

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791385

研究課題名（和文） 関節炎マウスにおける合成 microRNA 投与による関節炎治療効果

研究課題名（英文） Therapeutic effect of administration of microRNA on arthritis mice

研究代表者

中佐 智幸（NAKASA TOMOYUKI）

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60467769

研究成果の概要（和文）：本研究では、合成 microRNA-146 をコラーゲン関節炎マウスに静脈投与を行い、治療効果を検討した。投与後、4週で、microRNA-146 の投与により、レントゲン上関節破壊が抑制されており、組織学的評価では、関節面の破壊も軽度で、炎症性サイトカインの発現や破骨細胞分化も抑制されていた。microRNA による関節炎治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to examine whether the over-expression of miR-146 inhibits osteoclastogenesis, and prevent joint destruction by administration of miR-146a in collagen induced arthritis (CIA) mice. After the onset of distinct arthritis in CIA mice, ds miR-146a or scrambled siRNA was administered twice by intravenous injection. Radiographic and histological examinations were evaluated at 4 weeks. Administration of miR-146a could prevent joint destruction in CIA mice through the suppression of osteoclastogenesis and inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節リウマチ、microRNA、関節炎、炎症、関節破壊

1. 研究開始当初の背景

miRNA は、21～25 塩基程度の non-coding RNA であり、動植物に広く保存されており、組織特異的、発生段階特異的に発現している。miRNA は細胞の増殖、分化、アポトーシスなどといった生命現象だけでなく、がん、白血病、ウイルス感染といった疾患にも重要な役

割を果たしており、治療ターゲットとしての可能性が注目されている。miRNA-146 は、炎症反応の negative feedback を担っており、関節リウマチ（RA）の滑膜組織・末梢血単核球に強発現しており、その発現は炎症性サイトカインにより誘導されることが報告されている。抗アポトーシス効果のある BCL2 を

標的遺伝子とする miRNA-15a は、RA 滑膜において、その発現が低下しており、合成 miRNA-15a を関節炎マウスの膝関節に関節注射することで、滑膜組織内に miRNA-15a を過剰発現させ、BCL2 の発現を抑制し、滑膜組織のアポトーシスを誘導させることが可能である。また破骨細胞分化に関与している miRNA-223 を、ヒト末梢血単核球と培養 RA 滑膜細胞の共培養系による破骨細胞分化で過剰発現させると、破骨細胞分化が抑制される。合成 miRNA の投与による治療の試みも報告されており、これらの miRNA を利用すれば、関節炎が抑制できる可能性がある。

2. 研究の目的

関節炎の病態形成の主要な要素である炎症性サイトカイン、滑膜増殖、破骨細胞分化に対し、それぞれ効果があると思われる miRNA を II 型コラーゲン誘導関節炎マウスに静脈投与し治療効果を検討すること。

3. 研究の方法

8 週齢雄 DBA1/J マウスを用いて抗 II 型コラーゲン抗体による関節炎マウスを作成する。関節炎をスコア化し、明らかな関節炎が発症したら、合成 2 本鎖 miRNA (30mg/kg) を核酸の安定化剤であるアテロコラーゲン 200 μ l に溶解し、マウス尾静脈より投与する。初回投与より 2 週間後、関節炎スコアに改善がなければ、もう 1 度投与する。初回投与より 4 週間後、屠殺し、治療効果を評価する。対照群は、アテロコラーゲンのみを静脈注射したもの、非機能性合成 2 本鎖 RNA をアテロコラーゲンに溶解したものを静脈注射したものとす。miRNA-146a、miRNA-15a、miRNA-223 の投与による治療効果を、レントゲンや組織学的に評価する。また、これらの miRNA の機能を *in vitro* で解析する。

In vitro においてヒト末梢血単核球に M-CSF、RANKL あるいは、TNF α を添加することによる破骨細胞分化において、miR-146a を強制導入し、破骨細胞分化が抑制できるかどうか検討した。

4. 研究成果

合成 miRNA-146 を投与した群では、レントゲン上関節破壊が抑制されており、組織学的評価においても、関節面の破壊は軽度であった。

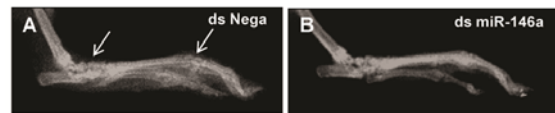


図 1. レントゲン評価. ds miR-146a を投与した群では関節破壊が抑制されている。

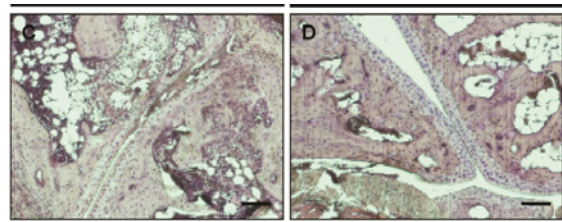


図 2. 後足の HE 染色. 左: 対照群、右: ds miR-146a 投与群. Ds miR-146a 投与群では、骨軟骨破壊が軽度である。

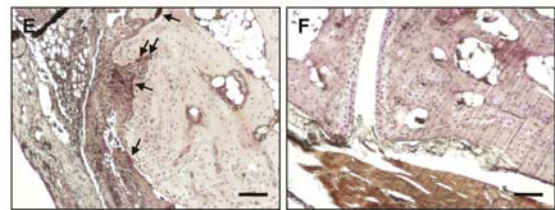


図 3. 後足の TRAP 染色. 左: 対照群、右: ds miR-146a 投与群. Ds miR-146a 投与群では、TRAP 陽性細胞は少ない。

In vitro では、末梢血単核球からの破骨細胞分化誘導において miRNA-146 を過剰導入すると、RANKL、TNF α による破骨細胞分化がともに抑制されており、破骨細胞のマーカー遺

伝子も発現が抑制されていた。また、miR-146a の標的遺伝子であり、破骨細胞分化に重要な役割を担う TRAF6 の発現も抑制されていた。さらに、正常あるいは関節リウマチの滑膜細胞に炎症性サイトカインを添加し、miRNA-146 を過剰導入すると、Cox2、MMP3 の発現が抑制された。MiRNA-15a、223 を投与した群では、明らかな差は見られなかった。miR-223 を、末梢血単核球からの破骨細胞分化に導入すると、破骨細胞分化は抑制された。

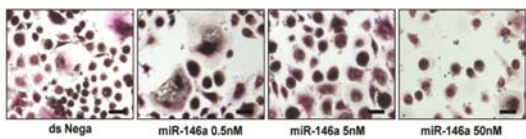


図4. TRAP 染色. RANKL、M-CSF による破骨細胞誘導において、miR-146a の過剰導入により、容量依存的に破骨細胞分化が抑制された。

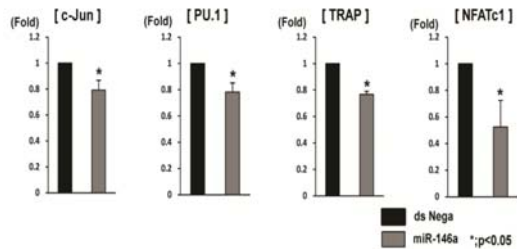


図5. 破骨細胞マーカー遺伝子の発現解析. Real time PCR により、破骨細胞マーカー遺伝子が miR-146a の過剰導入により抑制されていることが明らかとなった。

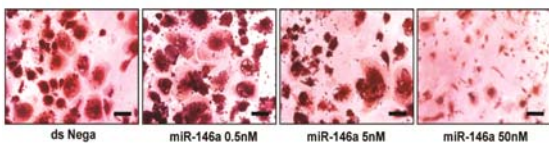


図6. TRAP 染色. TNF α 、M-CSF による破骨細胞誘導においても、miR-146a の過剰導入により、容量依存的に破骨細胞分化が抑制された。

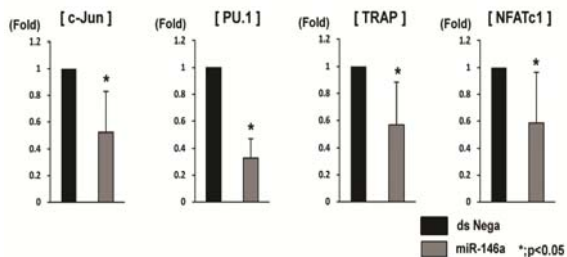


図7. 破骨細胞マーカー遺伝子の発現解析. Real time PCR により、破骨細胞マーカー遺伝子が miR-146a の過剰導入により抑制されていることが明らかとなった。

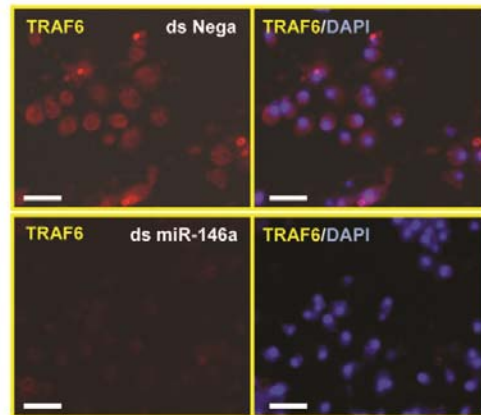


図8. miR-146a の標的遺伝子である TRAF6 の免疫染色. 末梢血単核球からの破骨細胞分化において miR-146a の過剰導入により、TRAF6 の発現は減少している。

以上の研究結果から、miR-146a の過剰導入により、破骨細胞分化を抑制することがわかった。また、関節炎マウスに対し、合成2本鎖 miR-146a の全身投与により、破骨細胞分化を抑制して、関節破壊を抑制することがわかった。しかし、その効果は、完全に関節炎を抑制しているわけではなく、より効果的な投与方法、miRNA のデリバリーシステムの改良等が必要である。また、作用機序や、体内分布・代謝、副作用も明らかではない。こうした問題点を今後明らかにしていく必要がある。今回の実験では、miR-223、miR-15a の投与では、明らかに関節炎・関節破壊を抑制できたということはなかったが、単独ではなく、組み合わせることにより、効果的になる可能性もある。また、メソトレキセートといった既存の薬物との併用等の検討も必要となってくると思われる。

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 1 件)

Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis mice. *Arthritis & Rheumatism*. 2011;63(3): 1582-1590. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 中佐智幸、コラーゲン関節炎における microRNA-146a による骨破壊抑制、第 10 回 JCBJD 研究講演会 平成 24 年 2 月 18 日、東京都
- ② T.Nakasa, The inhibitory effect of microRNA-146 expression on joint destruction in rheumatoid arthritis, 57th annual meeting of Orthopaedic Research Society, 平成 23 年 1 月 13～16 日、Long Beach、米国
- ③ 中佐智幸、microRNA-146 による関節破壊抑制効果、第 25 回日本整形外科基礎学術集会 平成 22 年 10 月 14 日～15 日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：6 0 4 6 7 7 6 9

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：