

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11034

研究課題名(和文)変形性膝関節症に対するmiR-218関節内投与における軟骨細胞への機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of miR-218 intra-articular administration to chondrocytes for osteoarthritis of the knee

研究代表者

大幸 英至 (OSAKA, Eiji)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50468740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA (miRNA)が変形性関節症(OA)の発症・進行に関与し診断や治療標的として着目されている。その中で、我々はmiR-218に着目した。OA患者由来軟骨細胞ではmiR-218の発現は正常軟骨細胞と比べ有意に上昇していた。また軟骨細胞株においてmiR-218の過剰発現ならびに発現抑制させることでRUNX2の発現を調節することを明らかにした。さらに軟骨細胞にLPS刺激するとmiR-218とRUNX2は濃度依存性に発現し、miR-218を抑制するとRUNX2は低下した。これらよりOAにおいてmiR-218を標的とすることでOAの進行、予防並びに改善の可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OAのmiR-218の調節によりRUNX2発現を制御しOAの進行、予防並びに改善の可能性があることが示唆された。しかしRUNX2はmiR-218の直接的な標的遺伝子であると報告されているが、骨肉腫ではmiR-218過剰発現でRUNX2を発現抑制したのに対し本研究ではmiR-218過剰発現でRUNX2が過剰発現し、逆に抑制でRUNX2発現は抑制した。そのためmiR-218はRUNX2の直接的な標的遺伝子でない可能性もしくは骨肉腫とOAにおいては作用機序が異なる要素が関与している可能性がある。miR-218/RUNX2 axisには疾患特異的に複雑に介在するメカニズムがあるのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：The expression of microRNAs (miRNAs) has been reported to be involved in the development and progression of osteoarthritis (OA) and has attracted much attention as a diagnostic marker and therapeutic target. miR-218 was shown to be significantly up-regulated in chondrocytes derived from OA patients compared to normal chondrocytes. We had also shown that overexpression or suppression of miR-218 regulated the expression of RUNX2 in normal chondrocytes. Furthermore, LPS-stimulated induction of normal chondrocytes resulted in concentration-dependent expression of miR-218 and RUNX2, while inhibition of miR-218 reduced RUNX2. These results suggest that targeting miR-218 in OA has the potential to prevent and improve OA progression.

研究分野：整形外科

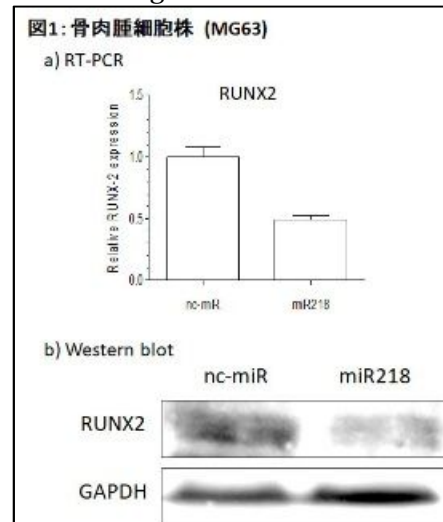
キーワード：変形性関節症 miRNA

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症 (osteoarthritis of the knee: 以下 OA) とは関節軟骨の進行性的変性を特徴とし、同化作用と異化作用との間における軟骨の恒常性維持が破綻した結果、異化作用が同化作用より優位になり軟骨を変性させる。OA は高齢者における 3 番目の健康問題で、日本における OA 患者は 2540 万人と推定されている。1990-2010 年までの罹患率は変化ないが、近年、肥満の増加、ベビーブームの高齢化などにより 2020 年までに倍になるとアメリカ疾病予防管理センターが推測している。日本は世界に先駆けて超高齢社会に突入し介護や寝たきりなどが問題となっている。寝たきりの原因として脳卒中が全体の 4 割を超えて圧倒的に多いが、実は約 2 割は運動器の障害が原因であるとされている。その中でも OA の占める割合は高く予防や改善の観点からでもその治療の重要度は増してきている。

OA に対する治療は非ステロイド性消炎鎮痛薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs : NSAIDs) や非麻薬性鎮痛薬による症候改善薬や疾患修飾性 OA 薬 (disease-modifying osteoarthritis drug: DMOAD) があるが OA の発症や進行を抑制できる DMOAD は現在のところないのが現状である。近年、microRNA (miRNA) が OA の発症・進行に関与していると報告が散見されるようになった。miRNA は 19-24 塩基の small non-coding RNA で、標的遺伝子の mRNA の 3' -UTR に結合することにより遺伝子発現を調節する。様々な疾患においてその発現状態の変異が報告されており、診断マーカーや治療標的として非常に注目されている。OA においても、軟骨変性・炎症の程度により特徴的な発現パターンが観察され、診断や予後因子、さらには新規治療薬として研究が開始されている<sup>1</sup>。

miRNA の中で、我々は OA に対する治療効果が期待できる分子として miR-218 に着目した。miR-218 は数多くの標的遺伝子を制御することが報告されて<sup>2,3</sup>、近年 OA においても注目されてきている<sup>4</sup>。miR-218 は運動ニューロンにおいて発現していることが知られて、我々の解析では骨肉腫細胞株においてその発現が低下していることを確認している。さらに、我々は miR-218 の標的遺伝子には runtrelated transcription factor (RUNX)、survivin、MMP-2・9 等があり、OA との関連が予想される遺伝子が複数含まれることを確認した。図 1 に示す通り、骨肉腫細胞株 MG63 に miR-218 を過剰発現させると RUNX2 が抑制された。



RUNX ファミリーは、塩基配列特異的な核内転写制御因子であり、ヒトでは RUNX1、RUNX2 および RUNX3 から構成される。RUNX ファミリーは個体の発生や細胞のがん化に深く関与することが報告されている。RUNX1 は血液腫瘍における染色体の切断点に座位する遺伝子として発見され、血液幹細胞の産生および血球系の分化に重要な役割を担うとともに、血液腫瘍におけるがん抑制遺伝子である側面をも合わせ持つ。また、RUNX3 は胃がんでは、がん抑制遺伝子として報告されている。さらに、RUNX2 は間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化を制御する master regulator として機能し、その発現レベルは骨形成を促進するサイトカインである BMP によって調節されている。また、軟骨細胞の後期分化に必須である。RUNX2 欠損させると間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化できず骨が形成されない。逆に RUNX2 を過剰発現させると軟骨細胞の成熟が促進され軟骨が骨に置換する。ゆえに RUNX2 には骨形成ならびに軟骨再生の 2 つの作用をもつ。軟骨変性が進行するに従い RUNX2 の発現は上昇する。それに伴い軟骨基質分解酵素である MMP-13 の発現も上昇すると報告されている。さらに RUNX2 は軟骨特異的遺伝子である SOX9、軟骨基質分解酵素である ADAMTS-5、血管新生に関与する VEGF など様々な因子に関与する。またヒト軟骨細胞では RUNX2 発現量は上昇し、膝関節の不安定化により誘導される外傷後 OA の進行に寄与すると報告されている<sup>5</sup>。したがって RUNX2 の発現を制御できれば OA もまた制御できるものと考えた。

miRNA を標的とする新規治療法の臨床応用には、より効率的にかつ安全に標的となる遺伝子に作用する必要がある、そのため投与方法として特に Drug delivery system が問題になってくる。アテロコラーゲンはヌクレアーゼに抵抗性を示し効率的に細胞に入ることが可能で、それを用いた Drug delivery system では静脈内投与さらには関節内投与が可能であったと報告されている。

以上の結果に基づき、我々は miR-218 を治療標的の候補とすることを考えた。miRNA から数十から数百の標的遺伝子を制御しており、従って一つの miRNA を治療標的とすることで複数の下流遺伝子を同時に制御することが可能となり、広範囲でかつ効率的な治療効果が得られると考える。そこで本研究では、miR-218 が OA の標的として有効であるかどうか検討することを計画した。

2. 研究の目的

OA は軟骨変性により高齢者の生活の質を低下させ、健康寿命を脅かす代表的な疾患である。高齢化社会を迎えた現在、その罹患率は高齢化に伴い今後さらなる増加が見込まれている。予防や発症・進行の抑制が重要であるが、発症病態は複雑なため根治的な治療法は開発されていない。近年、OA において miRNA が重要な役割を果たすことがわかってきた。miRNA は一つで複数の遺伝子発現を同時に標的とするため、破綻した生体ネットワーク全体を正常化することが期待できる。そこで本研究では OA の進行、予防並びに改善のために miR-218 を投与し RUNX2 を制御することで OA における作用機序を明らかにすることで臨床応用につなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) 正常軟骨細胞株  
正常骨芽細胞株は C28/I2 を使用した。培地には Dulbecco's modified eagle's Medium (DMEM) High glucose (Sigma-Aldrich, Germany) を用い、10% ウシ胎児血清 (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) および 100IU/ml Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含有した。インキュベーターにて 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。
- (2) In vitro での OA モデルの作成  
Lipopolysaccharide (LPS) は、OA の病因と関連した極めて重要な pro-inflammatory factor であると考えられている<sup>6</sup>。LPS での刺激は軟骨細胞の炎症性傷害を *in vitro* で誘発することができる<sup>6</sup>と報告されている。したがって、LPS による軟骨細胞の炎症傷害を抑制する新規な標的薬を開発することは、OA の改善に役立つ可能性がある<sup>7</sup>。6-well に 5 × 10<sup>5</sup> cells/well 細胞をまき 24 時間後 PBS にて洗浄後、LPS を各種濃度添加 (1 μg/ml、5 μg/ml、10 μg/ml) する。5 時間後に Medium を交換する。90% Confluence になったら各種 miRNA を遺伝子導入する。
- (3) 臨床検体  
変形性関節症群 (OA 群) のサンプルは、膝関節の人工関節全置換時に、正常軟骨 (正常群) のサンプルは大腿骨頸部骨折にて人工骨頭置換術時に入手した。OA 群は全例 Kellgren-Laurence 分類 Grade V の 16 例で男性 4 例、女性 12 例、61-89 歳 (平均 77.3 歳)、正常軟骨は 6 例で男性 2 例、女性 4 例 60-88 歳 (平均 73 歳) を用いた。OA 群では関節軟骨の菲薄化や欠損があることを、正常群では関節軟骨に損傷がないことを確認した上で用いる。関節軟骨の深部までメスを用いて採取し、速やかに RNA later に漬けて 4 °C で 24 時間保存後、使用するまで -80 °C に保存する。
- (4) miRNA の遺伝子導入  
Ambion (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) より設計・購入した miR-218-5p mimic (miR-218 mimic)、miR-218-5p inhibitor (miR-218 inhibitor) と negative control miRNA (Nc-miR)、positive control miRNA (Pc-miR) をそれぞれ最終濃度 50nM に調整し使用した。導入法は Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて推奨プロトコールに従い、reverse transfection 法で行った。miRNA 導入 48 時間後に各細胞より total RNA、蛋白を抽出し、quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) および western blot assay (western blot) で解析した。
- (5) RNA 抽出と cDNA 合成  
miRNA 導入 48 時間後、各細胞より total RNA を抽出した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて各細胞を推奨プロトコールに従い total RNA の抽出を行い、Prime Script RT Master Mix (Takara Bio Inc, Shigma, Japan) を用いて、逆転写反応を行い最終濃度 500ng/ul の complementary DNA (cDNA) を作成した。
- (6) mRNA レベルの遺伝子発現解析  
miR-218 の発現量の解析を行うために、RUN44 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を内因性コントロールとして、total RNA を鋳型に miRNA 特異的なプライマーを用い cDNA を作成した。反応は Takara Prime Script (Takara Bio Inc, Kyoto, Japan) を用いて推奨プロトコールに従い行った。qRT-PCR による発現量解析は、TaqMan Probe (Takara Bio Inc, Kyoto, Japan) を用いて標準プロトコールに従い行った。合成した cDNA を用いて同様に qRT-PCR を行い、RUNX2 発現量を解析した。反応はすべて SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc, Kyoto, Japan) を用いて標準プロトコールに従い行った。2<sup>-ΔΔCt</sup> 法を用いて PCR 反応は GAPDH を内因性コントロールとして発現レベルを補正した。
- (7) 蛋白抽出と濃縮  
miRNA 導入 48 時間後、各細胞より蛋白抽出を行った。Pierce RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) および protease inhibitor (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) を用いて細胞を溶解した。超音波処理した後、4 °C、12,000rpm の条件で 10 分間遠心後、上清を回収し、蛋白抽出液を採取した。蛋白抽出液は Amicon Ultra (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を使用し、濃縮および精製を行った。
- (8) Western blot assay (Western blot)  
濃縮および精製した蛋白抽出液の蛋白濃度は BIO-RAD DC kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて定量し、20μg/lane となるように調整した。Precast 5-11% Bullet PAGE One Precast Gel

(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) の各レーンに添加し、Running Buffer Solution for SDS-PAGE (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を running buffer として 400V, 10 分で電気泳動を行った。Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane に対して iBlot 2 ドライブロットティングシステム (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いてプロトコールに従い転写した。その後 iBind Western system (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いてプロトコールに従い抗体反応させた。各抗体の希釈濃度を以下に示す。ラビット抗 RUNX2 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 1:1000、内因性コントロールとして抗 GAPDH ラビットポリクローナル抗体 (Abcam, Bristol, England) を 1:1000 で iBind™ Solution を用いて希釈した。2 次抗体は各々 horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ラビット IgG 抗体 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を 1:200 で iBind™ Solution を用いて希釈し、室温で 2.5 時間反応させ、Chemi-Lumi One Ultra (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) で化学発光させたのち Bioimage Analyser LAS-4000 (Fujifilm, Osaka, Japan) で観察し、撮影を行った。

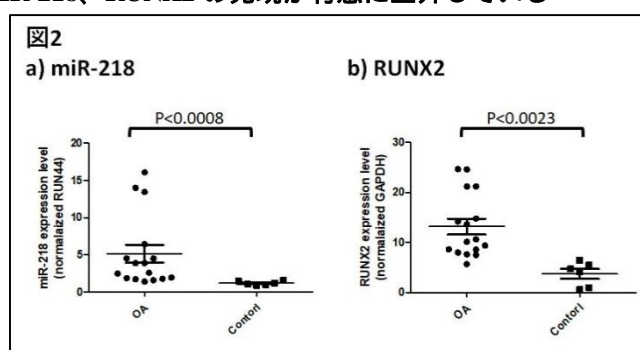
(9) 統計学的解析

統計学的分析は GraphPad Prism5 software を使用し、結果は平均 ± 標準偏差にて表記した。解析における平均の差を Student's t 検定を用い、 $p < 0.05$  を統計学的有意差ありと定義した。

4. 研究成果

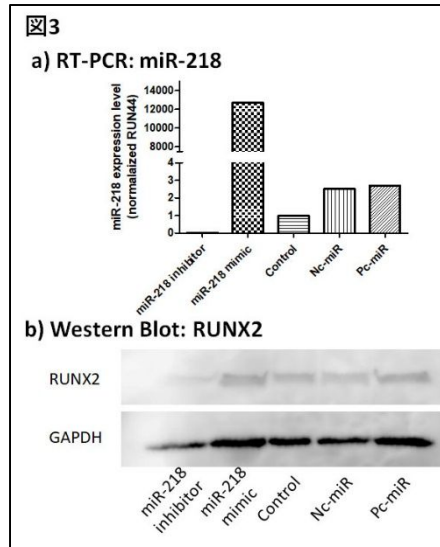
(1) OA 患者では正常軟骨組織と比べ miR-218、RUNX2 の発現が有意に上昇している

OA における miR-218、RUNX2 の機能解析するために、まず OA 患者ならびに正常軟骨組織にて miR-218、RUNX2 の発現量を qRT-PCR にて評価した。OA 患者は正常軟骨組織と比べ、miR-218 発現量は有意に上昇していた ( $p < 0.0008$ )、(図 2a) また同様に OA 患者は正常軟骨組織と比べ、RUNX2 発現量は有意に上昇していた ( $p < 0.0023$ )、(図 2b)



(2) 正常軟骨細胞株では miR-218 が RUNX2 を制御している

OA における miR-218、RUNX2 の機能解析するために、正常軟骨細胞株 C28/I2 にて miR-218、RUNX2 の発現量を qRT-PCR にて評価した。まず C28/I2 に miR-218 inhibitor、miR-218 mimic、Positive-miRNA、Negative-miRNA を遺伝子導入し qRT-PCR によって、miR-218 を過剰発現、発現抑制したことを確認した。(図 3a) さらに RUNX2 も同様に過剰発現、発現抑制したことを確認した。(図 3b)



(3) *In vitro* OA モデルでは軟骨細胞の炎症障害を与えるほど miR-218 と RUNX2 の発現量は上昇した

LPS は、OA の病因と関連した極めて重要な pro-inflammatory factor で、その刺激は軟骨細胞の炎症性傷害を *in vitro* で OA を再現できると考えられている。したがって、LPS による軟骨細胞の炎症傷害を抑制する新規な標的薬を開発することは、OA の改善に役立つ可能性がある。そのため LPS を各種濃度で刺激した。濃度依存的に miR-218 の発現は上昇した。(図 4a) また同様に RUNX2 の発現も上昇した。(図 4b)

(4) LPS 刺激下による miR-218 の発現を抑制すると RUNX2 の発現は抑制した

LPS 刺激下による miR-218 の効果を検討するため LPS の各種濃度で miR-218 を投与し効果を検討した。LPS 刺激下で miR-218 の発現を抑制すると LPS が低濃度 (0-1  $\mu$ g/ml) では発現は有意

に抑制されたが高濃度 (5-10  $\mu\text{g/ml}$ ) では発現抑制できなかった。(5 図 a) しかし RUNX2 の発現は control と比べて抑制した。(5 図 b)

これらの結果より OA において miR-218 を標的とすることで RUNX2 の発現を制御し OA の進行、予防並びに改善の可能性があると

が示唆された。しかし報告によると RUNX2 は miR-218 の直接的な標的遺伝子であると考えられている<sup>3</sup>が、骨肉腫細胞株に miR-218 を過剰発現させると RUNX2 は発現抑制したのに対し OA では miR-218 を過剰発現させる RUNX2 が過剰発現し、逆に抑制すると RUNX2 の発現は抑制していた。そのため miR-218 は RUNX2 に対して直接的な標的遺伝子でない可能性もしくは骨肉腫と OA においては作用機序が異なる他の要素が関与している可能性があると考えられる。それ故に miR-218/RUNX2 axis には複雑に介在するメカニズムがあると考えられる。今後 miR-218 と RUNX2 のさらなる詳細な作用機序を解明し学会発表ならびに論文作成をしていきたい。

#### <引用文献>

1. Vicente R, Noel D, Pers YM, Apparailly F, Jorgensen C. Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016, **12**: 211-220.
2. Lu YF, Zhang L, Waye MM, Fu WM, Zhang JF. MiR-218 mediates tumorigenesis and metastasis: Perspectives and implications. *Exp Cell Res.* 2015, **334**: 173-182.
3. Yao R, Yao X, Liu R, Peng J, Tian T. Glucose-induced microRNA-218 suppresses the proliferation and promotes the apoptosis of human retinal pigment epithelium cells by targeting RUNX2. *Biosci Rep.* 2019, **39**.
4. Lu J, Ji ML, Zhang XJ, et al. MicroRNA-218-5p as a Potential Target for the Treatment of Human Osteoarthritis. *Mol Ther.* 2017, **25**: 2676-2688.
5. Zhao W, Zhang S, Wang B, Huang J, Lu WW, Chen D. Runx2 and microRNA regulation in bone and cartilage diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2016, **1383**: 80-87.
6. Huang ZY, Stabler T, Pei FX, Kraus VB. Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016, **24**: 1769-1775.
7. Zhao C, Wang Y, Jin H, Yu T. Knockdown of microRNA-203 alleviates LPS-induced injury by targeting MCL-1 in C28/I2 chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2017, **359**: 171-178.

図4

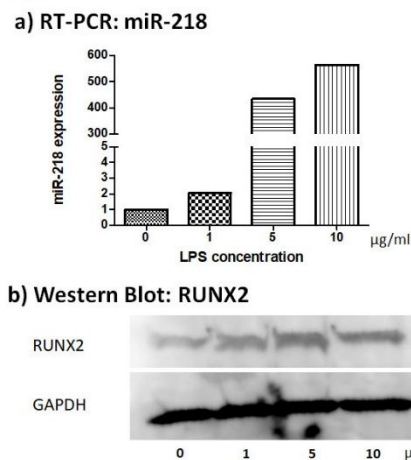
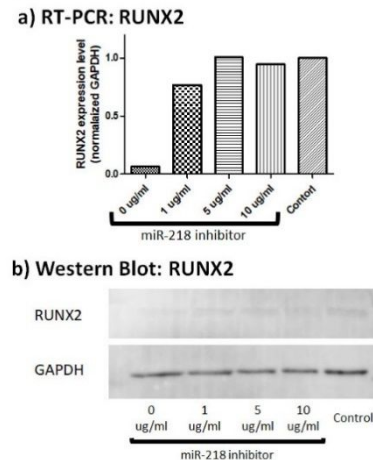


図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	穂坂 邦大  (HOSAKA Kunihiro)  (70570737)	日本大学・医学部・兼任講師    (32665)	
研究分担者	徳橋 泰明  (TOKUHASHI Yasuaki)  (80188739)	日本大学・医学部・教授    (32665)	
研究分担者	龍 啓之助  (RYU Keinosuke)  (80837493)	日本大学・医学部・准教授    (32665)	