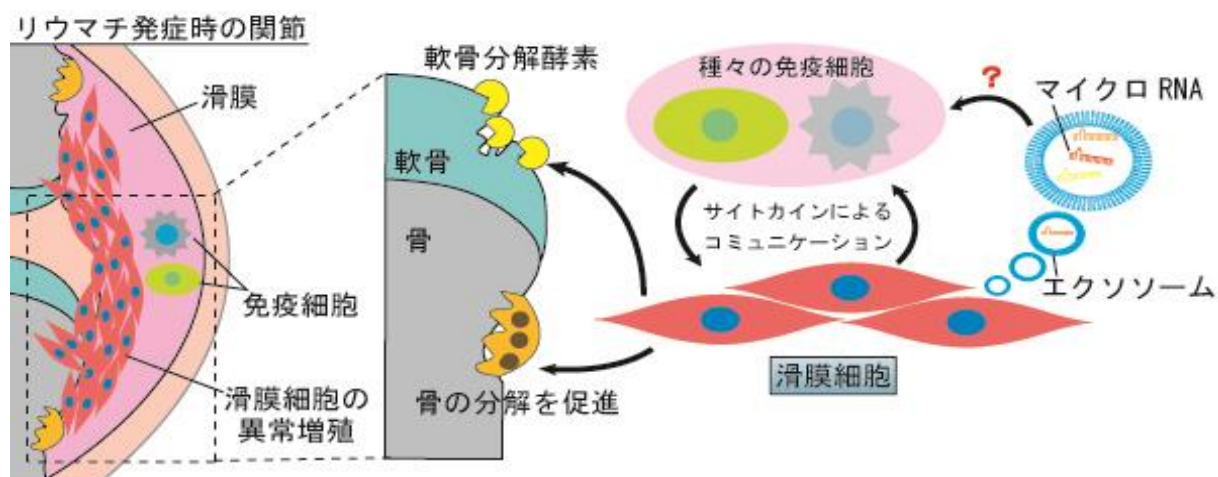


慢性関節リウマチの予防・未病診断の新しい分子マーカーを発見 —トランスオミクスによる新しいエクソソーム・マイクロRNAの解析—

概要

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の植田充美 教授、青木航 助教、高村陽介 修士課程学生（研究当時、現：塩野義製薬）、里村淳 博士課程学生(研究当時、現：米ノースウエスタン大学・日本学術振興会特別研究員) ならびに兵庫医療大学との共同研究により、関節リウマチにおいて、これまでに知見のないエクソソーム miR-323a-5p と miR-1307-3p を新たに発見しました。これらのマイクロ RNA の配列からターゲットとなる遺伝子を予測したところ、miR-323a-5p は炎症シグナルに参与する CD6 を、miR-1307-3p は破骨細胞分化の抑制に寄与する NDRG2 を、それぞれターゲットにしていることが推定されました。分子標的薬の効かないリウマチ疾患や、リウマチの予防や未病段階の診断への新たな分子マーカーとして期待されます。

本成果は、2018年8月11日に米国の学術誌「PLOS ONE」にオンライン掲載されました。



左写真：関節リウマチ発症 (写真クレジット：James Heilman, MD)

上図：関節リウマチ発症機構の概略

1. 背景

関節リウマチは、関節内の炎症により、軟骨や骨が破壊されて関節が変形する病気です（写真）。関節内には、骨や軟骨を包む滑膜組織が存在し、関節リウマチを発症した際の滑膜組織内では、滑膜線維芽細胞が異常増殖し、免疫細胞の浸潤が起きます。これらの滑膜線維芽細胞や免疫細胞の間で、サイトカインによる異常な細胞間コミュニケーションが行われることが、骨や軟骨の分解を促進し、関節の破壊を進行させるというモデルが提唱されています（図1）。近年、このモデルにしたがって関節リウマチの治療は非常に進歩した一方で、一部の患者には治療の効果がなく、未だに発症機構の全容は解明されていません。そこで本研究では、細胞間コミュニケーションに着目した新たな観点から、関節リウマチの発症機構の一端を明らかにすることを目的としました。

細胞間コミュニケーションにおいて、マイクロ RNA がエクソソームと呼ばれる小胞によって、細胞間を運搬され、生体内で重要な役割を果たしていることが明らかになってきています（図2）。そこで、エクソソームに含まれるマイクロ RNA が関節リウマチにおいて発症機構に関与している可能性に着目しました。滑膜線維芽細胞株 MH7A を用いて病態モデルを作成し、分泌されたエクソソーム中マイクロ RNA を網羅的に解析しました（図3）。

2. 研究手法・成果

関節リウマチ患者の滑膜線維芽細胞から樹立された培養細胞株（MH7A）を実験に用いました。関節リウマチの発症状態を模して、炎症性サイトカイン TNF- α の有無での条件下で、48 時間 MH7A を培養しました。TNF- α 刺激に対する MH7A の反応性は、分泌された IL-6 量によって確認しました（図4）。細胞から分泌されたエクソソームを、細胞培養上清より超遠心によって精製しました。精製したエクソソームからマイクロ RNA を抽出し、cDNA 化および PCR 増幅を行いました。調整したライブラリーを次世代シーケンサー（Illumina Miseq）によりシーケンスし、マイクロ RNA の同定・定量を行いました。発現プロファイルを比較することにより、TNF- α 刺激により 4 つのマイクロ RNA（miR-155-5p、miR-146a-5p、miR-323a-5p、miR-1307-3p）が有意に発現上昇していたことが明らかになりました（図5、表1）。

3. 波及効果、今後の予定

滑膜線維芽細胞に対して TNF- α 刺激を与えた際の、エクソソーム中マイクロ RNA の発現変化を実証できました。本研究で同定したマイクロ RNA のうち、miR-155-5p と miR-146a-5p は関節リウマチ患者の滑膜液中で発現上昇することが報告されています。このことから、滑膜液に含まれる miR-155-5p と miR-146a-5p の発現上昇に、滑膜線維芽細胞由来のエクソソームが寄与していると考えられます。今回、これまでに知見のないエクソソーム miR-323a-5p と miR-1307-3p を新たに発見をしました。マイクロ RNA の配列からターゲットとなる遺伝子を予測し、miR-323a-5p は炎症シグナルに関与する CD6 が、miR-1307-3p は破骨細胞分化の抑制に寄与する NDRG2 が、発現を抑制するターゲット遺伝子の候補にそれぞれ挙がり、分子標的薬の効かない症例や、予防や未病段階の診断への新たな分子マーカーとしての期待が生まれました。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻、兵庫医療大学との共同研究として行われました。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Small RNAs detected in exosomes derived from the MH7A synovial fibroblast cell line with TNF- α stimulation

著者：Yosuke Takamura, Wataru Aoki, Atsushi Satomura, Seiji Shibasaki, Mitsuyoshi Ueda

掲載誌：PLOS ONE

<お問い合わせ先>

植田 充美 (うえだ・みつよし)

京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻 応用生化学講座 生体高分子化学分野 教授

TEL：075-753-6110 FAX：075-753-6112

E-mail：miueda@kais.kyoto-u.ac.jp



写真：関節リウマチ発症 (写真クレジット：James Heilman, MD)

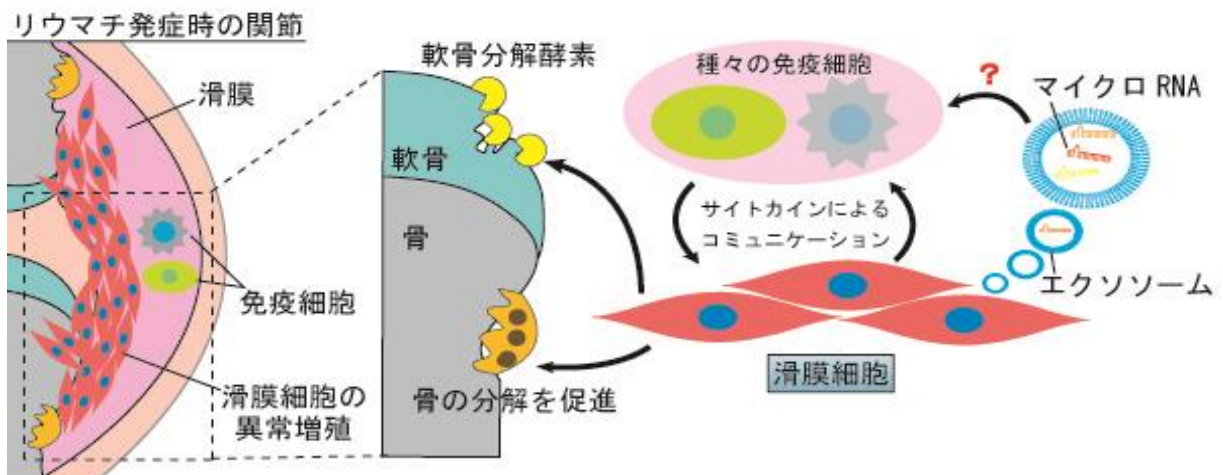


図1 関節リウマチ発症機構の概略

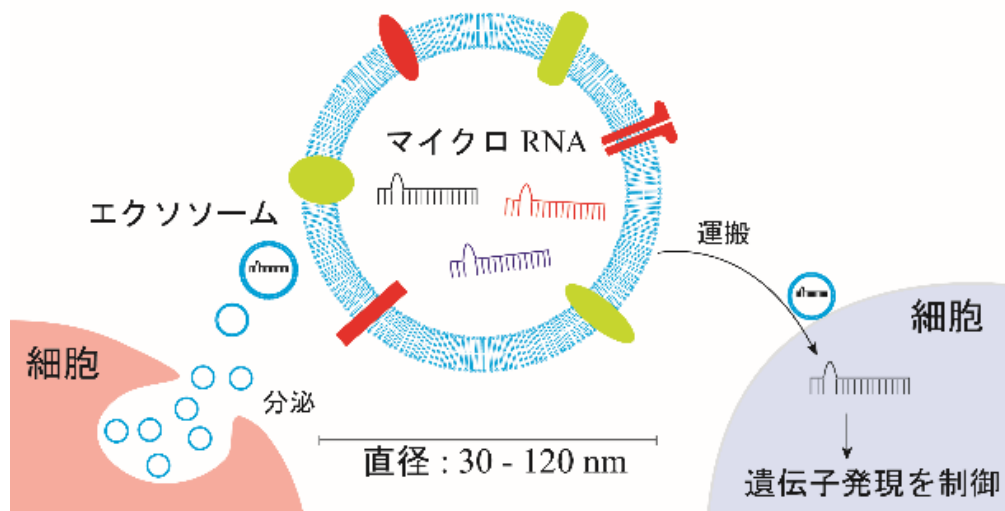


図2 エクソソームマイクロ RNA による細胞間コミュニケーション

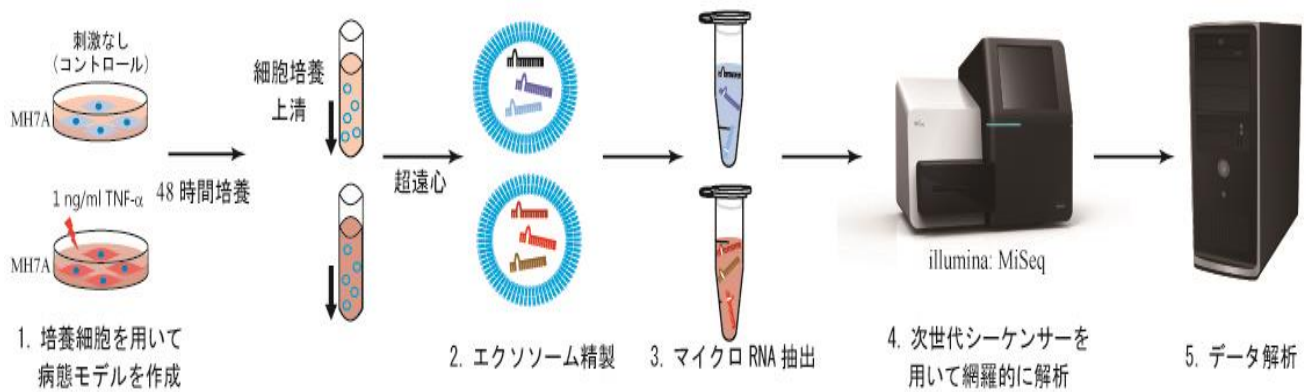


図3 研究のワークフロー

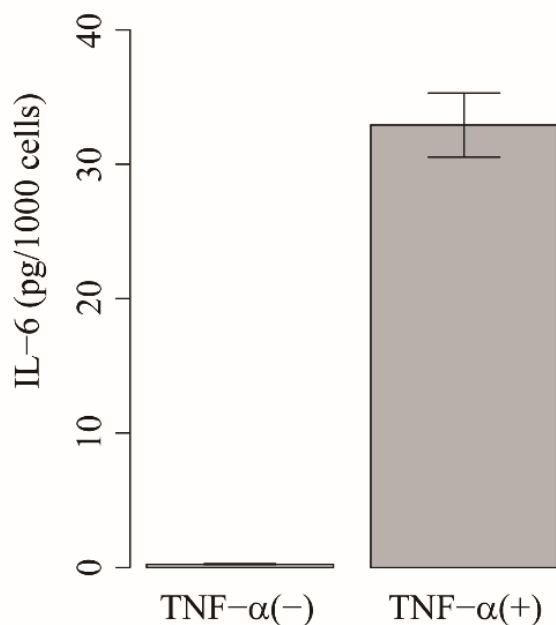


図4 TNF- α 刺激に対する応答性

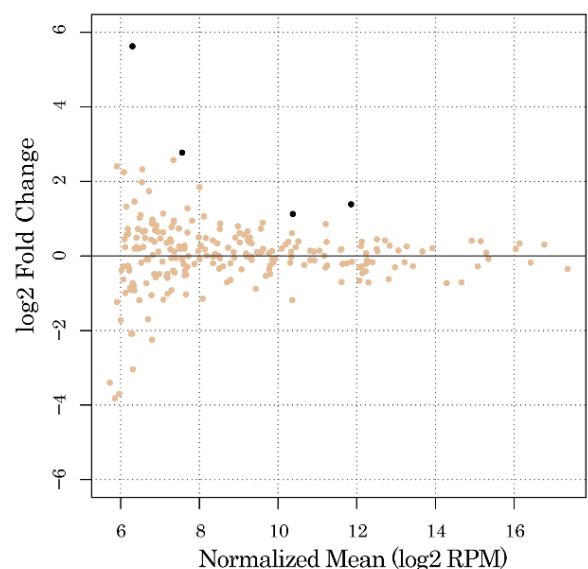


図5 エクソソームマイクロ RNA の MA プロット
縦軸は炎症刺激による発現変動を、横軸は平均発現量を表す。統計的有意差 (FDR < 0.05) のあったマイクロ RNA を濃黒色でプロットした。

	発現変動 (Log ₂ FC)	平均発現量 (Log ₂ RPM)	P 値	FDR
miR-155-5p	1.38	11.9	0.0000191	0.00456
miR-146a-5p	2.77	7.56	0.000145	0.0174
miR-323a-5p	5.62	6.30	0.000388	0.0268
miR-1307-3p	1.13	10.4	0.000448	0.0268

Abbreviations

Fold Change FC:
Read Per Million RPM:
False Discovery Rate FDR:

表 1 発現上昇したマイクロ RNA