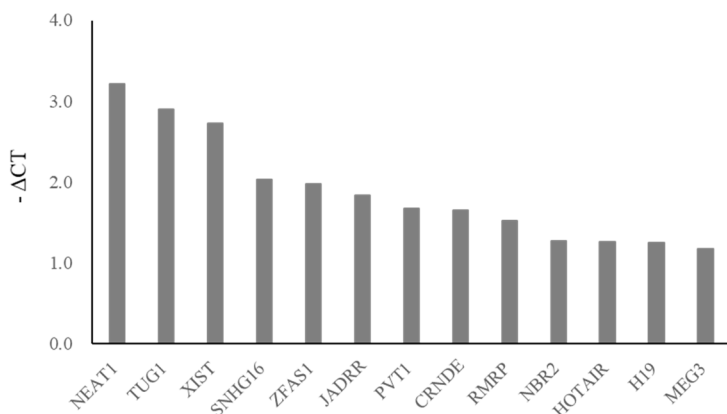


図1 miR124-3p結合 lncRNA

##### (2) RA-FLS 中の lncRNA の発現量

NFAT1、TUG1、XIST、PVT1 および H19 の RA-FLS 中の発現量を検討した結果、NFAT1、TUG1、H19 の発現量が高値であった。これらの分子が、RA の病態下において miR124-3p と多く結合していることが、示唆された。しかし、miR124-3p 結合 lncRNA 量と必ずしも正比例せず、miR124-3p の結合には何らかの別機序があることが予想された(図 2)。

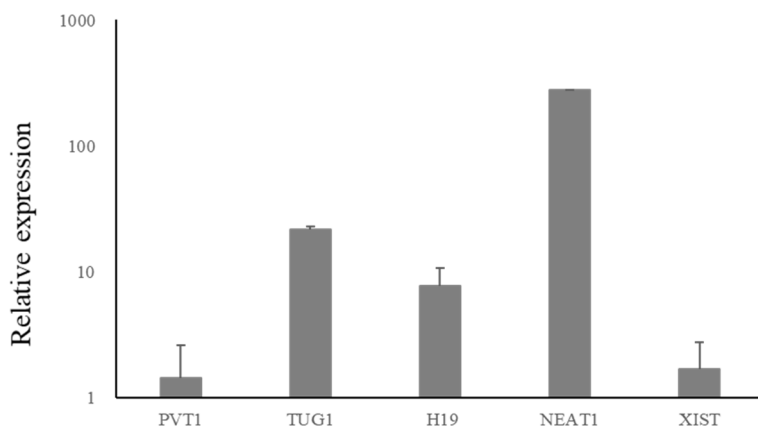


図2 RA FLSのlncRNAの発現量

##### (3) lncRNA のノックダウンによる miR124-3p 発現量の変化

siRNA によるノックダウンによる lncRNA 発現量を図 3 に miR124-3p の発現量を図 4 に示す。

lncRNA のノックダウンはすべての lncRNA で確認され H19 のノックダウンの効率が最も優れていた。5 種類の lncRNA とともに siRNA でノックダウンすることにより miR124-3p の発現量は増加し、H19 が最も miR124-3p の発現量が大きかった。

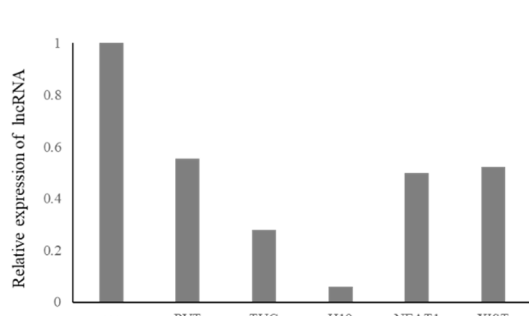


図3 lncRNAノックダウンの効率

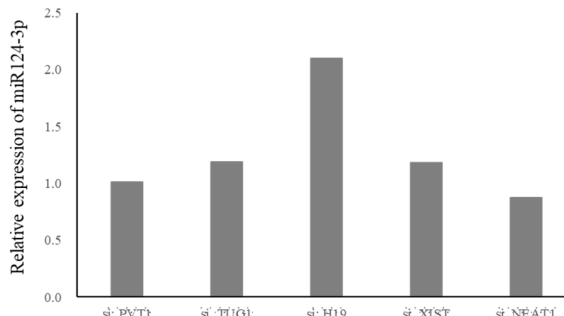


図3 lncRNAの発現低下によるmiR124-3p発現量の変動

これらの結果より、RA-FLS 中の数種類の lncRNA は miR124-3p と結合し、これらの lncRNA のノックダウンにより、miR124-3p の細胞内量が増加することから、miR124-3p の調節に関与していることが示された。よって、lncRNA が miR124-3p による関節炎抑制効果を減じることにより RA の病態に促進的に作用していると考えられ、lncRNA を用いた創薬の可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- 1) Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. Nishimura K, Sugiyama D, Kawano S, et al. *Ann Intern Med.* 2007 Jun 5;146(11):797-808.
- 2) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- 3) Strategies to determine the biological function of microRNAs. Krützfeldt J, Poy MN, Stoffel M. *Nat Genet.* 2006 Jun;38 Suppl:S14-9.
- 4) MicroRNA gets down to business. Mack GS. *Nat Biotechnol.* 2007 Jun;25(6):631-8. doi: 10.1038/nbt0607-631.
- 5) 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.
- 6) MicroRNA-124 inhibits the progression of adjuvant-induced arthritis in rats. Nakamachi Y, Ohnuma K, Kawano S. et al. *Ann Rheum Dis.* 2016 Mar;75(3):601-8.
- 7) MALAT1/miR-124/Capn4 axis regulates proliferation, invasion and EMT in nasopharyngeal carcinoma cells. Shi B, Wang Y, Yin. *Cancer Biol Ther.* 2017 Oct 3;18(10):792-800.
- 8) Implications of the noncoding RNAs in rheumatoid arthritis pathogenesis. Mousavi MJ, Jamshidi A, Chopra A, et al. *J Cell Physiol.* 2018 Jan;234(1):335-347.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Uto K, Ueda K, Okano T, Akashi K, Takahashi S, Nakamachi Y, Imanishi T, Awano H, Morinobu A, Kawano S, and Saegusa J.           | 4. 巻<br>61              |
| 2. 論文標題<br>Identification of plexin D1 on circulating extracellular vesicles as a potential biomarker of polymyositis and dermatomyositis | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Rheumatology  | 6. 最初と最後の頁<br>1669-1679 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/rheumatology/keab588   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔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<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)         | 備考 |
|-------|---|-------------------------------|----|
| 研究分担者 | 三枝 淳<br>(Saegusa Jun)<br><br>(20514970)     | 神戸大学・医学研究科・准教授<br><br>(14501) |    |
| 研究分担者 | 中町 祐司<br>(Nakamachi Yuji)<br><br>(80379429) | 神戸大学・医学部・再雇用職員<br><br>(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 |
|---------|---------|