

主論文の要旨

Serum microRNAs as Potential Biomarkers of Juvenile Idiopathic Arthritis

〔 若年性特発性関節炎における血清マイクロ RNA の
バイオマーカーとしての可能性 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

神谷 泰子

【緒言】

若年性特発性関節炎 (Juvenile idiopathic arthritis, JIA) の有病率は小児人口 10 万人当たり 8.8-11.6 人とされており、小児期に発症する慢性関節炎の中で最も頻度の高い疾患である。臨床的には全身型 JIA と関節型 JIA に大別される。詳しい病因・病態は不明であるが全身型 JIA は関節型 JIA とは異なるサイトカインプロファイルを示し IL-6 や IL-18 の過剰産生が認められることが報告されており、自己炎症性疾患の一つとして考えられるようになってきた。マイクロ RNAs (miRNAs) はタンパク質をコードしない 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、複数の mRNA を標的としてタンパク質レベルでの発現を制御しており、悪性腫瘍や自己免疫疾患などの病態への関与が報告されている。また、体液中において cell-free の状態で安定して存在することができるため、様々な疾患において診断および予後予測のバイオマーカーとしての可能性が模索されている。これまでに JIA と臨床症状や病理像を共有する成人の関節リウマチ (RA) では miR-16、miR-132、miR-146a 等の miRNAs の発現異常が報告されている。今回、JIA 患者の血清および末梢血白血球 (PBLs) における 5 種類の miRNAs (miR-16、miR-132、miR-146a、miR-155 と miR-223) を測定し、疾患活動性のバイオマーカーとしての可能性を評価した。

【対象および方法】

対象となる JIA 患者は国際リウマチ学会の定義 (ILAR 分類) を満たす全身型 JIA 患者 8 名、多関節型 JIA 患者 16 名 (そのうち 7 名は RF 陽性) であり、臨床的特徴や検査所見は Table 1 に示した。“JIA 急性期”は発熱 (>38°C) や関節所見を伴うもの、また“JIA 回復期”は治療中または治療後に症状を伴わず CRP 陰性 (<0.1mg/dl) で ESR の上昇がない (<15 mm/h) ものと定義した。健常対照は自己免疫疾患や自己炎症性疾患の既往のない 8 名である。本研究は名古屋大学附属病院および、あいち小児保健医療総合センターの施設内倫理委員会に承認され、検体採取は、患者およびその保護者からの同意を得たうえで行った。採取した血清は-20°Cで保管し、PBLs は EDTA 処理した血液を溶血処理にて分離した。血清 200 μ L または PBLs 1×10^6 個から RNA 抽出を行ったがその際、spike-in コントロールとして 2×10^{10} copies/ μ L の *Caenorhabditis elegans* miR-39 (*C. elegans* miR-39) を用いた。全 RNA は cDNA に逆転写し、その後 real-time PCR にて miR-16、miR-132、miR-146a、miR-155、miR-223 を測定した。各 miRNAs 発現量は目的遺伝子 (標的 miRNA) とレファレンス遺伝子 (*C. elegans* miR-39) の CT 値の差 (Δ CT) から計算式 $2^{-\Delta CT}$ にて求め、一元配置分散分析 (Bonferroni 補正)、t 検定にて評価した。また、各 miRNAs と各臨床検査項目の比較は回帰分析にて行った。 p 値 < 0.05 を統計学的有意差ありとした。統計学的解析は SPSS を用いた。

【結果】

1. JIA 患者の血清および PBLs の miRNAs 発現量

JIA タイプ別と疾患活動性による血清中 miRNAs 発現量を比較した結果を Fig.1 に示す。全身型 JIA 急性期の miR-223 は健常対照に比べ有意に上昇しており (Fig.1A)、全身型 JIA 急性期および回復期の miR-132 は多関節型 JIA 回復期に比べ有意に上昇していた (Fig.1B)。また、多関節型 JIA 回復期の miR-155 は全身型 JIA 急性期に比べ有意に低かった (Fig.1C)。MiR-146a および miR-16 は有意な変化を認めなかった (Fig.1D)。さらには全身型 JIA 患者 8 名と多関節型 JIA 患者 6 名から急性期と回復期のペア検体での miRNAs を比較した。その結果、全身型 JIA 急性期の miR-223 は回復期に比べ有意に上昇していた (Fig.1E) が、一方で多関節型 JIA 急性期の miR-223 は回復期に比べ 6 名中 5 名で上昇していたが有意差は認めなかった (Fig.1F)。他の miRNAs は急性期と回復期との比較で有意差を認めなかった。さらに JIA 患者 6 名 (全身型 JIA 患者 3 名、多関節型 JIA 患者 3 名) および健常対照 3 名から採取した PBLs の miRNAs 発現量を JIA タイプ別に比較したが有意差を認めなかった。

2. JIA 患者の血清 miRNAs 発現量と臨床検査項目および臨床像との関連

JIA における血清 miRNAs 発現量の疾患バイオマーカーとしての可能性について検討した。一般的に JIA の疾患活動性は ESR、MMP-3、CRP などによって評価されることが多いが、JIA タイプ別にこれらの検査項目と miRNAs 発現量との相関を検討した。全身型 JIA および多関節型 JIA のどちらも miR-223 および miR-16 がそれぞれ ESR および MMP-3 との相関を示した (Fig. 2A-D)。また、多関節型 JIA の miR-146a と miR-223 は MMP-3 との相関を示した (Fig. 2E,F)。一方で、いずれの miRNAs においても、CRP とは相関を示さなかった。

多関節型 JIA において RF は診断および予後予測マーカーとして用いられているが、各種 miRNAs と RF の有無について有意な相関は示さなかった。また、一部の全身型 JIA 患者はステロイド等の従来の治療に不応であり、生物学的製剤を必要とした。それらの患者の一部では、急性期の血清 miR-146a が著明に上昇していた。

【考察】

本研究では、JIA 患者における血清および PBLs 中の miRNAs 発現量を定量し、それらの疾患バイオマーカーとしての可能性について検討した。血清 miR-223 は全身型 JIA 急性期で有意に上昇し、ESR と有意な相関を認めた。また、多関節型 JIA においても、血清 miR-223 は、ESR および MMP-3 と有意な相関を示した。MiR-223 は好中球やマクロファージなどの骨髄系細胞で発現しており分化調整をしているが、破骨細胞は単球/マクロファージ系細胞が分化したものであり RA 患者の関節において骨基質を侵食する役割を担っている。よってこれらの結果は破骨細胞の分化誘導に miR-223 が重要であるとの報告と矛盾しない。JIA の病態はタイプ別で異なると考えられており、多関節型 JIA では MMP-3 が疾患活動性マーカーとして用いられている。本研究では多関節型 JIA のみ血清 miR-223 と MMP-3 の相関が認められており、血清 miR-223 の産生細胞は全身型 JIA と多関節型 JIA で異なる可能性が示唆された。

本研究では健常対照に比べ JIA では炎症促進性 miRNAs である miR-146a や miR-155 の有意な上昇を認めず、多関節型において血清 miR-146a と MMP-3 が有意な相関を認めたのみであった。抗炎症性 miRNA である miR-132 は多関節型 JIA 回復期と比べると全身型 JIA 急性期および回復期の両方で有意な上昇を認めたが、血清 miR-132 と MMP-3 および ESR は相関を示さなかった。RA ではリンパ球に比べマクロファージ/単球が miR-146a と miR-155 の産生細胞であり、miR-132 は線維芽細胞様滑膜細胞や滑膜組織で比較的発現上昇しているなど、滑液と血漿では異なった miRNAs 発現パターンを示すことが報告されている。よって、JIA でもそれらの組織で産生された miR-132 は、血清中には十分に反映されない可能性があり、また miR-146a と miR-155 の産生細胞が滑膜組織なのか、末梢血中あるいは局所的に浸潤している炎症細胞であるかによって血清 miRNAs 発現量に影響を与える可能性があると考えられる。

MMP-3 や ESR とともに CRP も JIA の疾患活動性の評価に広く用いられているが、本研究ではどの miRNAs とも相関を示さなかった。その理由は不明ではあるが、可能性として JIA 患者 24 名中 11 名で IL-6 阻害薬である tocilizumab が定期的に使用されており、それにより強力に CRP 合成が阻害されていたことが原因として挙げられる。

本研究では、PBLs 中の miRNAs 発現量は解析したが、PBLs を入手し得た症例数が少なく、血清 miRNAs との相関を十分に解析することができなかった。

【結論】

本研究では、JIA 患者において、その病態との関連が示唆される 5 種類の miRNAs の発現について検討した。全身型 JIA 急性期では、血清 miR-223 の有意な上昇を認め、疾患活動性との関連が示唆された。MiR-223 等の miRNAs は、JIA の疾患活動性を評価する有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。