

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16693

研究課題名(和文) microRNAに着目した肥満による変形性膝関節症の発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidate the pathogenesis of knee osteoarthritis development due to obesity by focusing on microRNA

研究代表者

眞田 洋平 (SANADA, Yohei)

広島大学・病院(医)・研究員

研究者番号：50796117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、軟骨・肝臓において高発現し、かつ高分泌しているmiR-26aの細胞内、および細胞外の機能に着目して肥満による変形性膝関節症(OA)発症機構の解明を目指した。miR-26aは、軟骨組織で高発現し、OA進行とともに発現低下した。miR-26a KOマウスに高脂肪食を負荷し、肥満を誘導したが、miR-26a KOによる代謝異常は認められず、骨棘形成や軟骨変性などのOA様病変は観察されなかった。軟骨特異的miR-26a Tgマウスでは18カ月齢の加齢条件下で、一部軟骨変性が抑制されたことから、miR-26aは全身の代謝を制御するのではなく、軟骨恒常性に直接関わる因子で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

変形性膝関節症(OA)の治療法は確立されておらず、対処療法や外科手術を選択せざるを得ないのが現状である。加齢に加え肥満は、OAの主要なリスク要因であるが分子機構や生物学的な情報が不足している。本研究で、miR-26aが従来の報告と異なり代謝調節に必須ではないこと、さらに肥満がOA発症のイニシエーターではない可能性が示された一方で、miR-26aは軟骨恒常性に直接関わる因子であることが示唆された。本研究は軟骨組織におけるmiR-26aの標的因子の同定を試みており、miR-26aの標的因子を介する遺伝子制御ネットワークの解明は、新たな治療薬候補の発見につながる重要な基盤情報となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the mechanism of the knee osteoarthritis (OA) caused by obesity, focusing on the intracellular and extracellular functions of miR-26a, which is highly expressed in cartilage and liver. The expression of miR-26a was highly expressed in cartilage tissue and decreased with the progress of OA. By inducing obesity, miR-26a KO mice exhibited the same obesity phenotype as wild-type mice, and no metabolic abnormality by miR-26 KO was observed. Furthermore, OA-like lesions such as osteophyte formation and cartilage degeneration were not observed in both mice. On the other hand, in cartilage-specific miR-26a Tg mice, cartilage degeneration was slightly suppressed under the aging condition of 18 months of age. These results suggest that miR-26a is not factor involved in systemic metabolic regulation but a directly involved in cartilage homeostasis.

研究分野：整形外科学、運動器分子生物学、栄養科学

キーワード：Obesity microRNA Osteoarthritis Ageing

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現代において代表的な関節疾患である変形性膝関節症(Osteoarthritis: OA)は、加齢に伴う関節軟骨の変性が基盤病態とされる一方で、肥満症患者ではOAを併発するリスクが高まることが報告されるなど、OA患者の増加の背景に肥満症との関連が指摘されている。肥満患者と関節症の発症に関して、肥満患者は膝関節のみならず、非荷重関節である手関節においても関節症の発症リスクが高いといった興味深い報告がなされた(*Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014)。さらには、高脂肪食を負荷し肥満を誘導したマウスの後肢に対して、尾懸垂モデルによる荷重免除試験を実施した結果、体重の増加に伴う膝関節への過負荷とは独立した肥満による生体内変化を介したOA発症機構の存在が示唆された(*PLOS one.* 2016)。このように肥満は、インスリン抵抗性などの代謝疾患の基盤病態としてのみならず、QOL(Quality Of Life)の低下につながるロコモティブシンドローム(運動器疾患)の発症とも密接に関わっていると考えられるが、病態発症に関わる分子機構についてはほとんど明らかにされていない。

microRNA(miR)は20数塩基程度のnon-coding RNAであり、複数のmRNAを標的として疾患に関わる分子全体の遺伝子発現を制御する。申請者は、運動器組織でのmiRの機能解明を進め、軟骨分化に伴いその発現量が増加するmiR-140が軟骨組織の形成や維持に必須の因子であることを報告した(Miyaki et al. *Gene Dev.* 2010)。miRは細胞内のみならず、Exosomeに代表される細胞外小胞(EVs)に内包され、分泌型miRとして組織間・細胞間コミュニケーション因子として機能することが近年注目されている。申請者は軟骨組織、および軟骨細胞から分泌されるExosome中に分泌型として豊富に含まれる新規の軟骨関連miRNAを複数同定した。さらに同定した軟骨関連miRNAの中で、肝臓における肝実質細胞においても高発現し、インスリンシグナルを介した糖・脂質代謝を制御する代謝調節因子として報告されたmiR-26aを抽出した(*J Clin Invest.* 2015)。すなわちmiR-26aは、軟骨組織のみならず糖・脂質代謝制御にも関わっていることが想定され、本研究では、軟骨・肝臓におけるmiR-26a、およびExosome中miR-26aの生理機能解析を行うことで、細胞内・外miRNAを介した代謝疾患とOA発症に関わる新たなメカニズムの解明が可能と考えた。

## 2. 研究の目的

miR-26a ノックアウトマウス、および組織特異的miR-26a 過剰発現マウスを作製し、miR-26aの機能に着目して肥満による代謝障害がOA発症に及ぼす影響の解明

## 3. 研究の方法

### (1) miR-26aの発現解析、および各細胞分化への影響の解明

野生型マウスの各組織におけるmiR-26a、およびmiR-26bの遺伝子発現レベルを解析し、組織間におけるmiRNAの発現量を比較した。間葉系幹細胞から軟骨細胞に分化誘導した際のmiR-26a、および宿主遺伝子の発現解析を進め、miR-26aの軟骨細胞分化における発現挙動を明らかにし、正常とOA軟骨組織でのmiR-26aの発現を解析した。

### (2) miR-26a KO、および軟骨特異的miR-26a Tgマウスの発生に及ぼす影響の解析

異なる染色体上にコードされているPri-miR-26a-1とPri-miR-26a-2から同一配列を持つ成熟型miR-26aが生成される。そこで本研究ではCRISPR-Cas9 systemを用いてPri-miR-26a-1とPri-miR-26a-2をノックアウトしたマウスをそれぞれ作出し、交配によってmiR-26a1/2 DKO(miR-26a KO)マウスを作出した。Cre/loxPシステムを用いたCAGプロモーターの制御下にmiR-26aが発現す

る Tg マウスは、Wendong Huang 博士 (City of Hope National Medical Center) らが開発したものであるが (*J.Cli.Inve* 2015) 共同研究者として Tg マウスをご供与頂き、Typ2 collagen-Cre マウスを用いて軟骨特異的 26a Tg マウスを樹立した。生後 0 日での  $\mu$ CT 解析、ならびに骨格標本を作製して発生における miR-26a の機能を評価した。

(3) miR-26a KO、および軟骨特異的 miR-26a Tg マウスの各刺激下での軟骨変性の評価

#### 肥満誘導モデル

8 週齢雄 miR-26a KO、および野生型マウスに高脂肪食 (HFD60: オリエンタル酵母)、およびコントロール食として AIN-93G を 16 週間給餌し、肥満を誘導した。22 週齢時点でインスリン抵抗性試験、23 週齢時点で耐糖能試験を実施し、24 週齢において血清、および組織を回収し生化学解析を実施した。さらに、膝関節組織切片を作製し、Safranin-O 染色や Type 2 コラーゲン、Prg4 抗体を用いて免疫染色を実施し、軟骨変性や骨棘形成など、OA 病変の進行を評価した。

#### 外科的 OA 誘導モデル

12 週齢雄 miR-26a KO、野生型、および軟骨特異的 miR-26a Tg マウスに内側半月板、および内側側副靭帯切離による OA 誘導モデルを作製した。処置 8 週間後に膝関節組織をサンプリングし、パラフィン切片を作製して Safranin-O 染色などによる軟骨下骨の骨硬化、ならびに OARSI スコアを用いて軟骨変性の評価を行い、OA 進行に関わる miR-26a の機能を検討した。

#### 加齢モデル (申請者)

加齢による軟骨変性に及ぼす miR-26a の影響を評価するために、miR-26a KO、野生型、および軟骨特異的 miR-26a Tg マウス 12 ヶ月齢、および 18 カ月齢における膝関節組織をサンプリングし、Safranin-O 染色などによる関節組織像を観察した。さらに軟骨特異的に miR-26a をレスキューした miR-26a KO マウスの加齢や肥満モデルを作製し、軟骨組織 miR-26a の全身への影響と OA 発症に及ぼす影響を解析した。

(4) 軟骨細胞における miR-26a の標的因子の同定と機能解析

miR-26 KO、および Tg マウスの初代培養軟骨細胞に IL-1 $\beta$  刺激 (1 ng/ml) を行い、OA 様環境を誘導して軟骨基質グリコサミノグリカン (GAG) 量、および OA 関連遺伝子の発現解析を実施した。さらには RNA-seq、およびプロテオミクス解析を行い、TargetsScan などのデータベースを用いたバイオフィオマティクス解析により miR-26a の標的因子の同定を試みた。

## 4. 研究成果

(1) miR-26a-5p は、肺組織や、軟骨組織で高発現し、各組織において miR-26b よりも高発現していた。miR-26a-5p、一次転写物である Pri-miR-26a-1、および Pri-miR-26a-2 の遺伝子発現は軟骨細胞分化に伴って増加した。一方で、OA 患者から採取した軟骨組織では、miR-26a-5p、および Pri-miR-26a-1、Pri-miR-26a-2 の発現は OA 重症度と反比例して低下した。Pri-miR-26a-1、Pri-miR-26a-2 遺伝子は CTDSPL (CTD Small Phosphatase Like)、CTDSP2 遺伝子のイントロン部にそれぞれコードされているが、miR-26a の発現は OA 軟骨組織で低下した一方で、宿主遺伝子の発現は変化しなかった。以上のことから、軟骨組織における miR-26a の発現は、宿主遺伝子の転写機構とは独立していると考えられ、今後、miR-26a の転写調節機構の詳細を明らかにしていくことで、miRNA によって制御される RNA ネットワークの基盤情報が得られることが期待される。

(2) 作製した miR-26a KO マウスでは、全身の組織、および血清 Exosome 中における miR-26a の

発現は消失していた。軟骨特異的 miR-26a Tg マウスでは、軟骨組織においてのみ miR-26a の発現が 3~5 倍増加していた。生後 0 日における  $\mu$ CT 解析、およびアルシアンブルー/アリザリンレッド染色による骨格標本の観察において各遺伝子改変マウスの発生における顕著な異常は認められず、miR-26a は発生には関与しないことが示唆された。

(3) 高脂肪食を 16 週間給餌した野生型、および miR-26a KO マウスはコントロール食群と比較して体脂肪量が増加し、血清中の TG 量、肝障害マーカーである ALT 値が上昇し、耐糖能の悪化、インスリン抵抗性が生じたが、miR-26a KO による糖・脂質代謝の異常は認められなかった。さらに、膝関節組織切片を作製し、Safranin-O 染色や Type 2 コラーゲン、Prg4 抗体を用いて免疫染色を実施したが、従来報告されてきた肥満による OA 誘導モデルの結果と異なり、軟骨変性や骨棘形成など、OA 病変の進行は認められなかった。肥満誘導期間の延長、ならびに肥満誘導に加え、運動刺激や外科的処置を行う新たなモデルを作製し、miR-26a を含む Exosome の投与試験を準備している。興味深いことに、miR-26a KO による通常食下での骨格発生や成長に異常は認められなかったが、高脂肪食を給餌した miR-26a KO マウスは、野生型マウスと比較して低身長となったことから、高エネルギー下で骨成長が遅延している可能性が示された。すなわち miR-26a は、エネルギー環境に応答して軟骨形成や骨成長に関わるシグナルを制御しており、エネルギー状態依存性の生理機能を有していると考えられ、その詳細については現在解析中である。

12 週齢雄 miR-26a KO、野生型、および軟骨特異的 miR-26a Tg マウスに外科的 OA 誘導モデルマウスを作製したが、軟骨下骨の骨硬化、ならびに OARSI スコアを用いた軟骨変性の評価では、各マウスにおいて差は認められなかった。加齢に伴う軟骨変性の評価では、12 ヶ月齢における早期の軟骨変性像は各マウスにおいて観察されなかったが、18 カ月齢マウスでは、野生型マウスと比較して miR-26a Tg マウスにおいて軟骨変性が一部抑制され、OARSI スコアは有意に低値であった。miR-26a KO マウスの 18 カ月齢モデルを増やし、軟骨恒常性における miR-26a の役割について解析を行うとともに、さらに軟骨特異的に miR-26a をレスキューした miR-26a KO マウスの加齢や肥満モデルを作製し、軟骨組織 miR-26a の全身への影響と OA 発症に及ぼす影響を解析している。

(4) IL-1 $\beta$  刺激による OA 様環境下での GAG-LOSS レベルや OA 関連遺伝子の発現レベルは、野生型マウスと比較して KO マウス、Tg マウスで有意な変化は認められなかった。RNA-seq、およびプロテオミクス解析による MultiOmics 解析を行い、miR-26a のターゲット候補として、45 個のタンパク質/遺伝子を見出した。これまでに *in vitro* 試験によって接着分子や炎症シグナルの構成因子など、軟骨細胞での miR-26a の標的因子が報告されていたが、miR-26a KO マウスの軟骨細胞を用いた本研究では標的分子として同定されなかった。これらは、過剰発現系によるアーチファクトであった可能性も考えられ、本研究で見出した候補因子の中で、特に発現変動が大きかった因子の機能解析を実施している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sanada Y, Ikuta Y, Ishikawa M, Nakasa T, M. K. Lotz, Adachi N, Miyaki S.
2. 発表標題 THE ROLE OF MIRNA-26A IN CARTILAGE DEVELOPMENT AND OSTEOARTHRITIS.
3. 学会等名 2020 OARSI Congres (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----