



MicroRNA-124 inhibits TNF- α - and IL-6-induced osteoclastogenesis

Ohnuma, Kenichiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7556号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007556>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

MicroRNA-124 inhibits TNF- α and IL-6-induced osteoclastogenesis

マイクロ RNA-124 は TNF- α /IL-6 依存性破骨細胞分化を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

臨床検査医学

(指導教員：西村 善博 教授)

大沼 健一郎

【序論】

関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) は関節滑膜の炎症と骨・関節破壊を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。RA の骨破壊の中心的役割を担う破骨細胞の分化過程において、receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) は破骨細胞特異的な遺伝子群の発現に必須である転写因子 NFATc1 を強く誘導することから、RANKL-NFATc1 経路が破骨細胞分化経路として重要であると考えられてきた。しかし近年、RA の病態にも深く関与する TNF- α と IL-6 の共刺激により RANKL 非依存性に骨吸収活性を有する破骨細胞様細胞が分化しうること、そしてこの TNF- α /IL-6 依存性経路にも、RANKL 依存性経路と同じく転写因子 NFATc1 が必須であることが報告された。

18~25 塩基長のマイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質をコードしない RNA であり、標的 mRNA の不安定化および蛋白翻訳抑制に関わっている。ヒトタンパク質をコードする遺伝子の 3 割程度が miRNA により制御されているとも考えられており、miRNA が細胞周期、アポトーシス、発がん、さらには免疫機能といった多彩な生命現象を制御していることが明らかになりつつある。我々はこれまでに、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞周期タンパクの発現を抑制する miR-124 が RA 患者滑膜細胞において発現が低下していることや miR-124 の局所投与により、RANKL 依存性破骨細胞分化が抑制され、ラットアジュバンド関節炎を抑制することを報告した。しかしこれまでに、miR-124 が RANKL 非依存性破骨細胞分化にどのような影響を与えるかについては明らかにはされていない。そこで我々は、miR-124 の RA の病態への関与をさらに検討するため、TNF- α /IL-6 依存性破骨細胞分化経路への miR-124 の影響を検討した。

【方法】

6~10 週齢の雌マウス大腿骨から骨髓細胞を採取し、M-CSF (20ng/ml) で 48 時間培養し、骨髓由来マクロファージを得た。その後、骨髓由来マクロファージを M-CSF (20 ng/ml) 及び RANKL 依存性破骨細胞分化をブロックする Osteoprotegerin (1 μ g/ml) 添加下で、TNF- α (50 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) で共刺激した。この分化培養系を用いて、miR-124 mimic 導入による破骨細胞分化、骨吸収活性への影響について評価した。破骨細胞への分化の確認には TRAP 染色を行い、TRAP 染色陽性かつ 3 核以上の核を有する細胞を破骨細胞とした。骨吸収活性の評価には骨吸収活性評価キットを用い、14 日間培養後に pit area の面積を測定した。次に、NFATc1 をコードする *NFAT2* 遺伝子と、その下流で破骨細胞分化に関わる遺伝子群である *ctsk*, *ACP5*, *DC-stamp* 及び *Itgb3* 遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。さらに、NFATc1 タンパク発現量をウェスタンブロット法で評価した。各実験において、対照群は MOCK 群および Negative mimic 導入群とし、Negative mimic および miR-124 mimic は終濃度 5nM でトランスフェクションした。統計解析は GraphPad PRISM を用い、 $p < 0.05$ を有意基準として判定した。

【結果】

TNF- α /IL-6 刺激により分化する TRAP 陽性の多核細胞数は、MOCK 群と Negative mimic 群と比較して、miR-124 mimic 群で有意に低下していた ($p < 0.05$)。同様に、骨吸収の指標である pit area の面積は、MOCK 群と Negative mimic 群に比べ miR-124 mimic 群で有意に低下していた ($p < 0.05$)。さらに、破骨細胞の分化に必須である遺伝子 *ctsk*, *ACP5*, *DC-stamp* 及び *Itgb3* のそれぞれの mRNA 発現量は、miR-124 mimic 群で有意に低下していた ($p < 0.05$)。一方、*NFATc1* mRNA 発現量については MOCK 群、Negative mimic 群、miR-124 mimic 導入群の間に差は認められなかったが、NFATc1 タンパク発現量は miR-124 mimic 導入により減少していた。

【考察】

miR-124 導入により、*NFATc1* mRNA 発現量は減少することなく NFATc1 タンパク発現量が低下していたことから、miR-124 は、NFATc1 遺伝子翻訳抑制を作用点として破骨細胞特異的の遺伝子群の発現抑制を介し TNF- α /IL-6 依存性経路による破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。これまでに miR-124 が RANKL 依存性破骨細胞分化を抑制することが明らかにされているが、今回の研究により、miR-124 は *NFATc1* mRNA 翻訳抑制を作用点として TNF- α /IL-6 依存性経路による破骨細胞分化を抑制することが明らかとなった。本研究から得られた知見は、RA の骨破壊を防ぐ治療戦略として miR-124 がもつ新たな可能性を示唆するものである。すでに、miR-146a および miR-223 が、miR-124 と同様に RANKL 依存性破骨細胞分化を抑制することが報告されている。しかし下記の 2 点から miR-124 が最も RA の治療に有用であると考えられる。第一に、他の miRNA と異なり miR-124 は破骨細胞分化に必須の NFATc1 を制御することから、効率よく破骨細胞分化を制御できる。第二に、RA 患者の滑膜組織において miR-124 は発現が低下している一方、miR-146a および miR-223 は逆に発現が亢進している。すなわち、後者の 2 分子を用いて破骨細胞分化を抑制するには高濃度の miRNA を投与する必要がある。

近年、RA の治療には分子生物学的製剤がよく用いられているが、効果が大きい反面で、薬価が高く二次無効の患者も存在する。一方、miRNA は低分子 RNA であり、従来薬と異なる作用点を持つことから安価で効果的な治療となる可能性があり、また従来薬との併用も考えられる。しかし、miRNA を治療に用いるためには、安全性とドラッグデリバリーの面で課題がある。今後、miRNA-124 を臨床応用するためには、これらを克服する必要がある。

【結語】

miR-124 は NFATc1 の翻訳抑制を作用点として、TNF- α /IL-6 依存性経路による破骨細胞分化を抑制することが明らかとなり、RA による骨破壊の治療に有用となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2901号	氏 名	大沼 健一郎
論文題目 Title of Dissertation	MicroRNA-124 inhibits TNF- α - and IL-6-induced osteoclastogenesis マイクロ RNA-124 は TNF- α /IL-6 依存性破骨細胞分化を抑制する		
審査委員 Examiner	主 査 森信 靖雄 Chief Examiner 副 査 小川 英 Vice-examiner 副 査 榎 峰 亮 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【序論】関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis; RA) は関節滑膜の炎症と骨・関節破壊を特徴とする全身性の自己免疫疾患である。骨破壊に中心的に関わる破骨細胞は、receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) により転写因子 NFATc1 が誘導され分化すると考えられてきた。しかし近年、RA の病態に深く関与する Tumor necrosis factor (TNF)- α と Interleukin (IL)-6 の共刺激により RANKL 非依存性に骨吸収活性を有する破骨細胞が分化しうること、そしてこの経路にも、NFATc1 が必須であることが報告された。

マイクロ RNA (miRNA) は、アミノ酸をコードしない RNA であり、標的 mRNA の不安定化および蛋白翻訳抑制により、細胞周期、アポトーシス、発がん、さらには免疫機能といった多彩な生命現象を制御していることが明らかになりつつある。我々はこれまでに、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞周期タンパクの発現を抑制する miR-124 が RA 患者滑膜細胞において発現が低下していることや miR-124 の局所投与により、ラットアジュバンド関節炎を抑制することを報告した。しかしこれまでに、miR-124 が RANKL 非依存性破骨細胞分化にどのような影響を与えるかについては明らかにはされていない。そこで我々は、miR-124 の RA の病態への関与をさらに検討するため、TNF- α /IL-6 依存性破骨細胞分化経路への miR-124 の影響を検討した。

【方法】6~10 週齢の雌マウス大腿骨から骨髓細胞を採取し、M-CSF (20ng/ml) で 48 時間培養し、骨髓由来マクロファージを得た。その後、骨髓由来マクロファージを M-CSF (20 ng/ml) 及び RANKL を阻害する Osteoprotegerin (1 μ g/ml) 添加下で、TNF- α (50 ng/ml) と IL-6 (50 ng/ml) で共刺激した。この分化培養系を用いて、miR-124 mimic 導入による破骨細胞分化、骨吸収活性への影響について評価した。破骨細胞への分化の確認には TRAP 染色を行い、TRAP 染色陽性かつ 3 核以上の核を有する細胞を破骨細胞とした。骨吸収活性の評価には骨吸収活性評価キットを用い、14 日間培養後に pit area の面積を測定した。

次に、NFATc1 をコードする *NFAT2* 遺伝子と、その下流で破骨細胞分化に関わる遺伝子群である *ctsk*, *ACP5*, *DC-stamp* 及び *Itgb3* 遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定した。さらに、NFATc1 タンパク発現量をウェスタンブロット法で評価した。

各実験において、対照群は MOCK 群および Negative mimic 導入群とし、Negative mimic および miR-124 mimic は終濃度 5nM でトランスフェクションした。統計解析には GraphPad PRISM を用い、 $p < 0.05$ を有意基準として判定した。

【結果】TNF- α /IL-6 刺激により分化する破骨細胞数は、MOCK 群と Negative mimic 群と比較して、miR-124 mimic 群で有意に低下していた ($p < 0.05$)。同様に、骨吸収窩面積は、MOCK 群と Negative mimic 群に比べ miR-124 mimic 群で有意に低下していた ($p < 0.05$)。さらに、破骨細胞特異的遺伝子である *ctsk*, *ACP5*, *DC-stamp* 及び *Itgb3* のそれぞれの mRNA 発現量は、miR-124 mimic 群で有意に低下していた ($p < 0.05$)。

一方、*NFATc1* mRNA 発現量については MOCK 群、Negative mimic 群、miR-124 mimic 導入群の間に差は認められなかったが、*NFATc1* タンパク発現量は miR-124 mimic 導入により減少していた。

【考察】miR-124 導入により、*NFATc1* mRNA 発現量は減少することなく *NFATc1* タンパク発現量が低下していたことから、miR-124 は、*NFATc1* 遺伝子翻訳抑制を作用点として破骨細胞特異的遺伝子群の発現抑制を介し TNF- α /IL-6 依存性経路による破骨細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

本研究から得られた知見は、RA の骨破壊を防ぐ治療戦略として miR-124 がもつ新たな可能性を示唆するものである。すでに、miR-146a および miR-223 が、miR-124 と同様に RANKL 依存性破骨細胞分化を抑制することが報告されているが、下記の 2 点から miR-124 が最も RA の治療に有用であると考えられる。第一に、他の miRNA と異なり miR-124 は破骨細胞分化に必須の *NFATc1* を制御することから、効率よく破骨細胞分化を制御できる。第二に、RA 患者の滑膜組織において miR-124 は発現が低下している一方、miR-146a および miR-223 は逆に発現が亢進している。すなわち、後者の 2 分子を用いて破骨細胞分化を抑制するには高濃度の miRNA を投与する必要がある。

近年、RA の治療には分子生物学的製剤がよく用いられているが、効果が大きい反面で、薬価が高く二次無効の患者も存在する。一方、miRNA は従来薬と異なる作用点を持つことから安価で効果的な治療となる可能性があり、また従来薬との併用も考えられる。しかし、miRNA を治療に用いるためには、安全性とドラッグデリバリー面で課題がある。今後、miRNA-124 を臨床応用するためには、これらを克服する研究が必要である。

【結語】miR-124 は *NFATc1* の翻訳抑制を作用点として、TNF- α /IL-6 依存性経路による破骨細胞分化を抑制することが明らかとなり、RA による骨破壊の治療に有用となる可能性が示唆された。

本研究は、破骨細胞分化における miR-124 の役割を研究したものであるが、従来明らかでなかった、RANKL 非依存経路における miR-124 の *NFATc1* 蛋白発現抑制効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積である。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。