

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10476

研究課題名(和文) 骨壊死に対するmiRNA導入骨髄単核球移植による骨修復促進効果

研究課題名(英文) Acceleration of bone repair using miRNA-induced bone marrow cells for osteonecrosis

研究代表者

山崎 琢磨 (YAMASAKI, Takuma)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・寄附講座准教授

研究者番号：50444683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド関連骨壊死患者から採取した骨髄にはmiR-31, miR-34a, miR-146, miR-210, miR-218が高発現していた。同定された各miRNAを添加した骨分化誘導培地を用いた骨髄細胞培養では、いずれもcollagen type 1A1の高発現を認め、miR-34a以外のmiRNAではRunx 2の高発現も認めた。また、各miRNAをラット偽関節モデルに投与し、micro CTを用いたX線学的評価により、骨形成能を促進させることが示唆された。適切なmiRNAの導入により移植細胞自身および分泌するmiRNAなどの因子も加わり、骨修復の促進効果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA (miRNA) was purified from bone marrow aspirated from the patients of steroid-related osteonecrosis of the femoral head. By global analysis of miRNA, overexpression of miR-31, miR-34a, miR-146, miR-210, miR-218 were detected. In order to evaluate the potential of bone formation, each miRNA was administrated to bone differentiation-inducing medium and bone marrow-derived cells were cultured. These 5 miRNAs induced overexpression of collagen type 1A1, and miR-31, miR-146, miR-210, miR-218 induced overexpression of Runx 2. Moreover, each miRNA was administrated to pseudarthrosis in rat and was proven to accelerate bone formation by micro CT evaluation. Induction of appropriate microRNA may have a potential of acceleration of bone formation with participating autocrine effect of miRNA.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨壊死 単核球 miRNA 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性大腿骨頭壊死症は大腿骨頭への血行障害による骨壊死が発生し、骨頭の圧潰に続発して股関節症へ進展する厚生労働省指定の難治性特定疾患である。これまで当グループでは骨髄間葉系細胞などを用いた細胞移植による組織再生の研究を行い、末梢血より得られた CD34(+)細胞の静脈内投与による骨頭壊死の予防効果、並びに術中回収血を用いた組織再生につき報告し、その臨床応用を行っている。大腿骨頭壊死症については、低侵襲な自家骨髄単核球移植術を開発し、骨頭圧潰防止と骨修復効果を示すことができたが(基盤B、H19年-H20年)、その成績は患者の年齢や骨壊死範囲に依存しており、現状では細胞の骨修復能が不十分と考えられた。そこで、質を高めた骨髄単核球の移植による早期骨修復へのさらなる治療法の開発が望まれる。

(2) 近年、約 22 塩基対の短鎖 RNA 分子である microRNA(miRNA)が新しい遺伝子制御因子として注目されている。miRNA は標的遺伝子のメッセンジャーRNA に結合することで、多くの遺伝子の発現制御に関わることから iPS 誘導にも関わり、リプログラミングや細胞分化といった細胞の性質決定に非常に重要な因子である。また近年では、これら miRNA が“エクソソーム”とよばれるナノサイズの膜小胞に包まれたうえで細胞外へと分泌され、血液などの体液中を循環し、組織間-細胞間を行き交うサイトカインのような新たな細胞間相互作用を持つことが報告された。miRNA はこれまで癌などの疾患関連性が指摘されており、当研究グループでも関節リウマチ、変形性関節症、脊髄損傷に miRNA が関与すること、動物モデルへの miRNA の局所投与による治療効果および再生促進効果について報告している。大腿骨頭壊死症において、我々は大腿骨頭の壊死骨における血管形成に関連した miR-210 が壊死部周辺に発現していることについて報告しており、これらの miRNA を用いることにより壊死骨の修復効果が促進されれば、従来の治療法に変わる、より効果的な低侵襲治療法の確立に繋がる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

当施設では大腿骨頭壊死症の患者に対し自家骨髄単核球移植を行い良好な圧潰予防効果を得てきたが、未だ長期の荷重制限を要し、また広範囲壊死例でその効果は不安定である。骨壊死組織や骨折遷延治癒部など、骨形成能が低下している部位に対し移植する細胞の骨修復能を向上させるために、miRNA を細胞に導入することにより骨形成の質が高められ、また効果的な miRNA を分泌するキャリアとして周辺組織の再生環境を整える効果があると仮説を立てた。以下に本研究の目的を示す。

(1) 大腿骨頭壊死症患者の骨髄において

miRNA の網羅的解析を行い、非大腿骨頭壊死症患者(変形性股関節症患者)と比較して特異的に発現している miRNA の同定を行うことにより、細胞に導入させる miRNA を選定する。(2)miRNA 導入骨髄細胞による骨修復の促進効果 本研究は miRNA 導入骨髄単核球の移植治療により、骨壊死・骨欠損に対する骨の再生・修復の効果的な治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1)ステロイド性骨壊死患者の骨髄由来 miRNAの網羅的発現解析

ステロイド性大腿骨頭壊死患者、また非大腿骨頭壊死症患者(変形性股関節症)から採取した骨髄よりRNAを精製し、マイクロアレイ法を用いたmiRNAの網羅的発現解析を行い、ステロイド関連大腿骨頭壊死症に関係のあるmiRNAのスクリーニングを行う。次にreal time PCR法を用いて候補として挙げられたmiRNAの定量化を行い、ステロイド関連骨壊死症と関連の強いmiRNAの同定を行う。(2)ラット骨癒合遷延部への miRNA 導入骨髄細胞による修復促進効果

ラット大腿骨の骨癒合遷延モデルを用いて、miRNA 導入骨髄細胞の局所投与を行う。骨修復、血管形成につき組織学的、分子生物学的、免疫組織化学的評価を行う。

4. 研究成果

(1)ステロイド関連骨壊死患者および非大腿骨頭壊死症患者(変形性股関節症)から採取した骨髄より miRNA を精製し、網羅的発現解析により大腿骨頭壊死症において高発現している miRNA として、miR-31、miR-34a、miR-146、miR-210、miR-218 が同定された。(図1)

【図1】骨分化誘導培地に特異的 miRNA を添加した骨髄間葉系細胞(MSC)の単層培養



a:対照



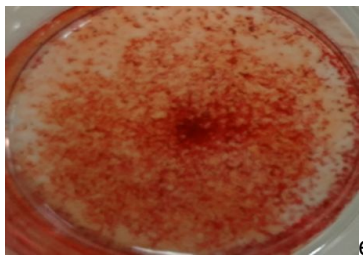
b:miRNA-31



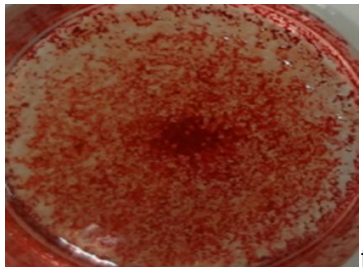
c:miR-46a



d:miR-146

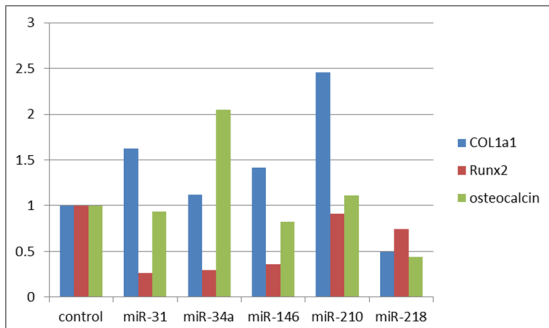


e:miR-210



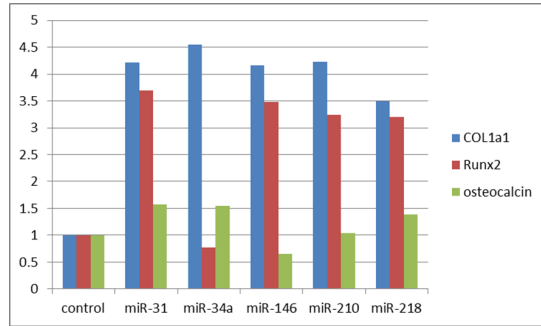
f:miR-218

(2)今回同定された miRNA の骨形成能を評価するために、各 miRNA を添加した骨分化誘導培地を用いて骨髄間葉系細胞 (MSC) を培養し、培養後 6 日および 11 日における骨形成マーカーの発現を評価した。いずれの miRNA も collagen type 1A1 の高発現が確認され、miR-31, miR-146, miR-210, miR-218 では Runx 2 の高発現も確認されたが、osteocalcin の発現にはばらつきを認めた。

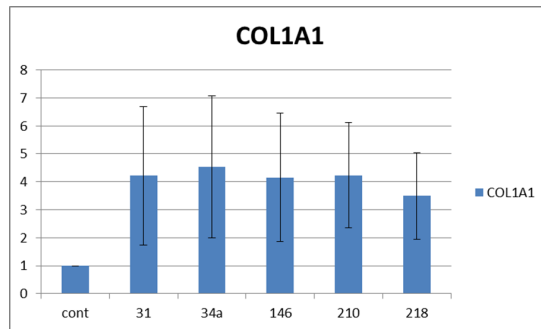


【図 2】各 miRNA を添加した MSC 培養におけ

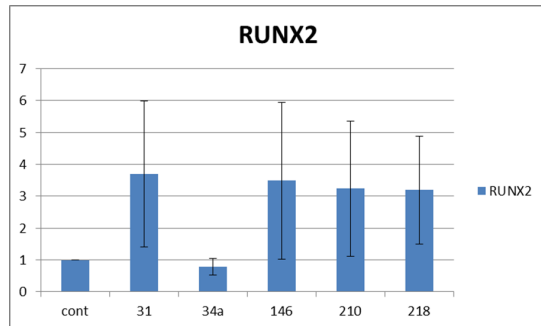
る骨形成マーカーの発現 (day 6)



【図 3】各 miRNA を添加した MSC 培養における骨形成マーカーの発現 (day 11)



【図 4】各 miRNA を添加した MSC 培養における COL 1A1 の発現 (day 11)



【図 5】各 miRNA を添加した MSC 培養における RUNX 2 の発現 (day 11)

また in vivo での骨形成評価のために、各 miRNA をラット偽関節モデルの偽関節部に注入し、micro CT を用いた X 線学的評価により、いずれの miRNA とも骨形成能を促進させることが示唆された。適切な miRNA の導入により移植細胞自身および分泌する miRNA などの因子も加わり、さらなる骨修復の促進効果が得られる可能性が示唆された。

本研究期間中に、基礎的なデータとして目的合成 miRNA の細胞への過剰導入が細胞および培養上清中における miRNA 量を導入濃度依存的に増加させることを明らかにした。さらに、遊走能を抑制することが知られている miRNA を細胞より分泌させた培養上清は他種細胞への添加により容易に細胞に取り込まれ、遊走能を制御できることを示した。また、骨髄間葉系細胞の移植や培養上清中のエクソソームの投与が骨修復を促進させることを明らかにし、そのエクソソーム中の miRNA

プロファイルやサイトカインなどを解析した。

miRNA に関して当研究グループでも関節リウマチ、変形性関節症、脊髄損傷に miRNA が関与すること、動物モデルへの miRNA の局所投与による治療効果および再生促進効果について報告してきた。今回同定された骨壊死症例に特異的な miRNA を用いることにより、壊死骨修復の効率が向上されれば、より効果的かつ低侵襲な治療法の確立に繋がり得る。また、関節部に発生する骨壊死病変に対して関節内より治療を行う新たなアプローチ法を模索することにより、臨床応用可能な低侵襲治療法の開発に繋がるものと考ええる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

坂英樹、庄司剛士、山崎琢磨、三藤建志、澤幹也、大田悠貴、安達伸生：特発性大腿骨頭壊死症における特異的 microRNA の骨分化促進効果．第 91 回日本整形外科学会学術総会，2018.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 琢磨 (YAMASAKI, Takuma)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・寄附講座准教授

研究者番号：5 0 4 4 4 6 8 3

(2)研究分担者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)

広島大学・病院・講師

研究者番号：1 0 3 9 2 4 9 0

庄司 剛士 (SHOJI, Takeshi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・寄附講座助教

研究者番号：5 0 7 3 6 5 6 9