

2012290/2A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉富 啓之

平成25（2013）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マイクロ RNA の同定	9
	研究代表者 吉富 啓之	
2.	関節リウマチにおける血漿中マイクロ RNA の臨床的解析	15
	研究分担者 中村 孝志	
3.	関節リウマチにおける血漿中マイクロ RNA の臨床的解析	19
	研究分担者 伊藤 宣	
III.	研究成果の刊行に関する一覧・別刷	23

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
次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 特定准教授
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 名誉教授
研究分担者 伊藤 宣 京都大学大学院医学研究科 リウマチ性疾患制御学 准教授

研究要旨:

関節リウマチ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。不十分な病態解明の原因の1つには動物モデルとヒト関節リウマチの病態や免疫反応の違いがあると考えられ、実際にマウスモデルで得られた知見がヒトの疾患に応用できないことはしばしば経験される。そこで我々は関節リウマチ患者由来の検体から研究シードを探索し解析するという方針で研究を行ってきた。その成果の1つとして関節液および血漿中のマイクロRNAの存在とそれらの関節リウマチに対するバイオマーカーとしての可能性を世界に先駆けて示した。血漿中マイクロRNAの網羅的な解析をさらに行い、関節リウマチ特異的な血漿中マイクロRNAとして miR-24、miR-26a、miR-125a-5p およびそれらの複合値 ePRAM を同定し 100 名程度の関節リウマチ患者にて確認した。これらは関節リウマチに対して 60%程の感度と 90%程の特異度を示した。また興味深いことに、血漿中マイクロRNAは抗CCP抗体が陰性の群でも同様の感度特異度を示し、抗CCP抗体陰性症例の早期診断に寄与する可能性が示唆された。また血漿中で変化しているマイクロRNAの機能を動物モデルを用いて解析を行い、miR-451 が p38 経路を介して好中球の遊走を制御していることを明らかにした。他にも、関節リウマチ関節において IL-27 が Th17 細胞と炎症性サイトカインを抑制していること、さらに関節リウマチ滑膜炎局所に、Th1 や Th17 細胞と別個の CD4 陽性 T 細胞集団が存在することを明らかにしている。この様に本研究では、関節リウマチ患者由来の検体から関節リウマチの新たな診断や治療につながる知見を得ており、国民の健康とともに行政にも貢献できる成果を得たと考える。

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)、ヒト関節リウマチで Th17 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関節リウマチの検体を用いた病態解析が必要と考える。

新たな側面として、血漿中にはマイクロRNAが安定して存在し、癌の特異的なマーカーとして重要であることが示された(Natl Acad Sci USA, 105:10513-18.)。関節リウマチでも血漿・関節液マイクロRNAが重要なマーカーとして期待される。マイクロRNAは抗原提示や信号伝達に参与する 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、特異的マイクロ RNA の解明は新たな病態の発見につながりえる。

本研究ではヒト関節リウマチにおける CD4 陽性 T 細胞の役割の解明と疾患特異的マイクロ RNA の同定を目的としている。患者にてどのような免疫現象が生じているのかを明らかにするため、ヒト関節リウマチ検体から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、細胞内マイクロ RNA だけでなく、血漿・関節液内マイクロ RNA の解析を行う事が特色で、新たな関節リウマチの病態機序を明らかにすることが期待される。

平成24年度は関節リウマチ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 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロ RNA の解析

これまで、血漿中にはマイクロ RNA 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、関節液にもマイクロ RNA が存在するのか、また血漿中マイクロ RNA が関節リウマチの診断および病勢マーカーとなり得るのかはこれまで知られていなかった。

平成22年度には関節液中にもマイクロ RNA が存在するのか、また血漿・関節液中マイクロ RNA が関節リウマチのバイオマーカーと成り得るのかを5種類のマイクロ RNA を測定し解析した。

平成23年度からは血漿中マイクロ RNA による関節リウマチ診断および病勢判定の臨床応用を目指し、血漿中マイクロ RNA の網羅的な解析を行った。さらに、候補血漿中マイクロ RNA に対して臨床的な状況にてどの程度の感度特異度、および臨床マーカーとの相関を認めるのかを、100 人の健康人と関節リウマチ患者の血漿を用いて検証した。単純にマーカーとしての有用性だけでなく、現在临床上で問題となってい

る抗CCP抗体陰性症例に対しても使用できるのかも検討した。

② マイクロ RNA による関節炎制御の解析

血漿中マイクロ RNA はマーカーとしての役割だけでなく、自己免疫性関節炎の病態に関与している可能性がある。本解析では、詳細に機序を解明するために関節炎モデルを用いて解析した。関節炎にて変化するマイクロ RNA がどのように関節炎の病態に関与するのかを、マイクロ RNA が標的とする遺伝子や信号伝達系、さらに細胞群を明らかにすることを試みた。

③ ヒト関節リウマチ滑膜炎リンパ球の解析

病理組織学的所見や遺伝子変異との関連、さらには T 細胞共刺激遮断薬が関節リウマチに有効であることから、CD4 陽性細胞が関節リウマチ滑膜での炎症に関与していることは明らかだが、どの様な機序で関与しているのかはいまだに不明な点が多い。また最近になりヒトとマウスの CD4 陽性 T 細胞を始めとする免疫系に違いがあることが明らかになっており、動物モデルで得られた知見がヒトの疾患では応用できないことが少なくない。

本研究では関節リウマチ患者の炎症滑膜に存在する CD4 陽性細胞の組織内での分布や、表面抗原および産生するサイトカインの解析を行うことで、関節リウマチの未知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解析を行った。

B. 研究方法

① 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロ RNA の解析

関節リウマチ患者と健康人の 768 種類の血漿中マイクロ RNA を、リアルタイム PCR 法を用いたアレイにて網羅的に3検体ずつ解析し比較した。P 値が 0.05 以下または発現差が 4 倍以上あるものを第一次候補とした。これらのマイクロ RNA に対して8検体ず

つで発現比較を行い、P値が0.05以下で有意差のあるものを第二次候補とした。さらに、関節リウマチ患者および健常人での第二次候補マイクロRNAの発現をそれぞれ100名程度の検体で解析し、感度・特異度やリウマチ因子(RF)、抗CCP抗体、MMP3等のマーカーや疾患活動性との相関を解析した。また変形性関節症患者やSLE患者の血漿でのこれらのマイクロRNAの発現を解析し、関節リウマチに対する特異性を確認した。

② マイクロRNAによる関節炎制御の解析

関節炎動物モデルの血漿中でRA患者と同様に変化しているマイクロRNAの同定を試みた。次にこれらのマイクロRNAが関節炎の病態機序へ果たす役割を明らかにするために、*in vitro*の系や動物モデルを用いて、同定したマイクロRNAが関与する細胞群やそれが標的とする遺伝子、および信号経路を解析した。さらには関節炎モデルにてマイクロRNAの制御を行い、関節炎に対する効果を解析する事で、マイクロRNAが関節炎の治療標的となるのかを検討した。

③ ヒト関節リウマチ滑膜炎リンパ球の解析

関節リウマチの炎症局所には病態に関与する特徴的CD4陽性T細胞が集積していると考え、関節リウマチ患者の滑膜炎由来の検体を中心に多重免疫染色やフローサイトメトリーにて解析を行った。動物モデルからはCD4陽性T細胞のなかでもTh1細胞やTh17細胞が重要であると考えられているが、これまでの様々の臨床研究の結果からIFN- γ やIL-17と独立した因子が関節リウマチの病態に関与すると考え、これらと独立した発現パターンを示す因子を中心に解析を行った。またこれらの因子が、関節リウマチの病態に重要な役割を果たすことが分かっているTNFやIL-6などの炎症性サイトカインとどの様な関係を示すのかを解析した。

C. 研究結果

① 関節リウマチ特異的な血漿・関節液中マイクロRNAの解析

平成22年度には関節液中にもマイクロRNA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マイクロRNAと同様に安定していることを示した。miR-16, miR-132, miR-146a, miR-155 および miR-223 の5種類のマイクロRNA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、血漿中マイクロRNAと関節液中マイクロRNA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、それぞれからマイクロRNAの分泌を認め、関節液マイクロRNAの発現パターンは滑膜組織が放出するマイクロRNAのパターンに酷似していた。これらのことから、関節液中マイクロRNAは血漿中マイクロRNA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。

血漿中のマイクロRNA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関節リウマチ患者を区別しAUCは0.90と高値であったが、関節リウマチ患者とOA患者の区別は困難であり、さらに特異的な血漿中マイクロRNAの探索が必要と考えられた。

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。

平成23年度からはマイクロRNAアレイを開始し、平成24年度には網羅的に解析さ

れたマイクロ RNA 768 個のうち健常人、関節リウマチそれぞれ 3 検体の解析で候補となった一次候補血漿中マイクロ RNA 26 種を同定した。これらのマイクロ RNA のうち関節リウマチ患者、健常人それぞれ 8 検体で差が認められた血漿中マイクロ RNA は miR-24、miR-26a、miR-28-5p、miR-28-3p、miR-30a-5p、miR-30c、miR-30e-3p、miR-125a-5p、miR-126-3p の 8 種類であった。これらの血漿中マイクロ RNA はこれまでヒト疾患との関連が報告されていないものがほとんどであった。これらのマイクロ RNA について、それぞれ 100 名の健常人と関節リウマチ患者を区別する ROC 解析にて、優れた検査の指標である AUC 0.8 以上となるマイクロ RNA は miR-24、miR-26a、miR-125a-5p の 3 種類認められ、それぞれ感度 63.7% で特異度 89.5%、感度 53.9% で特異度 94.3%、感度 64.7% で特異度 89.5% であった(図1)。

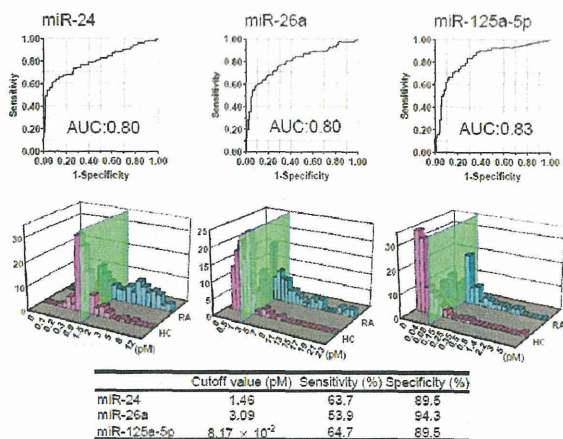


図1 血漿中 miR-24、miR-26a、miR-125a-5p の RA に対する感度特異度

また、血漿中マイクロ RNA の内、内部標準的な変化を示すものとして miR-30a-5p を同定した。これと miR-24、miR-125a-5p を組み合わせた複合値 (Estimated Probability of RA by plasma MiRNA (ePRAM))を作成することにより、78.4%の感度と 92.3%の特異度が得られた(図2)。

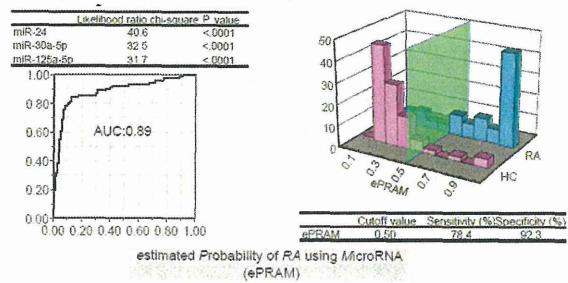


図2 複合値(ePRAM)による感度特異度

また 8 種類の候補血漿中マイクロ RNA と各関節リウマチ疾患活動性との相関を解析したところ、抗CCP抗体と相関を認めたものは miR-26a と miR-30e-3p、CRP とは miR-26a、miR-28-3p、miR-30c、miR-30e-3p、miR-126-3p、全身状態の患者 VAS と miR-24、miR-26a、miR-30c、miR-126-3p、DAS28(ESR)と miR-24、miR-26a、miR-30c、miR-126-3p、DAS28(CPR) と miR-24、miR-26a、miR-30c に相関を認めた。

また、抗CCP抗体陰性症例(15名)と陽性症例(87名)とでそれぞれの診断率を見たところ、miR-24 で 47%と 64%、miR-26a で 40%と 55%、miR-125a-5p で 67%と 64%、ePRAM で 73%と 78%と有意な差を認めなかったことから、血漿中マイクロ RNA を用いて抗CCP抗体陰性症例の診断の臨床応用が期待された。

② マイクロ RNA による関節炎制御

網羅的な血漿中マイクロ RNA の解析で関節リウマチ患者の血漿にて低下する傾向を認め、自己免疫性関節炎モデルでも関節炎を有するマウスの血漿で低下しているマイクロ RNA、miR-451 を同定した。マウス各臓器で miR-451 は血球系において高発現で、なかでも好中球が最も miR-451 を放出した。マウスに対して miR-451 の導入を行うと好中球の遊走が阻害され、それは miR-451 の直接の標的と新規に同定した 2 遺伝子を介した p38 MAPK のリン酸化の抑制によるものであった(図3)。

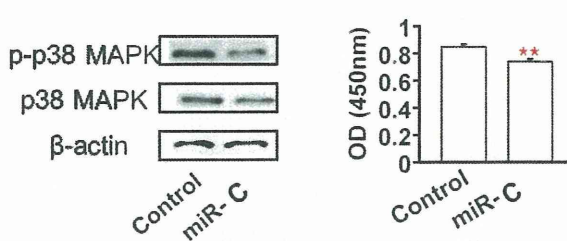


図3 miR-451による好中球でのp-p38の抑制

また miR-451 の全身投与により自己免疫性関節炎モデルでの関節炎重症度が低下した。

③ ヒト関節リウマチ滑膜炎リンパ球の解析

関節リウマチ滑膜組織の sublining 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(図4)。多重染色にて、滑膜組織中は CD161 陽性の CD3 陽性

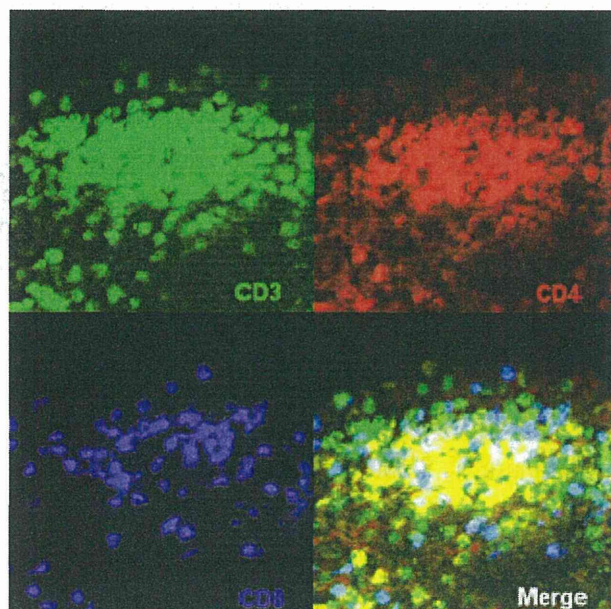


図4 RA 滑膜組織に浸潤する Tリンパ球。CD3(緑)、CD4(赤)、CD8(青)にて多重蛍光免疫染色を行った。

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。さらに、関節リウマチにて

CD4陽性細胞が産生する2因子を同定した。因子 A は健康人末梢血と比較して、関節リウマチ患者の末梢血や関節に存在する CD4 陽性細胞が Th 分画によらず幅広く非特異的に産生していた。因子 B は関節中 CD4 陽性細胞中に、Th1 細胞と同程度の高頻度で発現を認め、興味深い事に Th1 や Th17 とは独立した産生するパターンを示した。末梢血では関節リウマチ患者でも因子 B の発現をみとめず、関節炎特局所での現象に関与していると考えられた。また、炎症性サイトカインはこの分画を増強させることが明らかとなった。

D. 考察

①血漿中マイクロRNAと関節液中マイクロRNAの発現パターンは異なり、関節液中のマイクロRNAは関節局所の状況を反映していると考えられた。血漿中マイクロRNAはリウマチ因子や抗CCP抗体などの自己抗体とは産生機序の異なる新機軸のバイオマーカーである。血漿中の miR-24, miR-26a, miR-125a-5p, ePRAM はこれまでのバイオマーカーに劣らない感度および特異度を示すだけでなく、抗CCP抗体陰性患者においても同様の診断性を示し、抗CCP抗体陰性関節リウマチの早期診断に有用である可能性が示唆された。また、これまで主観的な評価であった VAS を血漿中マイクロRNAにて客観的に裏付けられる可能性が考えられた。本研究により、established RA において血漿中マイクロRNAは抗CCP抗体と独立した性質をもつ有用なバイオマーカーであることが示された。今後は、血漿中マイクロRNAを用いて早期 RA の診断や機能的予後予測が可能かを検討していく必要がある。

②本研究では miR-451 が p38 経路を介して好中球の遊走を抑制することが明らかとなった。また、miR-451 の全身投与により自己免疫性関節炎モデルでの関節炎重症度

が抑制された。miR-451 投与による関節炎抑制の機序には好中球の遊走抑制だけでなく、他の細胞群の関与も考えられ、それらに関しては今後も解析を要すると思われた。臨床的には、例えば慢性 C 型肝炎に対するマイクロ RNA 標的薬 Miravirsen が第二相臨床治験において安全性と有効性が示された。(N Engl J Med. 2013)。肝炎と同様に関節リウマチに対してもマイクロ RNA 標的薬による新たな治療が期待される。

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。関節リウマチ滑膜の 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た。また、動物モデルから自己免疫疾患に関与するとされていた Th1 や Th17 と独立した発現パターンを有する CD4 陽性細胞を同定した。この分画が関節リウマチの滑膜炎に関与する機序を明らかにすることで、治療抵抗性の関節リウマチ患者に対する新たな治療やより安全な治療への応用が期待された。

E. 結論

ヒト関節リウマチ検体を解析することで動物モデルからは得られない新たな研究シードを探索し、関節リウマチの新たな病態を明らかにする事を目的として本課題の研究を行った。その結果として、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、血漿中 miR-24、miR-26a、miR-125a-5p および ePRAM は関節リウマチの有用なマーカーで新機軸のバイオマーカーとして抗CCP抗体陰症例の診断などで期待できること、

マイクロRNAが好中球を介して関節炎に作用する新たな機序、さらにリウマチ滑膜炎局所に浸潤するCD4陽性細胞の新たな特徴を明らかにすることができた。

これらの知見は、抗CCP抗体陰性患者の早期診断や、既存薬に抵抗性の関節リウマチ患者に対する新たな治療へとつなげることができると考えている。この様に本研究は、関節リウマチの早期診断や新規治療を通じて関節リウマチ患者の ADL 低下の防止等で、国民の健康の向上に貢献するだけでなく医療経済的にも行政へと貢献することが出来る成果を得たと考える。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Kume N, Yoshitomi H, Mitsuoka H, Tanida S, Murata K, Shibuya H, Kasahara T, Kakino A, Fujita Y, Sawamura T, Yasuda T, Nakamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal is a potent biomarker and therapeutic target for human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1024-34.
2. Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One.* 2012;7(5):e37163.
3. Yamada M, Aoyama T, Mori S, Nishiguchi S, Okamoto K, Ito T, Muto S, Ishihara T, Yoshitomi H, Ito H. Objective assessment of abnormal gait in patients with rheumatoid arthritis using a smartphone. *Rheumatol Int.* 2012;32(12):3869-74.
4. Nishiguchi S, Yamada M, Nagai K, Mori S, Kajiwara Y, Sonoda T, Yoshimura K,

Yoshitomi H, Ito H, Okamoto K, Ito T, Muto S, Ishihara T, Aoyama T. Reliability and validity of gait analysis by android-based smartphone. *Telemed J E Health.* 2012 ;18(4):292-6.

5. Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis – Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. *PLoS One* 2013;8(3):e59341.

2. 学会発表

1. Murata K, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, Matsuda S. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24, miR-26a, and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting. 2012.11.11. Washington DC. USA.

2. 村田浩一、北折俊之、中村孝志、伊藤宣。Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 第30回骨代謝学会。2012.7.20. 東京。

3. Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *GCOE リポート* 2012. 2012.10.5. 淡路。

4. 村田 浩一、伊藤 宣、北折 俊之、吉富 啓之、石川 正洋、渋谷 秀幸、布留守敏、中村 孝志、松田 秀一。SDF-1は軟骨細胞のアクチン細胞骨格を制御し、肥大化を促進する。第27回日本整形外科学会基礎学術集会。2012.10.27. 名古屋。

5. 吉富啓之、小林志緒。Analysis of

synovial tissue with inflammation of rheumatoid arthritis as a tertiary lymphoid organ. 2012.12.5. 第41回日本免疫学会。神戸。

6. 中村孝志。関節外科の未来。第85回日本整形外科学会学術集会。2012.5. 京都。

7. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Murata K, Tanida S, Shibuya H, Kasahara Y, Yoshitomi H, Nakamura T. A crucial role for lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal on synovial inflammation in RA. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR2012, June 6~9, 2012.6.6, Berlin, Germany.

8. Ishikawa M, Ito H, Yoshitomi H, Akiyoshi M, Murata K, Furu M, Matsuda S. A crucial role for lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 signal in rheumatoid arthritis. 15th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR) 2012.9.11, JORDAN

9. 伊藤宣。生物製剤使用中患者の手術-生物学的製剤の適正な使用と諸問題-第22回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 2012.9.1. 大阪。

10. Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2013.1.26. San Antonio, USA. NIRA finalist.

H. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中 microRNA に関する特許申請中 二件

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マイクロ RNA の同定

研究代表者 吉富 啓之 京都大学大学院医学研究科
次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 特定准教授
研究協力者 小林 志緒 京都大学大学院医学研究科
次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 研究員
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:

関節リウマチの病態は十分に解明されているとはいえず、それが治療無効例につながっていると考えられる。不十分な病態解明の原因の1つには動物モデルとヒト関節リウマチの病態や免疫反応の違いがあると考えられ、実際にマウスモデルで得られた知見がヒトの疾患に応用できないことはしばしば経験される。そこで我々は関節リウマチ患者由来の検体から研究シードを探索し解析するという方針で研究を行ってきた。その成果の1つとして関節液および血漿中のマイクロ RNA の存在とそれらの関節リウマチに対するバイオマーカーとしての可能性を世界に先駆けて示した。血漿中マイクロRNAの網羅的な解析をさらに行い、26種類の候補を同定した。また血漿中で変化しているマイクロRNAの機能を動物モデルを用いて解析を行い、miR-451 が p38 経路を介して好中球の遊走を制御していることを明らかにした。CD4 陽性T細胞に関しては、関節リウマチ関節において IL-27 が Th17 細胞と炎症性サイトカインを抑制していること、さらに関節リウマチ滑膜炎局所に、Th1 や Th17 細胞と別個の CD4 陽性T細胞集団が存在することを明らかにしている。この様に本研究では、関節リウマチ患者由来の検体から関節リウマチの新たな診断や治療につながる知見を得ており、国民の健康とともに行政にも貢献できる成果を得たと考える。

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(関節リウマチ)で Th17 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関節リウマチ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、血漿中にはマイクロ RNA が安定して存在し、癌の特異的なマーカーとして重要であることが示された(Natl Acad Sci USA, 105:10513-18.)。関節リウマチでも血漿・関節液マイクロ RNA が重要なマーカーとして期待される。マイクロ RNA は抗原提示や信号伝達に参与する 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、特異的マイクロ RNA の解明は新たな病態の発見につながりえる。

本研究ではヒト関節リウマチにおける CD4 陽性 T 細胞の役割の解明と疾患特異的マイクロ RNA の同定を目的としている。患者にてどのような免疫現象が生じているのかを明らかにするため、ヒト関節リウマチ検体から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

胞内マイクロRNAだけでなく、血漿・関節液内マイクロRNAの解析を行う事が特色で、新たな関節リウマチの病態機序を明らかにすることが期待される。

平成24年度は関節リウマチの病態を明らかにするために、以下の2つの課題に関して研究を行った。

① マイクロRNAによる関節炎制御の解析

これまで、血漿中にはマイクロRNA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、関節リウマチ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、関節液中にもマイクロRNAが存在するのかどうかは知られていなかった。

平成22年度には、関節液中にも安定してマイクロRNAが存在する事、さらに細胞内で関節リウマチと関連することが知られている5種類のマイクロRNAを用いて、血漿中および関節系中マイクロRNAが関節リウマチの診断および病勢マーカーとして使用できる可能性を示した(Arthritis Res Ther. 2010 55(2)巻 R86 項)。

臨床応用、さらに新たな関節リウマチの病態解明を目指して、高い特異度と感度を有する血漿中マイクロRNAを同定するために、網羅的な血漿中マイクロRNAの解析を行った。さらに血漿中マイクロRNAはマーカーとしての役割だけでなく、自己免疫性関節炎の病態に関与している可能性がある。本解析では、詳細に機序を解明するために関節炎モデルを用いて解析した。関節炎にて変化するマイクロRNAがどのように関節炎の病態に関与するのかを、マイクロRNAが標的とする遺伝子や信号伝達系、さらに細胞群を明らかにすることを試みた。

② ヒト関節リウマチ炎症関節に遊走するリンパ球の解析

関節リウマチは滑膜組織の増殖と肥厚から始まり、引き続き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が生じ、患者の著しい日常生活能力の低下へと至る。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。さらに最近ではモデル動物とヒト関節リウマチとの免疫反応の違いが明らかになってきており、モデルマウスから同定した治療標的がヒトでは無効である場合が少なくない。従って、ヒト関節リウマチの関節局所に遊走するCD4陽性細胞が発現する遺伝子や、滑膜組織での分布を解析することで、関節リウマチ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。

本研究では関節リウマチ患者の炎症滑膜に存在するCD4陽性細胞の組織内での分布や、表面抗原および産生するサイトカインの解析を行うことで、関節リウマチの未知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解析を行った。

B. 研究方法

① マイクロRNAによる関節炎制御の解析

平成22年度には細胞内マイクロRNAとして関節リウマチ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、関節液中マイクロRNAの存在と、凍結融解等における安定性、および血漿中または関節液中マイクロRNAの関節リウマチに対する診断または病勢判定に関する可能性を示した(Arthritis Res Ther. 2010 55(2)巻 R86 項)。

平成23年度は、関節リウマチ患者と健常人の血漿中マイクロRNAを、リアルタイムPCR法を用いたアレイにて網羅的に3検体ずつ解析し比較し候補となる血漿中マイクロRNAを26種類同定した。100人レベルでの患者および健常人での解析は分担研究者である中村および伊藤が行った。

血漿中マイクロRNAはマーカーとしての

役割だけでなく、自己免疫性関節炎の病態に
関与している可能性がある。関節炎動物
モデルの血漿中で RA 患者と同様に変化し
ているマイクロ RNA の同定を試みた。次に
これらのマイクロ RNA が関節炎の病態機序
へ果たす役割を明らかにするために、in
vitro の系や動物モデルを用いて、同定した
マイクロ RNA が関与する細胞群やそれが
標的とする遺伝子、および信号経路を解析
した。さらには関節炎モデルにてマイクロ
RNA の制御を行い、関節炎に対する効果
を解析する事で、マイクロが関節炎の治療
標的となるのかを検討した。

② ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

関節リウマチの炎症局所には病態に関与する特徴的 CD4 陽性 T 細胞が集積していると考え、関節リウマチ患者の滑膜炎由来の検体を中心に多重免疫染色やフローサイトメトリーにて解析を行った。動物モデルからは CD4 陽性 T 細胞のなかでも Th1 細胞や Th17 細胞が重要であると考えられているが、これまでの様々の臨床研究の結果から IFN- γ や IL-17 と独立した因子が関節リウマチの病態に関与すると考え、これらと独立した発現パターンを示す因子を中心に解析を行った。またこれらの因子が、関節リウマチの病態に重要な役割を果たすことが分かっている TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインとどの様な関係を示すのかを解析した。

C. 研究結果

① マイクロ RNA による関節炎制御の解析

網羅的な血漿中マイクロ RNA の解析で関節リウマチ患者の血漿にて低下する傾向を認め、自己免疫性関節炎モデルでも関節炎を有するマウスの血漿で低下しているマイクロ RNA、miR-451 を同定した。マウス各臓器で miR-451 は血球系において高発現で、なかでも好中球が最も miR-451 を放

出した。マウスに対して miR-451 の導入を行うと好中球の遊走が阻害され、それは miR-451 の直接の標的と新規に同定した 2 遺伝子を介した p38 MAPK のリン酸化の抑制によるものであった(図3)。

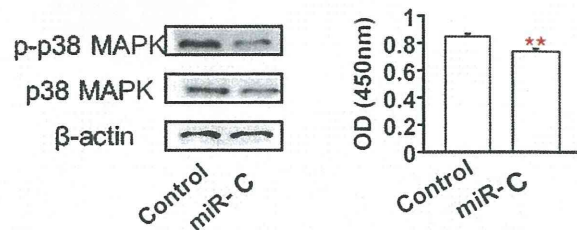


図3 miR-451 による好中球での p-p38 の抑制

また miR-451 の全身投与により自己免疫性関節炎モデルでの関節炎重症度が低下した。

② ヒト関節リウマチ関節に遊走するリンパ球の解析

関節リウマチ滑膜組織の sublining 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(図4)。多重染色にて、滑膜組織中は 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。さらに、関節リウマチにて CD4 陽性細胞が産生する 2 因子を同定した。因子 A は健常人末梢血と比較して、関節リウマチ患者の末梢血や関節に存在する CD4 陽性細胞が Th 分画によらず幅広く非特異的に産生していた。因子 B は関節中 CD4 陽性細胞中に、Th1 細胞と同程度の高頻度で発現を認め、興味深い事に Th1 や Th17 とは独立した産生するパターンを示した。末梢血では関節リウマチ患者でも因子 B の発現をみとめず、関節炎特局所での現象に関与していると考えられた。また、炎症性サイトカインはこの分画を増強させること

が明らかとなった。

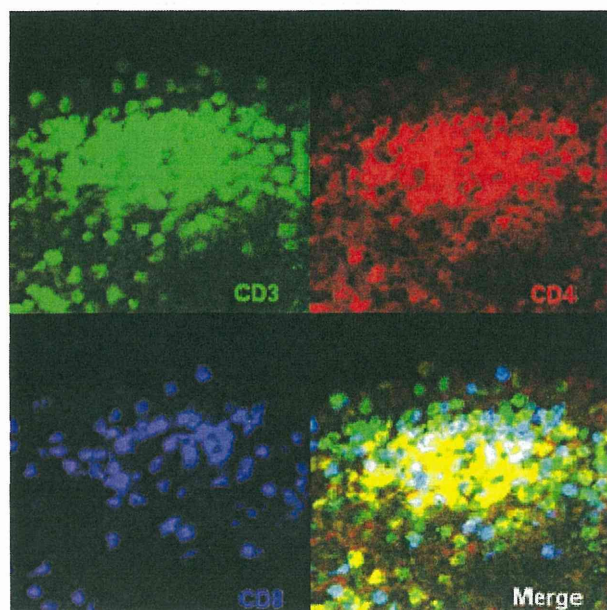


図4 RA 滑膜組織に浸潤する T リンパ球。CD3 (緑)、CD4 (赤)、CD8 (青) にて多重蛍光免疫染色を行った。

D. 考察

①本研究では miR-451 が p38 経路を介して好中球の遊走を抑制することが明らかとなった。また、miR-451 の全身投与により自己免疫性関節炎モデルでの関節炎重症度が抑制された。miR-451 投与による関節炎抑制の機序には好中球の遊走抑制だけでなく、他の細胞群の関与も考えられ、それらに関しては今後も解析を要すると思われた。臨床的には、例えば慢性 C 型肝炎に対するマイクロ RNA 標的薬 Miravirsen が第二相臨床試験において安全性と有効性が示された。(N Engl J Med. 2013)。肝炎と同様に関節リウマチに対してもマイクロ RNA 標的薬による新たな治療が期待される。

②滑膜組織の蛍光多重染色にて、T 細胞等の免疫細胞の滑膜組織での分布が明らかとなった。関節リウマチ滑膜の 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た。また、動物モデルから自己免疫疾患に関与するとされていた Th1 や Th17 と独立した発現パターンを有する CD4 陽性細胞を同定した。この分画が関節リウマチの滑膜炎に関与する機序を明らかにすることで、治療抵抗性の関節リウマチ患者に対する新たな治療やより安全な治療への応用が期待された。

E. 結論

ヒト関節リウマチ検体を解析することで動物モデルからは得られない新たな研究シードを探索し、関節リウマチの新たな病態を明らかにする事を目的として本課題の研究を行った。その結果として、関節リウマチ特異的な血漿中マイクロ RNA 候補の同定、マイクロ RNA が好中球を介して関節炎に作用するあらたな機序、さらにリウマチ滑膜炎局所に浸潤する CD4 陽性細胞の新たな特徴を明らかにすることができた。

これらの知見は、抗 CCP 抗体陰性患者の早期診断や、既存薬に抵抗性の関節リウマチ患者に対する新たな治療へとつなげることができると考えている。この様に本研究は、関節リウマチの早期診断や新規治療を通じて、関節リウマチ患者の ADL 低下を防止すること等で国民の健康の向上に貢献するだけでなく、医療経済的にも行政へと貢献することが出来る成果を得たと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Kume N, Yoshitomi H, Mitsuoaka H, Tanida S, Murata K, Shibuya H, Kasahara T, Kakino A, Fujita Y, Sawamura T, Yasuda T, Nakamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal is a potent biomarker and therapeutic target

for human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1024-34.

2. Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One.* 2012;7(5):e37163.

3. Yamada M, Aoyama T, Mori S, Nishiguchi S, Okamoto K, Ito T, Muto S, Ishihara T, Yoshitomi H, Ito H. Objective assessment of abnormal gait in patients with rheumatoid arthritis using a smartphone. *Rheumatol Int.* 2012;32(12):3869-74.

4. Nishiguchi S, Yamada M, Nagai K, Mori S, Kajiwara Y, Sonoda T, Yoshimura K, Yoshitomi H, Ito H, Okamoto K, Ito T, Muto S, Ishihara T, Aoyama T. Reliability and validity of gait analysis by android-based smartphone. *Telemed J E Health.* 2012 ;18(4):292-6.

5. Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. *PLoS One* 2013;8(3):e59341.

2. 学会発表

1. Murata K, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, Matsuda S. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24, miR-26a, and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting. 2012.11.11. Washington DC. USA.

2. 村田浩一、北折俊之、中村孝志、伊藤

宣. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 第30回骨代謝学会. 2012.7.20. 東京.

3. Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. GCOE リポート 2012. 2012.10.5. 淡路.

4. 村田浩一、伊藤宣、北折俊之、吉富啓之、石川正洋、渋谷秀幸、布留守敏、中村孝志、松田秀一. SDF-1は軟骨細胞のアクチン細胞骨格を制御し、肥大化を促進する. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012.10.27. 名古屋.

5. 吉富啓之、小林志緒. Analysis of synovial tissue with inflammation of rheumatoid arthritis as a tertiary lymphoid organ. 2012.12.5. 第41回日本免疫学会. 神戸.

6. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Murata K, Tanida S, Shibuya H, Kasahara Y, Yoshitomi H, Nakamura T. A crucial role for lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal on synovial inflammation in RA. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR2012, June 6~9, 2012.6.6, Berlin, Germany.

7. Ishikawa M, Ito H, Yoshitomi H, Akiyoshi M, Murata K, Furu M, Matsuda S. A crucial role for lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 signal in rheumatoid arthritis. 15th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR) 2012.9.11, JORDAN

8. Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research

Society. 2013.1.26. San Antonio, USA.
NIRA finalist.

H. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中 microRNA に関する特許
申請中 二件

関節リウマチにおける血漿中マイクロ RNA の臨床的解析

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 名誉教授
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
研究協力者 布留 守敏 京都大学大学院医学研究科 リウマチ性疾患制御学 助教

研究要旨:

2010年には関節リウマチの新分類基準が発表され、より早期に診断が可能となったが ACPA やリウマチ因子が陰性の場合には確定診断に 11 箇所以上の関節腫脹を必要とし早期診断は難しい。本研究では新機軸である血漿中マイクロ RNA が RA 治療の臨床現場に応用可能かを明らかにするため、網羅的に解析し候補となった関節リウマチ関連マイクロ RNA の感度・特異度、疾患活動性やリウマチ因子、赤沈、CRP、抗 CCP 抗体などのバイオマーカーとの相関等をそれぞれ 100 検体以上関節リウマチ患者および健常人由来の血漿を用いて検討した。その結果、miR-24、miR-26a、miR-125a-5p およびそれらの複合値 ePRAM が 60%程の感度と 90%程の特異度を示した。また興味深いことに、血漿中マイクロ RNA は抗 CCP 抗体が陰性の群でも同様の感度特異度を示し、抗 CCP 抗体陰性症例の早期診断に寄与する可能性が示唆された

A. 研究目的

2010 年には関節リウマチの新分類基準が発表され、より早期に診断が可能となったが ACPA やリウマチ因子が陰性の場合には確定診断に 11 箇所以上の関節腫脹を必要とし早期診断は難しい。本研究では新機軸である血漿中マイクロ RNA が RA 治療の臨床現場に応用可能かを明らかにするため、網羅的に解析し候補となった関節リウマチ関連マイクロ RNA の感度・特異度、疾患活動性やリウマチ因子、赤沈、CRP、抗 CCP 抗体などのバイオマーカーとの相関等をそれぞれ 100 検体以上関節リウマチ患者および健常人由来の血漿を用いて検討する。

B. 研究方法

関節リウマチ患者と健常人それぞれ 3 名の血漿中マイクロ RNA をマイクロアレイにて網羅的に解析した。候補となったマイクロ RNA の発現を 8 検体ずつの血漿にて絶対定量し、有意差のあるものを絞り込んだ。また、血漿中マイクロ RNA の内部標準には一定の見解がなく、内部標準として使用可能

な血漿中マイクロ RNA についての検討も行った。これらの解析にて候補となった血漿中マイクロ RNA の発現を関節リウマチ患者 102 名、健常人 104 名で比較し、それぞれの感度特異度、および DAS28 などの関節リウマチの疾患活動性やリウマチ因子、ACPA、MMP3、赤沈、CRP などの診断マーカーとの相関を解析した。最後に ACPA 陰性症例でも同様に判別できるのかを検討した。

C. 研究結果

それぞれ 3 人の関節リウマチ患者と健常人の血漿中マイクロ RNA をアレイを用いて網羅的に解析し 26 種類のマイクロ RNA を候補とした。さらに 8 検体ずつの解析にて解析を行い、8 種類の血漿中マイクロ RNA を最終候補とした。特異的なマイクロ RNA の検索と同時に、内部標準の検索として全マイクロ RNA の平均と同様の変化を示すマイクロ RNA をリウマチ患者および健常人それぞれ 48 名の検体にて検索し、内部標準となり得るマイクロ RNA として miR-30a-5p を同定した。関節リウマチ 102 名、健常人

104名の血漿で合計9種類のマイクロRNAの発現を解析し、高い感度・特異度を示す血漿中マイクロRNAとしてmiR-24、miR-26aおよびmiR-125a-5pを見いだした。それぞれの感度と特異度は63.7%と89.5%、53.9%と94.3%、64.7%と89.5%であった。さらに、miR-24、miR-30a-5pとmiR-125a-5pの組み合わせ(Estimated Probability of RA by plasma MiRNA (ePRAM))により78.4%、92.3%と感度および特異度の向上が得られた。またこの計算式でmiR-30a-5pは他の値に対して負の係数となっており、内部標準としての働きがあると考えられた。また、リウマチ因子、ACPA、CRP、赤沈、MMP3などの臨床検査値やDAS28等の疾患活動性とこれらの血漿中マイクロRNAやePRAMとの相関を解析したところ、それぞれの相関は弱く、ePRAMがDAS28と相関した程度であった。また、ACPA陰性症例(15名)と陽性症例(87名)とでそれぞれの診断率を見たところ、miR-24で47%と64%、miR-26aで40%と55%、miR-125a-5pで67%と64%、ePRAMで73%と78%と有意な差を認めなかったことから、血漿中マイクロRNAはACPA陰性症例の診断に使用できる事が期待された。

D. 考察

血漿中マイクロRNAと関節液中マイクロRNAの発現パターンは異なり、関節液中のマイクロRNAは関節局所の状況を反映していると考えられた。血漿中マイクロRNAはリウマチ因子や抗CCP抗体などの自己抗体とは産生機序の異なる新機軸のバイオマーカーである。血漿中のmiR-24、miR-26a、miR-125a-5p、ePRAMはこれまでのバイオマーカーに劣らない感度および特異度を示すだけでなく、抗CCP抗体陰性患者においても同様の診断性を示し、抗CCP抗体陰性関節リウマチの早期診断に有用である可能性が示唆された。また、これまで主観的な評価であったVASを血漿中マイクロRNAにて客観的に裏付けられる

可能性が考えられた。本研究により、established RAにおいて血漿中マイクロRNAは抗CCP抗体と独立した性質をもつ有用なバイオマーカーであることが示された。今後は、血漿中マイクロRNAを用いて早期RAの診断や機能的予後予測が可能かを検討していく必要がある。

E. 結論

新機軸の関節リウマチのバイオマーカーである血漿中マイクロRNAは関節リウマチにの判別において高い感度と特異度を示し、ACPA陰性症例に対する早期診断が特に期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Kume N, Yoshitomi H, Mitsuoka H, Tanida S, Murata K, Shibuya H, Kasahara T, Kakino A, Fujita Y, Sawamura T, Yasuda T, Nakamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal is a potent biomarker and therapeutic target for human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1024-34.

2. Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One.* 2012;7(5):e37163.

2. 学会発表

1. 村田浩一、北折俊之、中村孝志、伊藤宣. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 第30回骨代謝学会. 2012.7.20. 東京.

2. 村田浩一、伊藤宣、北折俊之、吉富啓之、石川正洋、渋谷秀幸、布留守敏、中村孝志、松田秀一. SDF-1は軟骨細胞のア

クチン細胞骨格を制御し、肥大化を促進する。第27回日本整形外科学会基礎学術集会。2012.10.27. 名古屋。

3. 中村孝志。関節外科の未来。第85回日本整形外科学会学術集会。2012.5. 京都。

4. Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Murata K, Tanida S, Shibuya H, Kasahara Y, Yoshitomi H, Nakamura T. A crucial role for lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal on synovial inflammation in RA. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR2012, June 6~9, 2012.6.6, Berlin, Germany.

G. 知的財産研の出願・登録状況

関節液・血漿中 microRNA に関する特許申請中