

201023050A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および
血漿・関節液 miRNA の同定と治療・診断への応用

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉富 啓之

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I.	総括研究報告	
	ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および血漿・関節液 miRNA の同定と治療・診断への応用	1
	研究代表者 吉富 啓之	
II.	分担研究報告	
1.	ヒト関節リウマチ特異的 CD4 陽性細胞および血漿・関節液 miRNA の同定と治療・診断への応用	7
	研究代表者 吉富 啓之	
2.	ヒト関節リウマチにおける IL-27 の病態への関与に関する研究	13
	研究分担者 中村 孝志	
3.	血漿・関節液中の内部標準 miRNA の検索	17
	研究分担者 伊藤 宣	
III.	研究成果の刊行に関する一覧・別刷	19

I. 総括研究報告

ヒト関節リウマチ特異的CD4陽性細胞および血漿・関節液miRNAの同定と治療・診断への応用

研究代表者	吉富 啓之	京都大学大学院医学研究科	整形外科	助教
研究分担者	中村 孝志	京都大学大学院医学研究科	整形外科	教授
研究分担者	伊藤 宣	京都大学大学院医学研究科	整形外科	講師

研究要旨:

関節リウマチ(RA)の病態は十分に解明されているとはいえ、それが治療無効例につながっていると考えられる。最近我々は、関節液および血漿中の miRNA の存在と RA マーカーとしての可能性を示した。また、ヒトとマウスの CD4陽性細胞等の免疫反応の違いが近年指摘されており、本研究ではヒト検体を用いて関節に浸潤するCD4陽性細胞の解析と、関節液・血漿中miRNAの解析にて臨床使用可能な新たな検査の確立と、新たな病態機序の解明による新規治療を目指す。

A. 研究目的

近年、動物モデルとヒト自己免疫疾患の違いが指摘されている。動物では IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞(Th17)が重要な役割を果たし、末梢および炎症部位にて Th17 細胞の増加を認めるが(J Exp Med, 204: 2803-12)、ヒト関節リウマチ(RA)で Th17 は細胞は末梢で増加せず、関節局所では減少している。原因としては動物種による CD4 陽性リンパ球の性質の差があると考えられる。例えば、マウス Th17 の分化には IL-6 と TGF- β が重要だが(Nature, 441: 235-238)、ヒトでは IL-1 が重要である事(J Exp Med, 205:1903-16)、ヒトCD4陽性細胞には Th17 に分化可能な CD161 陽性群と不可能な CD161 陰性群が存在する事(J Exp Med, 205:1903-16)等が指摘されている。これらの事より、動物モデルだけでなくヒトRAの検体を用いた病態解析が必要となってきた。

新たな側面として、最近我々は関節液中に microRNA (miRNA)が安定して存在し、RA と変形性関節症で発現が著明に異なる事を示した。血漿 miRNA は癌の特異的なマーカーとして重要で(Natl Acad Sci USA, 105:10513-18.) RA でも血漿・関節液

miRNA が重要なマーカーとして期待される。miRNA は抗原提示や信号伝達に関与する 50nm-100nm の小囊胞である exosome に含まれて分泌されると考えられており、特異的 miRNA の解明は新たな病態の発見につながりえる。

本研究ではヒト RA における CD4 陽性 T 細胞の役割の解明と疾患特異的 miRNA の同定を目的としている。動物種間の反応性違いにより、ヒト RA 検体で病態を解析することが求められている。動物ではなくヒト検体を用いる事、細胞内 miRNA だけでなく、血漿・関節液内 miRNA の解析を行う事が特色で、新たな RA の病態機序を明らかにすることが期待される。

具体的には RA の病態を明らかにするために、以下の3つの課題に関して研究を行った。

① ヒト RA 病態における IL-27 の役割

IL-27 は EBI-3 と IL27-p28 のヘテロダイマーからなるサイトカインで、Th1 細胞への分化を促すだけでなく、Th17 細胞への分化を抑制するなどの免疫抑制作用を持つことが知られている。本研究では関節リウマチ患者における IL-27 の発現およびその役割

を明らかにするために解析した。

② RA 特異的な血漿・関節液中 miRNA の解析

これまで、血漿中には miRNA が存在し、腫瘍のマーカーとして有用であることが示されてきたが、RA に対するマーカーとして使用可能かは不明であった。また、関節液中にも miRNA が存在するのかどうかは知られていなかった。

まず初めに、関節液中にも安定して miRNA が存在するのか、さらに5種類の miRNA を用いて血漿および関節液中 miRNA が RA のマーカーとして使用可能なのかを解析した。

臨床応用、さらに新たな RA の病態解明を目指して、高い特異度と感度を有する血漿および関節液 miRNA を同定するために、網羅的な血漿中および関節液中 miRNA の解析を行った。

③ ヒト RA 関節に遊走するリンパ球の解析

T 細胞共刺激遮断薬が RA に有効であることから、CD4 陽性細胞が RA 滑膜組織での炎症に関与していることは明らかだが、どのような機序で働いているのかはいまだに不明な点が多い。従って、ヒト RA の関節局所に遊走する CD4 陽性細胞が発現する遺伝子や、滑膜組織にてとる構造を解析することで、RA の病態を明らかにし新たな治療へとつなげることが出来ると考えられる。

本研究では滑膜組織に遊走している CD4 陽性細胞の滑膜組織内での分布や、表面抗原および産生するサイトカインの解析を行い、炎症関節に遊走する CD4 陽性リンパ球の性質を解析した。

B. 研究方法

① ヒト RA 病態における IL-27 の役割

それぞれ15名の RA 患者および変形性関節症(OA)患者から関節液および血漿、健常人より血漿を採取し、IL-27 の濃度を ELISA にて測定した。

次に、IL-27 の由来を調べるために、RA 患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)や単核球による IL-27 の産生を測定した。また、RA および OA の滑膜組織の免疫染色にて IL-27 産生細胞の分布を解析した。

In vitro では TNF α および IL-17 刺激にて誘導される RA-FLS からの IL-6 および CCL20 産生における IL-27 の影響および IL-27 の受容体である WSX-1 の関与を解析した。

さらに RA 関節における IL-27 の機能を解析するために、RA 関節液での IL-27 と IFN- γ または IL-17 の濃度を ELISA にて測定し、それらの相関を解析した。

② RA 特異的な血漿・関節液中 miRNA の解析

最初に関節液中 miRNA の存在と、その凍結融解等における安定性を解析した。次にそれぞれ30名の RA 患者および OA 患者より血漿と関節液を、健常人より血漿を採取し、細胞内の miRNA として RA との関連が報告されている miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 および miR-223 の濃度をリアルタイム PCR を用いて測定した。また、滑膜組織、線維芽細胞様滑膜細胞、単核球が、培養上清中に分泌する上記 miRNA の濃度を同様に測定し、関節液および血漿中 miRNA の発現パターンと比較した。最後に、健常人、RA および OA による miRNA の発現の違いや、RA の疾患活動性と miRNA の相関を解析した。

続いて、RA 患者の血漿および関節液に対して、アレイを用いた miRNA の網羅的解析を行った。関節液に関しては、それぞれ3検体の RA および OA サンプル中の miRNA の発現を網羅的に解析した。血漿に関しては、それぞれ3検体の RA および健常人サンプル中の miRNA を網羅的に解析した。これらの比較からおおまかに候補 miRNA を選択した。候補 miRNA の発現を各群 12 検体で比較解析し、RA 特異的な関節液および血漿中 miRNA の同定を試み

た。

③ ヒト RA 関節に遊走するリンパ球の解析

整形外科手術時に摘出された RA 滑膜組織中に浸潤する免疫細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体等にて蛍光多重免疫染色を行い、それらが滑膜組織中でとる構造を解析した。次に T 細胞が滑膜組織内で発現する IL-17 等のサイトカインや CCR5、CCR6、CD161 等の表面分子を蛍光多重免疫染色にて解析した。

さらに、関節液に遊走している CD4 陽性細胞と末梢血中の CD4 陽性細胞をフローサイトメトリーにて比較解析した。

C. 研究結果

① ヒト RA 病態における IL-27 の役割

血漿においては、RA、OA、健常人共に 400pg/ml 程度の IL-27 を認め、有意差はなかった。一方で関節液においては、RA では 100pg/ml 程度の IL-27 が存在したのに対し、OA ではほとんど検出されず、有意に差を認めた。

IL-27 の産生は CD14 陽性細胞のみに認められ、FLS、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞からは認められなかった。

RA および OA の滑膜組織の免疫染色では、RA には多数の IL-27 産生性 CD14 細胞の浸潤が認められたが、OA にはほとんど認めなかった。

TNF α および IL-17 により誘導される FLS からの IL-6 および CCL20 の産生は IL-27 により抑制された。さらに IL-27 の受容体である WSX-1 のデコイを加えたところ抑制が解除されたことより、この抑制は WSX-1 受容体を介していると考えられた。

RA 関節液において、IL-27 と IFN- γ 濃度は有意な正の相関を示したのに対し、IL-27 と IL-17 は弱い負の相関を示した。このことから、RA 関節において IL-27 は実際に Th1 の産生を促し、Th17 の分化や遊走を抑制していることが示唆された。

② RA 特異的な血漿・関節液中 miRNA の解析

関節液中にも miRNA は存在し血漿中 miRNA と同様に安定であった。

関節液と血漿中の miRNA の比較では、関節リュウマチ患者では、miR-16、miR-132、miR-146a、miR-223 濃度が関節液で有意に低かった。

5種類の miRNA の発現パターンを検討したところ、血漿と関節液でパターンは異なり、血漿と関節液では miRNA の産生機序が異なると考えられた。関節液 miRNA の発現パターンは滑膜組織が放出する miRNA のパターンに酷似していたことから、関節液中 miRNA は関節の状態をより反映していると考えられた。

血漿中 miR-132 は健常人で有意に高く 83.8%の感度と 80.7%の特異度で健常人と RA 患者を区別したが、RA 患者患者と OA 患者の区別は困難であった。

血漿および関節液中の miRNA と RA の疾患活動性に相関があるか解析したところ、血漿 miR-16、miR-146a、miR-155、miR-223 と圧痛関節数、血漿 miR-16 と DAS28 が相関した。

上記の成果は Arthritis Research & Therapy 誌に掲載された。この論文は Nature Review Rheumatology 誌で取り上げられ、現在国際特許申請中である。

RA 診断等への臨床応用可能な、より特異度の高い関節液および末梢血中 miRNA を同定するために網羅的な解析を行ったところ、関節液では 17 種類のもが RA で有意に増加していた。末梢血では、RA のみで有意に低下しているものが 17 種類、RA と OA で有意に低下しているものが 2 種類、RA のみで有意に増加しているものが 3 種類得られた。

② ヒト RA 関節に遊走するリンパ球の解析

RA 滑膜組織の subling layer 中には多数の CD3 陽性細胞がびまん性または濾胞様

に浸潤しており、その多数はCD4陽性細胞であった。多重染色にて、滑膜組織中はCCR5、CCR6、CD161陽性のCD3陽性T細胞の頻度が高かった。滑膜組織の免疫染色では、IFN- γ やIL-17陽性のT細胞は数%程度の割合であった。IL-17はCD4陽性T細胞だけではなく、多核細胞等からも産生されていた。

フローサイトメトリーにて、関節液中のCD4陽性細胞はケモカイン受容体であるCCR5とCD161陽性細胞を有意発現していた。さらに、炎症関節に浸潤するCD4陽性細胞が産生するその他の分子を複数同定している。

D. 考察

①生理的な濃度のIL-27は炎症性サイトカインにより誘導されるCCL20やIL-6の産生を抑制し、Th17細胞の分化や遊走の抑制に働いていると考えられた。関節リウマチの滑膜中にはIL-27産生性CD14細胞が浸潤しており、この機能を強化することによりRAの新たな治療へとつながる可能性が考えられた。

②関節液中には血漿と同様に安定してmiRNAが存在しており、関節液、血漿中miRNAともに検査対象として適していると考えられた。関節液中のmiRNAは滑膜組織および浸潤細胞により産生されるmiRNAと類似しており、関節内の状態をより反映していた。また、関節液および血漿中miRNAはRAの診断、および病勢の判断に有用であった。

網羅的な解析により、RA特異的な関節液および末梢血miRNAをさらに同定することが出来た。特に、最初の5種類では、血漿中miRNAはOAとRAの区別が困難であったが、網羅的解析では、RA特異的なものを20種類同定することが出来た。

今後は検査としての臨床応用を目指して、多数検体での解析を行い、確立したRAに

対する感度特異度、早期RAに対する発症予測性および予後予測性を検討する予定である。また、miRNAがRAの病態に関与する機序を解明する。

③滑膜組織の蛍光多重染色にて、T細胞等の免疫細胞の滑膜組織での分布が明らかとなった。RA滑膜のsublining layerには多数のT細胞、B細胞、点在する樹状細胞を認め、滑膜組織内でリンパ組織様の構造をとっていることが明らかとなった。また、炎症関節に浸潤するT細胞はヒトTh17と関連が強いことが報告されているCD161を有意に発現していた。その他にも複数の候補分子を発現することを確認している。

この解析から得られた知見を、ヒト細胞の培養系や、可能なものは関節炎モデルにて解析することで、CD4陽性細胞が滑膜におよぼす機序を解明し新規治療の応用が期待される。

E. 結論

ヒト関節リウマチ検体を用いた研究により、Th17細胞の分化遊走を抑制するIL-27産生細胞がリウマチ滑膜組織内に存在することが明らかとなった。この機能を強化することによるRAの新たな治療が期待される。

関節液に存在するCD4陽性細胞のケモカイン受容体の発現プロファイルは末梢血と異なり、CD161を始めとする分子を発現することが明らかとなった。

血漿および関節液中miRNAは関節リウマチの有用なマーカーで、網羅的な解析をすることにより、多数のRA特異的なmiRNAを同定した。さらに多数検体にて解析することで、臨床的に使用可能でより優れた感度、特異度、発症予測性、予後予測性を有する検査の確立が期待できる。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Murata K, Yoshitomi H. et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):R86.

Tanida S, Yoshitomi H. et al. IL-27-producing CD14⁺ cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. *Cytokine* (in press. doi:10.1016/j.cyto.2011.04.020).

吉富啓之. 臨床医学の展望 2011 関節リウマチ. 日本医事新報. No4529 p50-51.

2. 学会発表

Murata K, Yoshitomi H. et al. Plasma miR-132 and synovial fluid miR-223 as potential diagnostic biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 第57回 ORS. Long Beach.

Murata K, Yoshitomi H. et al. Synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. 京都

吉富啓之. 関節リウマチの病態はどこまでわかったか? -リンパ球を中心に-. 第2回神戸京整会症例検討会. 神戸.

H. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中 microRNA に関する国際特許申請中。

II. 分担研究報告

ヒト関節リウマチ特異的CD4陽性細胞および血漿・関節液miRNAの同定と治療・診断への応用

研究代表者 吉富 啓之 京都大学大学院医学研究科 整形外科 助教

研究協力者 村田 浩一 京都大学大学院医学研究科 整形外科 大学院生

研究要旨:

関節リウマチ(RA)の病態は十分に解明されているとはいえ、それが治療無効例につながっていると考えられる。最近我々は、関節液および血漿中の miRNA の存在と RA マーカーとしての可能性を示した。また、ヒトとマウスの CD4陽性細胞等の免疫反応の違いが近年指摘されており、本研究ではヒト検体を用いて関節に浸潤する CD4陽性細胞の解析と、関節液・血漿中 miRNA の解析にて臨床使用可能な新たな検査の確立と、新たな病態機序の解明による新規治療を目指す。

A. 研究目的

近年、動物モデルとヒト自己免疫疾患の違いが指摘されている。動物では IL-17 産生性 CD4 陽性 T 細胞(Th17)が重要な役割を果たし、末梢および炎症部位にて Th17 細胞の増加を認めるが (J Exp Med, 204:2803-12)、ヒト関節リウマチ(RA)で Th17 は細胞は末梢で増加せず、関節局所では減少していることが報告されている。この差異の原因としては動物種による CD4 陽性リンパ球の性質の差があるためと考えられている。例えば、マウス Th17 細胞の分化には IL-6 と TGF- β が重要だが (Nature, 441:235-238)、ヒトでは IL-1 が重要である事 (J Exp Med, 205:1903-16)、ヒト CD4 陽性細胞には Th17 細胞に分化可能な CD161 陽性群と Th17 細胞に分化が不可能な CD161 陰性群が存在する (J Exp Med, 205:1903-16) がマウスでは同様の現象が認められない等が指摘されている。これらの事より、動物モデルだけでなくヒト RA の検体を用いた病態解析が必要となってきた。

新たな側面として、最近我々は関節液中に microRNA (miRNA)が安定して存在し、RA と変形性関節症で発現が著明に異なる

事を示した。血漿 miRNA は癌の特異的なマーカーとして重要で (Natl Acad Sci USA, 105:10513-18.) RA でも血漿・関節液 miRNA が重要なマーカーとして期待される。miRNA は抗原提示や信号伝達に関与する 50nm-100nm の小嚢胞である exosome に含まれて分泌されると考えられており、特異的 miRNA の解明は新たな病態の発見につながりえる。

本研究ではヒト RA における CD4 陽性 T 細胞の役割の解明と RA 特異的 miRNA の同定を目的としている。モデル動物での知見がヒトには応用出来ない事が多々あることから、患者への応用を目指してヒト RA 検体で病態を解析することが求められている。動物ではなくヒト検体を用いる事、細胞内 miRNA だけでなく、血漿・関節液内 miRNA の解析を行う事が特色で、新たな RA の病態機序を明らかにすることが期待される。

平成22年度には以下の2つの課題について研究を行った。

① RA 特異的な血漿・関節液中 miRNA の解析

これまで、血漿中には miRNA が存在し、腫瘍のマーカーとして有用であることが示されてきたが、RA に対するマーカーとして

使用可能かは不明であった。また、関節液中にも miRNA が存在するのかどうかは知られていなかった。

まず初めに、関節液中にも安定して miRNA が存在するのか、さらに5種類の miRNA を用いて血漿および関節液中 miRNA が RA のマーカーとして使用可能なのかを解析した。

臨床応用、さらに新たな RA の病態解明を目指して、高い特異度と感度を有する血漿および関節液 miRNA を同定するために、網羅的な血漿中および関節液中 miRNA の解析を行った。

② ヒト RA 関節に遊走するリンパ球の解析

RA は滑膜組織の増殖と肥厚から始まり、続いて滑膜組織が産生するマトリックスメタロプロテアーゼ等による軟骨及び靭帯組織の損傷、および滑膜組織に誘導される破骨細胞による骨破壊により関節の変形へと至り、患者の著しい日常生活能力の低下へとつながる。一方で、CD4 陽性細胞が滑膜局所で引き起こす免疫反応についてはいまだに不明な点が多い。また、モデル動物とヒト RA との免疫反応の違いが明らかになってきており、モデルマウスからの治療標的の同定にも限界がある。従って、ヒト RA の関節局所に遊走する CD4 陽性細胞が発現する遺伝子や、滑膜組織にてとる構造を解析することで、RA の病態を明らかにし新たな治療へとつなげることが出来ると考えられる。

平成 22 年度は、RA 滑膜組織の CD4 陽性リンパ球等の免疫細胞の多重蛍光免疫染色を行い、滑膜組織に遊走している CD4 陽性細胞の滑膜組織内での構造や、表面抗原および産生するサイトカインの解析を行った。さらに、関節液および末梢血中の CD4 陽性 T 細胞のフローサイトメトリーと用いた解析を行い、炎症関節に遊走する CD4 陽性リンパ球の性質を解析した。

B. 研究方法

① RA 特異的な血漿・関節液中 miRNA の解析

最初に関節液中 miRNA の存在と、その凍結融解等における安定性を解析した。次にそれぞれ30名の RA 患者および OA 患者より血漿と関節液を、健常者より血漿を採取し、細胞内 miRNA として RA との関連が報告されている miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 および miR-223 の濃度をリアルタイム PCR を用いて測定した。また、滑膜組織、線維芽細胞様滑膜細胞、単核球が、培養上清中に分泌する上記 miRNA の濃度を同様に測定し、関節液および血漿中 miRNA の発現パターンと比較した。最後に、健常人、RA および OA による miRNA の発現の違いや、RA の疾患活動性との相関を解析した。

続いて、RA 患者の血漿および関節液に対して、アレイを用いた miRNA の網羅的解析を行った。関節液に関しては、それぞれ3検体の RA および OA サンプル中の miRNA の発現を網羅的に解析した。血漿に関しては、それぞれ3検体の RA および健常人サンプル中の miRNA を網羅的に解析した。これらの比較からそれぞれ 60 程の miRNA を候補として選択した。候補 miRNA の発現を各群 12 検体で比較解析し、RA 特異的な関節液および血漿中 miRNA の同定を行った。

② ヒト RA 関節に遊走するリンパ球の解析

整形外科手術時に摘出された RA 滑膜組織中に浸潤する免疫細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体等にて蛍光多重免疫染色を行い、それらが滑膜組織中でとる構造を解析した。次に T 細胞が滑膜組織内で発現する IL-17 等のサイトカインや CCR5, CCR6, CD161 等の表面分子を蛍光多重免疫染色にて解析した。

さらに、関節液に遊走している CD4 陽性細胞と末梢血中の CD4 陽性細胞をフロー

サイトメトリーにて比較解析した。

C. 研究結果

① RA 特異的な血漿・関節液中 miRNA の解析

関節液中にも miRNA は存在し、-20 度での保存および8回までの融解凍結でも血漿中 miRNA と同様に安定であった。

関節液と血漿中の miRNA の比較では、関節リウマチ患者では、miR-155 を除く miR-16, miR-132, miR-146a, miR-223 濃度が関節液で有意に低かった(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.05$)。

5種類の miRNA の発現量でレーダーチャートを作成し、発現パターンを検討したところ、血漿と関節液で発現パターンは異なっていた。このため、血漿中 miRNA と関節液中 miRNA はその産生機序が異なると考えられた。次に FLS、滑膜組織、単核球ともに培養上清中を解析したところ、それぞれに miRNA が放出されていることが明らかとなった。関節液 miRNA の発現パターンは滑膜組織が放出する miRNA のパターンに酷似していた。これらのことから、関節液中 miRNA は血漿中 miRNA と比較して、関節の状態をより反映していると考えられた。

血漿中の miRNA は5種のなかで miR-132 が健常人で有意に高く($p < 0.01$)、ROC カーブにて診断能力を解析したところ、83.8%の感度と80.7%の特異度で健常人とRA患者を区別し AUC は 0.90 と高値であったが、RA 患者患者と OA 患者の区別は困難であった(図1)。

血漿および関節液中の miRNA と CRP、赤沈、MMP3、DAS28、腫脹関節数、圧痛関節数と相関があるか解析したところ、血漿 miR-16, miR-146a, miR-155, miR-223 と圧痛関節数、血漿 miR-16 と DAS28 が相関した($p < 0.05$)。

上記の成果は Arthritis Research & Therapy 誌 12(3)巻 R86 項(2010年)に掲載された。この論文は Nature Review

Rheumatology 誌 6(8)巻 436 巻 (2010年)で取り上げられ、現在国際特許申請中である。

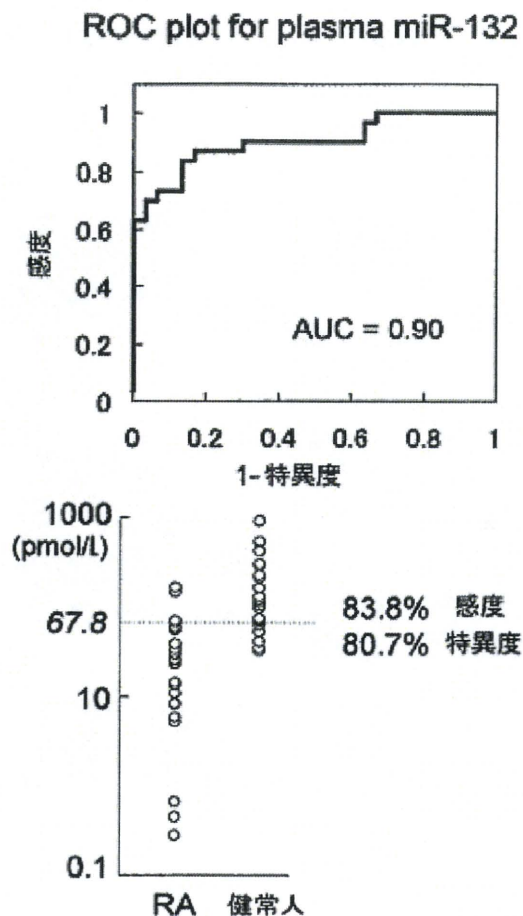


図1 30名ずつのRA患者と健常人での血漿中 miR-132。ROCカーブのAUCは0.90と高値である。

RA 診断等への臨床応用可能な、より特異度の高い関節液および末梢血中 miRNA を同定するために、 $n=3$ で網羅的な解析を行ったところ、関節液、末梢血それぞれ60種類程度の miRNA が候補として挙げられた。さらに $n=12$ に増加させて有意な差があるか検定したところ、関節液では17種類のものがRAで有意に増加していた。末梢血では、 $n=12$ でRA、OA、健常人にて比較したところ、前述の5種類の miRNA とは異なり、RAのみで有意に低下しているものが17種類、RAとOAで有意に低下しているものが2種類、RAのみで有意に増加しているものが3

種類得られた。

② ヒト RA 関節に遊走するリンパ球の解析

RA 滑膜組織の subling layer 中には多数の CD3 陽性細胞がびまん性または濾胞様に浸潤しており、その他数は CD4 陽性細胞であったが CD8 陽性細胞も浸潤していた (図2)。

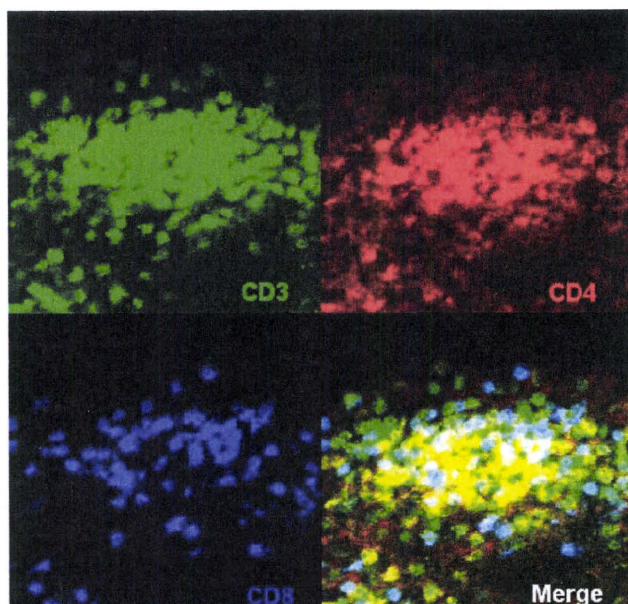


図2 RA 滑膜組織に浸潤する Tリンパ球。CD3(緑)、CD4(赤)、CD8(青)にて多重蛍光免疫染色を行った。

B 細胞は T 細胞に隣接する領域に浸潤していた。また、CD3 との多重染色にて、滑膜組織中は CCR5、CCR6、CD161 陽性の CD3 陽性 T 細胞の頻度が高かった。滑膜組織の免疫染色では、IFN-g や IL-17 陽性の T 細胞は数%程度の割合であった。IL-17 は CD4 陽性 T 細胞だけではなく、多核細胞等からも産生されていた (図 3)。

フローサイトメトリーにて、関節液中の CD4 陽性細胞はケモカイン受容体である CCR5 を有意に発現しており、CCR6 の発現にはほとんど変化がなかった。また、関節液中 Th17 細胞は CCR5 を発現していた。RA の末梢血 CD4 陽性細胞中の CD161 陽性細胞は統計学的に有意に増加していた (図4)。さらに、炎症関節に浸潤する CD4

陽性細胞が産生するその他の分子を複数同定している。

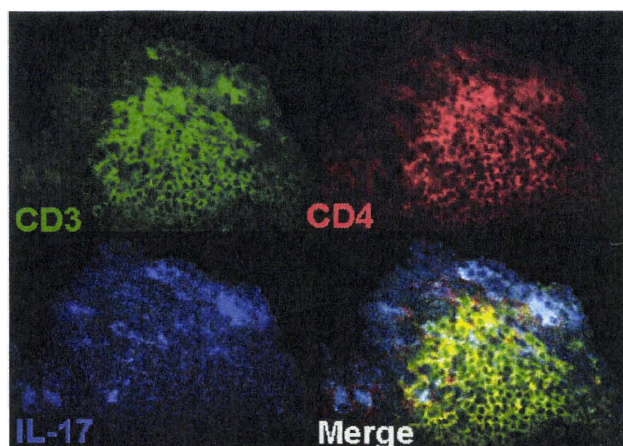


図3 RA 滑膜組織の CD3(緑)、CD4(赤)、IL-17(青)による免疫染色。一部の CD4 陽性 T 細胞と多核巨細胞から IL-17 が産生されているのが認められる。

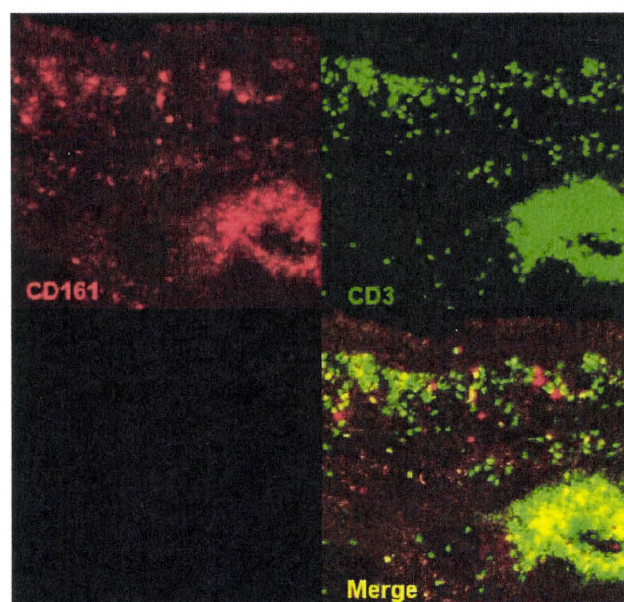


図4 RA 滑膜組織の CD161(赤)と CD3(緑)による二重染色。

D. 考察

①関節液中には血漿と同様に安定して miRNA が存在しており、関節液、血漿中 miRNA とともに検査対象として適していると考えられた。関節液中の miRNA の発現パターンは滑膜組織および浸潤細胞により産生される miRNA と類似しており、関節内の状

態をより反映していた。また、関節液および血漿中 miRNA は RA の診断、および病勢の判断に有用であった。

さらに行った網羅的な解析により、RA 特異的な関節液および末梢血 miRNA を同定することが出来た。特に、最初の5種類の解析では、血漿中 miRNA は OA と RA の区別が困難であったが、網羅的解析では、RA 特異的なものを 20 種類同定することが出来た。

今後は検査としての臨床応用を目指して、100例レベルの多数検体での解析を行い、確立した RA に対する感度特異度、早期 RA に対する発症予測性および予後予測性を検討する予定である。また、RA 特異的なものが多数存在したことから、miRNA が RA の病態に関与する可能性が高く、RA の新たな病態を解明することが期待される。

②滑膜組織の蛍光多重染色にて、T 細胞等の免疫細胞がリンパ組織様の構造をとっていることが明らかとなった。IL-17 は一部の T 細胞と多核細胞などからの発現を認めた(図 2)。RA 関節に浸潤する T 細胞はヒト Th17 と関連分子である CD161 やその他の候補分子を発現することを確認している。

この解析から得られた知見を、ヒト細胞の培養系や、可能なものは関節炎モデルにて解析することで、CD4 陽性細胞が滑膜におよぼす機序を解明し新規治療の応用が期待される。

E. 結論

ヒト関節リウマチ検体を用いた研究により、関節液に存在する CD4 陽性細胞のケモカイン受容体の発現プロファイルは末梢血と異なり、CD161 を始めとする分子を発現することが明らかとなった。また、血漿および関節液中 miRNA は関節リウマチの有用なマーカーで、網羅的な解析をすることにより、多数の RA 特異的な miRNA を同定した。さ

らに多数検体にて解析することで、臨床的に使用可能でより優れた感度、特異度、発症予測性、予後予測性を有する検査の確立が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Murata K, Yoshitomi H. et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):R86.

吉富啓之. 臨床医学の展望 2011 関節リウマチ. 日本医事新報. No4529 p50-51.

2. 学会発表

Murata K, Yoshitomi H. et al. Plasma miR-132 and synovial fluid miR-223 as potential diagnostic biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 第 57 回 ORS. Long Beach.

Murata K, Yoshitomi H. et al. Synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. 京都

吉富啓之. 関節リウマチの病態はどこまでわかったか? -リンパ球を中心に-. 第2回神戸京整会症例検討会. 神戸.

G. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中 microRNA に関する国際特許申請中。

ヒト関節リウマチにおける IL-27 の病態への関与に関する研究

研究分担者 中村 孝志 京都大学大学院医学研究科 整形外科 教授

研究協力者 谷田 司明 京都大学大学院医学研究科 整形外科 大学院生

研究要旨:

IL-27はCD4陽性細胞のTh1への分化を誘導する一方で、Th17への分化や炎症性シグナルを抑制するとされている。本研究では関節リウマチにおけるIL-27の役割を解析し、炎症抑制としてのIL-27の可能性を検討した。生理的な濃度のIL-27は炎症性サイトカインにより誘導されるCCL20やIL-6の産生を抑制し、Th17細胞の分化や遊走の抑制に働いていた。関節リウマチの滑膜中にはIL-27産生性CD14細胞が浸潤していた。RA関節ではIL-27とIFN- γ が有意な正の相関を示し、IL-27とIL-17が弱い負の相関を示したことから、IL-27はRA関節において実際にTh1への分化を促進し、Th17の分化や遊走を抑制していることが示唆された。この機能を強化することによりRAの新たな治療へとつながる可能性が考えられる。

A. 研究目的

生体には反応を抑制する機構が内在的に存在している。例えばIL-1受容体アンタゴニストはもともと存在する分子で、生物学的製剤であるアナキンラとして実用化された。関節リウマチ(RA)の病態にはIL-17産生性CD4陽性(Th17)細胞が関与しているとされるが、IL-27はTh1への分化を誘導する一方でTh17分化や炎症性シグナルをも抑制するとされている。

本研究では関節リウマチにおけるIL-27の役割を解析し、炎症抑制としてのIL-27の可能性を検討した。

B. 研究方法

それぞれ15名のRA患者および変形性関節症(OA)患者から関節液および血漿、健常人より血漿を採取し、ELISAにてIL-27の濃度を測定した。

次に、RA関節液中IL-27の由来を調べるために、RA患者由来の線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)や単核球によるIL-27の産生

を測定した。さらに、フローサイトメトリーにてIL-27産生細胞の同定を試みた。RAおよびOAの滑膜組織に免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡を用いてIL-27産生細胞の分布を解析した。

In vitroでは、炎症性サイトカインにて誘導されるRA-FLSからのIL-6およびCCL20産生におけるIL-27の影響およびIL-27の受容体であるWSX-1の関与を解析した。

さらに、RA関節におけるIL-27の機能を解析するために、RA関節液でのIL-27とIFN- γ またはIL-17の濃度をELISAにて測定し、それらの相関を解析した。

C. 研究結果

血漿においては、RA、OA、健常人共に平均で400pg/ml、最大で1.2ng/ml程度のIL-27を認め、有意差はなかった。一方で関節液においては、RAでは平均で100pg/ml程度のIL-27が存在したのに対し、OAではほとんど検出されず、有意に差を認めた($p < 0.001$)。

FLS の炎症性サイトカイン刺激、および単核球のフローサイトメトリー解析により、IL-27 の産生は CD14 陽性細胞のみに認められ、FLS、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞からは認められなかった。

RA および OA の滑膜組織の免疫染色では、RA 滑膜には多数の IL-27 産生性 CD14 細胞の浸潤が認められたが、OA 滑膜にはほとんど認めなかった(図1)。

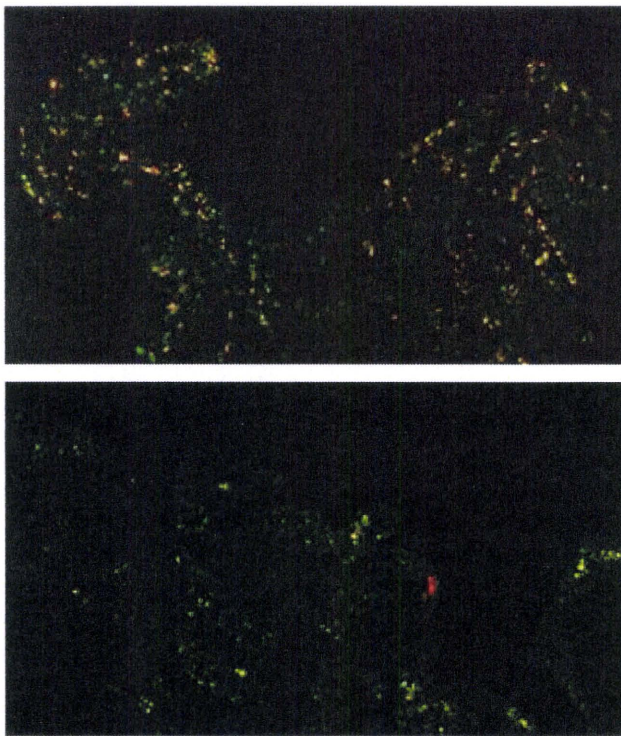


図1 滑膜組織中の IL-27(緑)と CD14(赤)の免疫染色。上段は RA、下段は OA 滑膜組織。

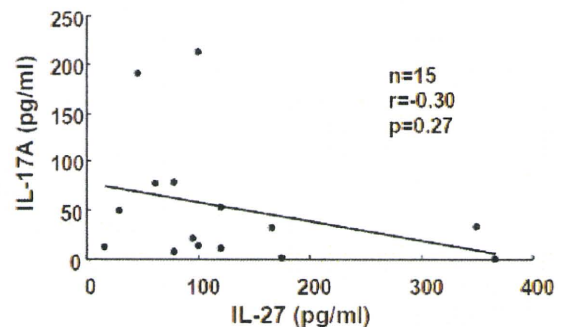
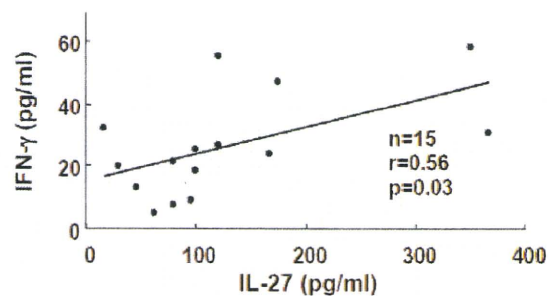
血漿の測定結果より、生理的な濃度は 10ng/ml 以下であると判断し、その濃度での in vitro の解析をおこなった。TNF α および IL-17 により誘導される FLS からの IL-6 および CCL20 の産生は IL-27 により抑制された。さらに IL-27 の受容体である WSX-1 の可溶性受容体を加えたところ抑制が解除されたことより、この抑制は WSX-1 受容体を介していると考えられた。

また、RA 関節液において、IL-27 と IFN- γ 濃度は有意な正の相関を示したのに対し、IL-27 と IL-17 は弱い負の相関を示した。こ

のことから、RA 関節において IL-27 は実際に Th1 の産生を促し、Th17 の分化や遊走を抑制していることが示唆された。(図2)

図2 RA 関節液中の IL-27、IFN- γ 、IL-17 の濃度。IL-27 と IFN- γ は有意な正の相関を示し、IL-27 と IL-17 は弱い負の相関を示す。

上記の結果は Cytokine 誌にアクセプトさ



れ現在 in press である。

D. 考察

生理的な濃度の IL-27 は、炎症性サイトカインにより誘導される CCL20 や IL-6 の産生を抑制し、Th17 細胞の分化や遊走の抑制に働いていると考えられた。関節リウマチの滑膜中には IL-27 産生性 CD14 細胞が浸潤していた。RA 関節では IL-27 と IFN- γ が有意な正の相関を示し、IL-27 と IL-17 が弱い負の相関を示すことから、IL-27 は RA 関節において実際に Th1 への分化を促進し、Th17 の分化や遊走を抑制していることが示唆された。

E. 結論

IL-27 は CD14 陽性細胞から産生され、変形性関節症に比較して関節滑膜に有意に浸潤していた。この RA 関節での IL-27 濃度は IFN- γ と相関し、IL-17 と負の相関を示したことから、in vitro と同様に実際の関節で Th17 に抑制的に働いていると考えられた。

炎症性サイトカインや Th17 を抑制する IL-27 は血漿中に恒常的に存在するが、関節液にはわずかにしか存在しない。関節リウマチでは IL-27 の濃度が上昇してくるが、末梢血でのレベルまでは到達しない。

このことから、RA 関節では IL-27 の働きが不十分である可能性があり、これを強化することで、RA の新たな治療へとつながる可能性があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanida S, Yoshitomi H. et al. IL-27-producing CD14+ cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. Cytokine 2011 (in press. doi:10.1016/j.cyto.2011.04.020).

2. 学会発表

なし。

G. 知的財産研の出願・登録状況

なし。

血漿・関節液中の内部標準 miRNA の検索

研究分担者 伊藤 宣 京都大学大学院医学研究科 整形外科 講師

研究協力者 村田 浩一 京都大学大学院医学研究科 整形外科 大学院生

研究要旨:

遺伝子発現の解析において、mRNA の発現量を GAPDH 等のハウスキーピング遺伝子の発現にて標準化をする必要がある。細胞内 microRNA (miRNA) の発現に対しては 5S rRNA や U6 が内部標準として用いられるが、血漿または関節液中 miRNA ではどの miRNA が標準的に分泌されるのかはほとんど分かっていない。本研究では、血漿中 miRNA および関節液中 miRNA を安定した臨床検査として使用するために、平均的に分泌され内部標準として使用可能な miRNA を網羅的な解析から同定することを目的とする。

A. 研究目的

遺伝子発現の解析において、mRNA の発現量を HPRT、GAPDH、 β -Actin 等のハウスキーピング遺伝子の発現にて標準化をする必要がある。細胞内 microRNA (miRNA) の発現に対しては 5S rRNA や U6 が内部標準として用いられるが、血漿または関節液中 miRNA ではどの miRNA が標準的に分泌されるのかはほとんど分かっていない。

血漿中および関節液中 miRNA 濃度の絶対定量は、外部標準として線虫などの合成 miRNA を RNA 抽出の際に一定量加え、測定する miRNA と外部標準 miRNA の希釈系列においてリアルタイム PCR を行うことで実現できる。しかし、血漿や関節液は体の状態により全体的に濃縮や希釈されることから、miRNA 全般の発現に比例して標準的に存在する miRNA の同定が不可欠である。

本研究では、血漿中 miRNA および関節液中 miRNA を安定した臨床検査として使用するために、平均的に分泌され内部標準として使用可能な miRNA を網羅的な解析から同定することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト関節リウマチ患者より末梢血と関節液、変形性関節症患者より関節液、健常人より末梢血をそれぞれ3検体ずつ採取し、遠心分離にて血漿または関節液上清とした後に RNA を採取した。採取した RNA を ABI 社の miRNA アレイにて網羅的に解析した後に、内部標準遺伝子を検索するソフトウェアである NormFinder および geNorm を用いて、疾患にかかわらず安定して発現している miRNA を検索した。

C. 研究結果

miRNA アレイにて測定された miRNA768 個について NormFinder および geNorm にて解析した。通常内部標準としてよく用いられる U6 や外部標準として加えた Cel-miR-39 は内部標準としてはあまり適切でなく、疾患と関連なく発現していると判定された miRNA の平均値が最も良い内部標準であった。平均値と良く相関し内部標準として使用可能と思われた miRNA が関節液、血漿ともに4種類ずつ同定できている。

(図1)

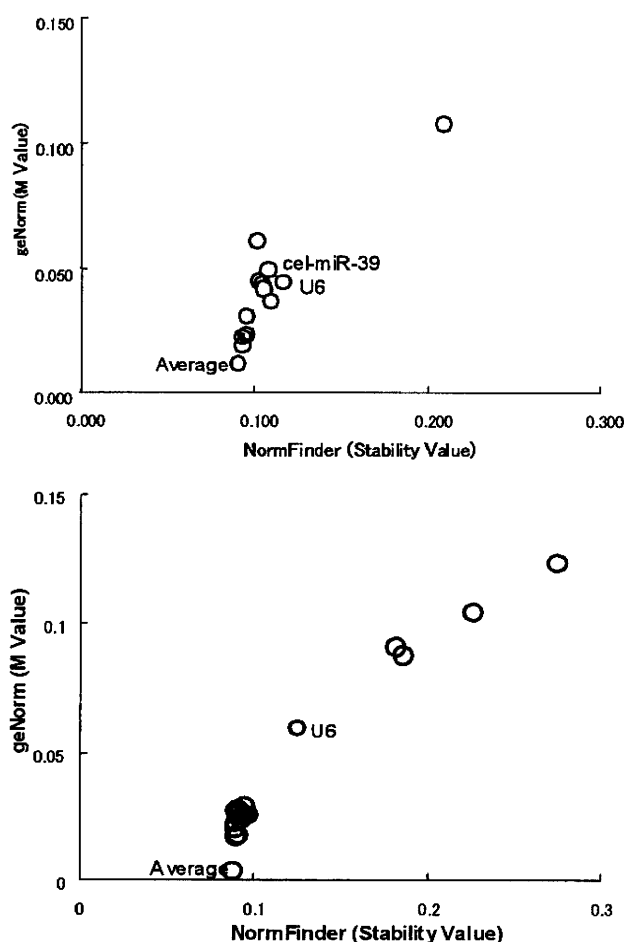


図1 Genorm および NormFinder にて解析した各 miRNA。Cel-miR-39 は RNA 抽出時に外部標準として加えたもの。U6 は細胞 miRNA では内部標準としてよく使用される。Average は疾患に無関係と思われた miRNA 発現量の平均値。左下にあるほど内部標準に適している。上段は関節液、下段は血漿中の miRNA。

D. 考察

血漿および関節液中 miRNA は滑膜組織等の細胞成分の miRNA と比較して、より非侵襲的に採取可能で臨床検査としての臨床応用が期待される。一方で、細胞内 miRNA と比較してどの様な内部標準を使用したらいのか不明な点が多かった。本研究の結果により内部標準 miRNA の候補として、関節液、血漿それぞれ4種類ほど同定

され、U6 は内部標準としてはあまり適切でないと思われた。今後はさらに検体数を増やして、吉富が同定した RA の特異的な miRNA に対する内部標準として適しているのかどうかをさらに解析する必要がある。

E. 結論

血漿および関節液中 miRNA を臨床応用する際に不可欠と思われる血漿および関節液中内部標準 miRNA を少数検体の網羅的解析にて検索した。関節液中 miRNA および血漿 miRNA の内部標準として、それぞれ4種類の miRNA が挙げられた。さらに多数検体で解析し確認する必要があるが、内部標準となる miRNA が明らかとなった事により、血漿および関節液中 miRNA による関節リウマチの診断の臨床応用に向けて前進した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Murata K, Yoshitomi H. et al. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(3):R86.

2. 学会発表

Murata K, Yoshitomi H. et al. Plasma miR-132 and synovial fluid miR-223 as potential diagnostic biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 第57回 ORS. Long Beach.

Murata K, Yoshitomi H. et al. Synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. 京都

G. 知的財産研の出願・登録状況

なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧・別刷