

機関番号 : 14501

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20591171

研究課題名 (和文) マイクロ RNA による関節リウマチの新規診断・治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of the new diagnosis and the new therapy for rheumatoid arthritis by microRNA

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

## 研究成果の概要 (和文) :

ラットアジュバンド関節炎モデルを用い、マイクロ RNA が関節リウマチの新規診断法および新規治療法となりえるかを検討した。その結果、関節局所および単核球中のマイクロ RNA の発現パターンは関節炎ラットと非関節炎ラットとは異なること、miR-124 前駆体を関節炎ラットの関節局所に投与することにより関節炎が抑制されることからマイクロ RNA を用いた関節リウマチの新規診断法・治療法の可能性が示唆された。

## 研究成果の概要 (英文) :

We investigated the possibility of microRNA as a useful diagnostic marker or therapeutic drug for the treatment of rheumatoid arthritis. We used the rat adjuvant-induced arthritis model. We found that microRNA expression profile was different between the arthritis rat and non-arthritis rat at joint tissues and in mononuclear cells. We treated the adjuvant-induced arthritis rat with miR-124 by injecting into right hind heel, and the arthritis of miR-124 injected rats subsided compared to that of control rats. These results suggested that microRNA could be useful as a new diagnostic and therapeutic tool for rheumatoid arthritis.

## 交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 臨床免疫学・臨床検査学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード : マイクロ RNA、関節リウマチ

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(RA)はわが国において約 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最も重要な疾患の一つである。

RA は CD4+ Th1、Th17 細胞が主体である全身性の疾患であり、その病態は炎症性細胞の関節への浸潤、炎症性サイトカインや MCP-1 などのケモカインの異常増加、関節滑膜細胞の炎症性増殖とそれに伴う関節破壊である。RA の発症は遺伝的素因に環境因子が関与していると考えられているがその病因は不明である。近年、RA の診断に抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗 CCP 抗体)が有用であるとされているが感度は高くない。さらに早期に治療開始することが望まれているが早期 RA を診断できる適切なマーカーは存在しない。治療においても、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抗体療法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や高額な治療費を必要とすることなど問題点が多い。よって、RA の病因を明らかにし、新たな診断法・治療法を開発する必要がある。

近年発見されたマイクロ RNA は、主にメッセンジャー RNA(mRNA)から蛋白への翻訳を抑制する重要な分子である。そして、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。さらに、マイクロ RNA を用いた創薬の期待も高い。しかし、RA に関する研究報告はまだない。

われわれは、RA 滑膜細胞と変形性関節症(OA)滑膜細胞のマイクロ RNA を解析した結果、RA で統計学的に有意に発現量が増加している miR-146a, miR-223, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-133a、有意に発現が低下している miR-124a を同定した。そのうち、RA 滑膜細胞で発現量が低下している miR-124a の前駆体を RA 滑膜細胞にトランスフェクションして機能解析を行った。その結果、miR-124a は CDK2 や CDK6 蛋白の発現を抑制し細胞増殖を抑制すること、また RA 滑膜細胞からの MCP-1 やアンジオジェニンの産生を抑制することを見出し、RA 滑膜細胞では miR-124 の発現低下が RA の病態に促進的に作用していることを明らかにした。これらよりマイクロ RNA が RA の病態に多面的に関与し、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た。

## 2. 研究の目的

RA の病態におけるマイクロ RNA の関与を in vivo で検討し、マイクロ RNA をターゲットとした新しい RA 治療法・診断法の可能性を明らかにすることを目的とした。

(1)マイクロ RNA の変動を実験関節炎モデルで検討し、診断法としての可能性を明らかにする。

(2)関節炎モデルにおいて RA 特異的マイクロ RNA を導入または抑制治療を行い、マイクロ RNA をターゲットとした治療法が RA 治療として有効か否かを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ラットアジュバンド関節炎モデルにおける特異的マイクロ RNA の解析

7 週齢のオス Lewis ラットにジエチルエーテル麻酔後 *Mycobacterium tuberculosis* 含有不完全 Freund アジュバンドを尾根部に 0.1ml 皮下投与し関節炎を誘導する。関節炎は投与後 10 日ほどで前肢・後肢が腫脹し始め発症する。その後、関節炎誘導後 20 日ごろで関節の腫脹は最大となる。

関節炎誘導後 19 日目に関節炎誘導ラットおよび非関節炎誘導ラットを屠殺し、ただちに後肢腫関節周囲組織を採取し RNA 安定剤 RNA later (Qiagen) 中に入れた。脾臓中単核球は脾摘出後、常法に従いファイコールで単核球を分離した。関節周囲組織、単核球からの microRNA を含む small RNA の抽出は mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて行った。microRNA の検出は検出感度の高いオリゴチップ 3D-Gene Rat miRNA oligo chip (東レ)を用い 350 種類の microRNA を対象とした。

(2)ラットアジュバンド関節炎モデルにおけるマイクロ RNA を標的とした治療の関節炎抑制効果の検討

前述と同様にラットアジュバンド関節炎モデルを作成し、ヒト RA 関節滑膜細胞で OA 滑膜細胞と比較して有意に発現が低下している miR-124 を投与することによる関節炎抑制効果を検討した。

関節炎誘導後 9 日目に非関節炎ラット及び関節炎ラットに miR-124 前駆体(Ambion)とアテロジーン(高研)の混合液およびネガティブコントロール(Ambion)とアテロジーン(高研)の混合液を右後肢腫関節局所に 50  $\mu$ L 投与し関節炎抑制効果の有無を検討した。

①関節腫脹の程度を検討するために、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。

②miR-124 前駆体投与による影響を検討するため体重の変化を検討した。

③関節炎誘導後 30 日目に屠殺し踵関節の病理標本を作成し HE 染色を行い病理学的に関節炎の程度を観察した。

#### 4. 研究成果

(1) ラットアジュバンド関節炎モデルにおける特異的マイクロ RNA の解析

①関節周囲組織中のマイクロ RNA の比較では非関節炎ラットと比較し関節炎ラットで 2 倍以上発現が亢進している 10 種類のマイクロ RNA、rno-miR-15b, rno-miR-21, rno-miR-28, rno-miR-140\*, rno-miR-142-3p, rno-miR-142-5p, rno-miR-223, rno-miR-350, rno-miR-425, rno-miR-674-5p を同定した。

逆に非関節炎ラットと比較して関節炎ラットで 1/2 以下に発現が減少している 11 種類のマイクロ RNA、rno-miR-1, rno-miR-29c, rno-miR-133a, rno-miR-133b, rno-miR-200c, rno-miR-206, rno-miR-301b, rno-miR-378, rno-miR-429, rno-miR-431, rno-miR-434 を同定した。

②脾臓単核球中マイクロ RNA の比較では非関節炎ラットと比較し関節炎ラットで 2 倍以上発現が亢進している 6 種類のマイクロ RNA、rno-miR-144, rno-miR-223, rno-miR-324-3p, rno-miR-328, rno-miR-34b, rno-miR-451 を同定した。

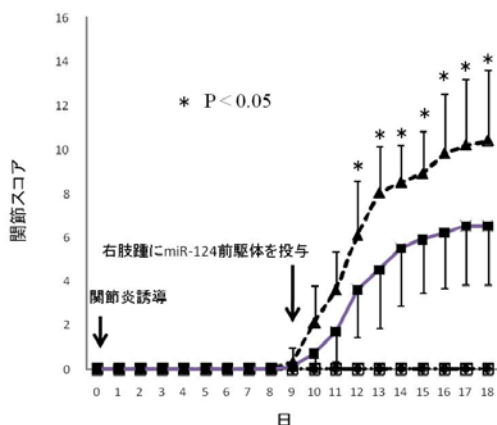
逆に非関節炎ラットと比較して関節炎ラットで 1/2 以下に発現が減少している 4 種類のマイクロ RNA、rno-miR-138, rno-miR-30a, rno-miR-331, rno-miR-872 を同定した。

(1) ラットアジュバンド関節炎モデルにおけるマイクロ RNA を標的とした治療の関節炎抑制効果の検討

##### ①関節腫脹の抑制の程度



関節炎ラット対照      関節炎ラット miR-124

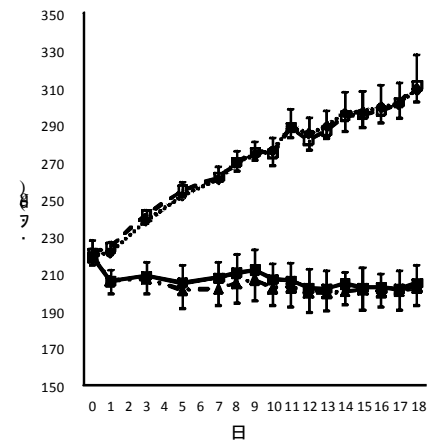


- ◆◆◆ 非関節炎ラット (n=3)
- 非関節炎ラット miR-124 投与 (n=3)
- ▲ 関節炎ラット対照投与 (n=10)
- 関節炎ラット miR-124 投与 (n=10)

四肢の関節の腫脹を検討した結果、関節炎誘導ラットでは miR-124 前駆体投与群は対照 (ネガティブコントロール投与) 群と比較して有意に関節炎を抑制した。また、非関節炎ラットに miR-124 前駆体を投与した群での関節の腫脹は認められなかった。

また、miR-124 前駆体を投与した関節炎誘導ラットの関節の腫脹の抑制は右後肢だけでなく、左後肢を含めた四肢の関節全ての腫脹の抑制を認めた。

##### ②miR-124 前駆体投与による体重の変化



- ◆◆◆ 非関節炎ラット (n=3)
- 非関節炎ラット miR-124 (n=3)
- ▲ 関節炎ラット対照 (n=10)
- 関節炎ラット miR-124 (n=10)

関節炎ラットでは体重の増加は認められなかったが、非関節炎ラット群、関節炎ラット群それぞれにおいて対照と miR-124 前駆体投与群で有意な差は認められず、miR-124 前駆体投与による全身の副作用は認められなかった。

##### ③踵関節の病理学的評価

踵関節を病理組織学的に検討した結果、miR-124 前駆体投与関節炎ラットは対照関節炎ラットに比較して滑膜増殖の抑制、関節局所への炎症性細胞の浸潤の抑制、骨破壊の抑制が認められた。

miR-124 によるラットアジュバンド関節炎

モデルにおける関節炎抑制効果の免疫学的機序は研究中で結論には至っていない。

(4)まとめ

ラットアジュバンド関節炎モデルを用いて、マイクロRNAが関節リウマチの新規診断法および新規治療法となりえるかを検討した。その結果、関節炎局所および単核球マイクロRNAのプロファイリングは関節炎ラットと非関節炎ラットとで異なること、miR-124前駆体を関節炎ラットの関節局所に投与することにより関節炎が抑制されることからマイクロRNAをターゲットとした関節リウマチの新規診断法、新規治療法の可能性が示唆された。

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5件)

- ① Kawano S, Nakamachi Y. miR-124a as a key regulator of proliferation and MCP1 secretion in synoviocytes from RA patient. *Ann Rheum Dis.* 70 Suppl 1. 2011. i88-91(査読有)
- ② 河野誠司, 中町祐司, 熊谷俊一. 関節リウマチにおけるmicroRNAの意義と役割, *リウマチ科*, 44(1), 2011, 105-111. (査読無)
- ③ Takenokuchi M, Nakamachi Y. Yoneda K, Joo K, Kawano S. Tatsumi E, Saigo K, Kumagai S. Quantitative Detection of PML-RARa Fusion Transcript by Real-Time PCR with A Single Primer Pair *J Clin Lab Anal.* 23. 2009. 223-230. (査読有)
- ④ Nakamachi Y, Kawano S. Takenokuchi M, Nishimura K, Sakai Y, Chin T, Saura R, Kurosaka M, Kumagai S. miR-124a is a key regulator of proliferation and MCP1 secretion in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 60. 2009. 1294-1304(査読有)
- ⑤ Syampurnawati M, Tatsumi E, Ardianto B, Takenokuchi M, Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S, Saigo K, Matsui T, Takahashi T, Nagai K, Gunadi, Nishio H, Yabe H, Kondo S, Hayashi Y. DR negativity is a distinctive feature of M1/M2 AML cases with NPM1 mutation. *Leuk Res.* 32. 2008. 1141-3. (査読有)

[学会発表] (計9件)

- ① 野口依子、中町祐司、河野誠司、熊谷俊一他. microRNA-124aとその両側1塩基が欠失したmicroRNA-124の生理的機能の違い. 日本臨床検査医学会. 2010年9月11日、東京
- ② 河野誠司、中町祐司、熊谷俊一、マイクロRNAと自己免疫疾患. 日本臨床検査医学会. 2010年9月10日. 東京
- ③ Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S et al. miR-124a is a regulator of proliferation and MCP1 secretion in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. 国際免疫学会. 2010年8月25日、神戸
- ④ 河野誠司、中町祐司、熊谷俊一、免疫疾患の環境因子とエピジェネティクス. 日本臨床検査医学会 2009年8月27日. 札幌
- ⑤ 中町祐司、河野誠司、熊谷俊一他. 関節リウマチ特異的マイクロRNAの病態解析. 日本臨床検査医学会. 2009年8月28日. 札幌
- ⑥ 中町祐司、河野誠司、熊谷俊一他. miR-124aはRA滑膜細胞で細胞増殖とMCP1分泌を調整する. 日本リウマチ学会 2009年4月26日. 東京
- ⑦ 中町祐司. 関節リウマチ特異的マイクロRNAの病態解析. *リウマチフォーラム*. 2009年1月17日. 東京
- ⑧ Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S. miR-124a is a regulator of proliferation and MCP1 secretion in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. 日本免疫学会. 2008年12月2日. 京都
- ⑨ Nakamachi Y, Kawano S, Kumagai S et al. miR-124a is a regulator of proliferation and MCP1 secretion in fibroblast like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *ACR*. 2008年10月25日. San Francisco

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：関節リウマチ関連マイクロRNA  
発明者：河野誠司、中町祐司  
権利者：神戸大学  
種類：特許  
番号：特願 2008-174072  
出願年月日：2008年7月3日  
国内外の別：国内

名称：関節リウマチ関連マイクロRNA  
発明者：河野誠司、中町祐司  
権利者：神戸大学  
種類：特許

番号：PCT/JP 2009/053157

出願年月日：2009/2/23

国内外の別：国外

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・講師

研究者番号：20351512

熊谷 俊一 (KUMAGAI SHUNICHI)

神戸大学大学院医学研究科・教授

研究者番号：80379429

