

令和元年6月26日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16712

研究課題名(和文)変形性関節症における滑膜病変と軟骨変性へのエクソソームの関与

研究課題名(英文)Exploration for the mechanism(s) underlying synovial change in OA through the analysis of miRNA expression

研究代表者

田中 信帆(Tanaka, Nobuho)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・政策医療企画部・研究員

研究者番号：60530920

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OAで滑膜病変が生じる機序をmiRNAの解析により明らかにしようとした。OA、RAに罹患した膝関節各32例より滑膜組織を採取し、RNAを抽出してqPCRによる解析を行った。その結果、miR-21とmiR-26aがRA滑膜に比べてOA滑膜で有意に発現レベルが低いことがわかった。OA滑膜においてmiR-21、miR-26aの発現レベルはMMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-14、VEGFR-2の遺伝子発現レベルとそれぞれ有意の負の相関を示したが、RA滑膜ではこれらの相関関係はいずれも認められず、この2つのmiRNAがOAの滑膜病変において一定の役割を果たしている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの高齢者がOAで苦しんでいるにもかかわらず、現在行われているOAの治療はほぼすべてが対症療法でありOAの自然経過を変えうる治療は確立されていない。最近の研究結果からOAについても滑膜病変が疾患の進行に深く関与していることが明らかになってきた。本研究はこのような背景から、OAの滑膜病変の成因についてmiRNAの解析を通じて知見を得ることを試みた。本研究の結果から2種のmiRNAがOAの病態に関与している可能性が示された。この意義については今後さらに検証を行う必要があるものの、今後OAの滑膜病変の成因を明らかにし、それに基づく治療法を開発するうえで有用な知見であることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to elucidate the mechanism underlying the synovial pathology in OA through the analysis of miRNA expression. To this end, synovial tissues were obtained from 32 OA knees and 32 RA knees at prosthetic surgery. RNA was extracted from these tissues, and the expression of miRNA and mRNA was determined by qPCR. The analyses revealed that the expression of miR-21 and miR-26a was significantly reduced in OA synovium compared with RA synovium. Subsequent analysis revealed that the expression levels of these miRNA were inversely correlated with the expression levels of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-14 VEGFR-2 respectively, the genes that could be deeply involved in the pathology of synovium in OA. Since none of these invers correlations were observed in RA, such relationships seemed to be unique to OA synovium. Thus, from the results of this study, miR-21 and miR-26a were considered to be significantly involved in the pathology of OA synovium.

研究分野：関節病学

キーワード：変形性関節症 滑膜 関節リウマチ 関節炎 エクソソーム miRNA

1. 研究開始当初の背景

従来、変形性関節症(以下 OA)における滑膜病変は軟骨変性に伴う二次的なものとされ、その病的な意義は明らかではなかった。しかし近年、多くの疫学研究・臨床研究の結果から OA の滑膜病変が症状の程度、および疾患の進行の両方と密接に関連していることが明らかになってきた(Pelletier JP, et al. Osteoarthritis Cartilage 2008; Roemer FW, et al. Ann Rheum Dis 2011)。OA において滑膜病変は軟骨変性を考える上で重要な手がかりとなると考えられる。しかしながら滑膜病変が強い症例でなぜ軟骨変性が進むのか明らかになっていない。もし OA 関節で滑膜病変が軟骨変性を引き起こすとするれば、滑膜由来の何らかの因子が軟骨細胞に作用してこれらのタンパク分解酵素の発現を誘導している可能性が考えられるが、既知の因子の中にはこのような作用が実際の OA の病態において確認されているものは見当たらない。一方、OA の関節液中には滑膜に由来する MMP-1, 2, 3 などのタンパク分解酵素が相当に高い濃度で存在しており(Ishiguro N, Arthritis Rheum 1999, Yoshihara Y, Ann Rheum Dis 2000) OA 軟骨ではこれらの MMP の活性化に関与するウロキナーゼ(uPA)の発現も亢進していることを考えれば(Aigner T, et al. Arthritis Rheum 2001; Dejica VM, et al. Am J Pathol 2008) 関節液中のタンパク分解酵素が直接的に軟骨の変性・消失を引き起こす可能性も考えられる。この場合、OA 滑膜でなぜ MMP-1, 2, 3 などのタンパク分解酵素が産生されるのかが問題となるが、これについても既知の因子の中で明確にその機序を説明できるものは見当たらない。本研究においてエクソソームに着目するのは以下のような背景による。エクソソームは膜小胞で構成される小胞体であり、細胞から分泌されて目的の細胞へと運ばれ、細胞間や組織へのシグナル伝達の役割を担っていると考えられている(Waldenström A. et al. PLoS. One. 2012; Witwer KW, et al. J Extracell Vesicles 2013)。OA においてエクソソームに含まれる特定の miRNA が軟骨細胞に対して MMP-13 の発現を増加させるとする報告があり(Iliopoulos D, et al. PLoS ONE 2008) さらに IL-1 で刺激された滑膜線維芽細胞由来のエクソソームは OA 軟骨細胞において MMP-13 の発現を増加させることや(Kato T, et al. Arthritis Res Ther. 2014) リウマチ滑膜からの線維芽細胞由来のエクソソームには TNF- α が存在し、TNF- α 感受性のある細胞に対して傷害性をもつことも報告されている(Uttenreuther-Fischer MM, et al. J Immunol. 2006)。これらの事実を考え合わせれば、OA において滑膜細胞が産生するエクソソームが autocrine、paracrine 的に作用して滑膜病変を誘導する可能性や、滑膜において産生されたエクソソームが関節液を介して軟骨細胞に作用して軟骨細胞に種々のタンパク分解酵素の活性を誘導する可能性が考えられる。しかし、OA の病態へのエクソソーム関与の可能性についてはまだ十分に検証されておらず、とくに OA 滑膜由来のエクソソームを他疾患などと比較解析した報告は見当たらない。本研究は以上のような背景に基づいて行われたものであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は OA における滑膜病変の機序、および滑膜病変と軟骨変性を結び付ける機序について、エクソソームに含まれる miRNA の解析を通じて解明の手掛かりを得ることであった。この目的のため本研究では OA と RA を対比し、そこから OA の病態を明らかにする戦略をとった。

3. 研究の方法

【平成 29 年度】研究初年度には OA 及び RA に罹患した膝関節からの滑膜組織の収集を行った。当初の計画では初年度後半には滑膜の組織培養を行って培養上清中のエクソソームに関する

る解析も行う予定であったが、予算面の制約から実際には滑膜組織の解析のみを行った。

(1) 滑膜組織の収集

人工膝関節置換術の際に膝 OA 症例とリウマチ症例より滑膜を採取した。当初の研究計画では剖検例からも対照滑膜を採取する予定であったが、倫理的な側面などから実施が困難であったため、計画を修正し、OA 滑膜と RA 滑膜の 2 群についてのみ検討を行うこととした。採取された滑膜は Lysis buffer に浸けて-80 で保存した。

(2) 滑膜組織からのエクソソームの抽出

採取された OA 滑膜、RA 滑膜組織を PBS 中でホモジナイザーを用いて破碎し、PBS 中に遊離したエクソソームを Exoquick(System Biosciences 社)を用いて回収した。

(3) miRNA と mRNA の抽出

回収されたエクソソームより miRNeasy Mini kit (QIAGEN 社)を用いて miRNA を抽出した。抽出された miRNA は症例数が揃うまで - 80 で保存した。同じ滑膜組織より RNA Mini kit (Thermo Fisher)を用いて mRNA を抽出した。抽出された mRNA は miRNA と同様に - 80 で保存した。

【平成 30 年度】

(1) miRNA の半網羅的・定量的解析

当初の計画ではエクソソームから抽出した RNA の解析は外部業者に受託し、miRNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行う予定であったが、予算的に困難であったため計画を修正し、PCR パネル (miScript miRNA PCR Array, QIAGEN)を用いた半網羅的・定量的解析を行った。

研究代表者の研究室では過去に剖検例からの対照滑膜、OA 滑膜、リウマチ滑膜について cDNA マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを決定している。この結果と上記の解析の結果を用いて遺伝子統合解析を行うことで OA の滑膜病変に関与する miRNA の候補 (候補 miRNA)を見出した。

ターゲット遺伝子解析には以下のツールを用いた。

TargetScan <http://www.targetscan.org>

PicTar <http://pictar.mdc-berlin.de/>

mirDB <http://mirdb.org/miRDB/>

microRNA.org <http://www.microrna.org/microrna/home.do>

DIANA <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/>

(2) OA 滑膜における miRNA と mRNA の発現の関連に関する検討

研究代表者の所属する研究室では今までに過去に剖検例からの対照滑膜と OA 滑膜、RA 滑膜について種々の解析を行い、OA 滑膜において滑膜の病変に関連する遺伝子について一定の知見を積んできている。今回の解析では miRNA と同時に滑膜組織より total RNA も抽出し、それを用いて cDNA を合成、qPCR により OA の滑膜病変への関与が考えられる種々の遺伝子について発現レベルを調べ、それらと上記 (1) の解析で選択された miRNA の発現レベルの関連を調べることによって、どの miRNA が OA の滑膜病変に関与する可能性があるのかの絞り込みを行った。

(3) 上記の解析により見出された miRNA に関する機能的検証

上記の解析により見出された miRNA が実際に OA の軟骨変性に関与する可能性があるかをヒト軟骨組織の器官培養実験を行い、LNA 化したオリゴ RNA を用いて検証することを予定した。しかしこの実験は予備実験において LNA 化オリゴ RNA による遺伝子発現抑制の効率が悪く、研究経費の制約もあり実験を断念せざるを得なかった。

4 . 研究成果

【平成 29 年度】

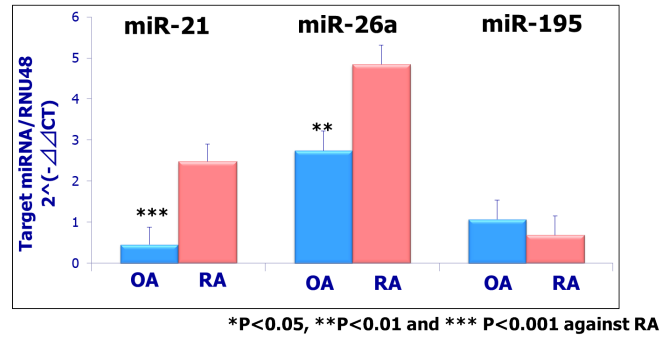
(1) 人工膝関節置換術が行われた OA 膝関節 32 症例 32 関節と RA 膝関節 32 症例 32 関節からそれぞれ滑膜組織を採取した。RA 症例については滑膜組織の病理的所見および血液検査の結果に基づき活動性が高いと思われる症例からの検体を選択して解析に用いた。

(2) 採取した滑膜は直ちに PBS が入った容器に移されて研究室に運ばれ、採取から 1 時間以内に Lysis buffer に浸して-80 に保存された。

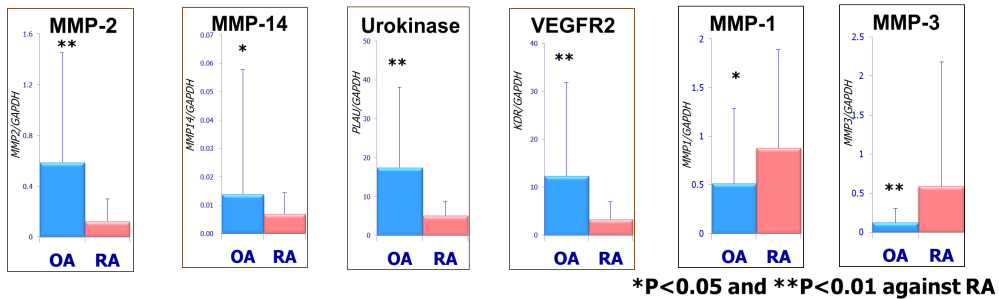
(3) エクソソームの回収及びエクソソームからの miRNA と滑膜組織からの mRNA の抽出は RNase フリーのベンチで行われ、質・純度ともに問題なく行うことができた。

【平成 30 年度】

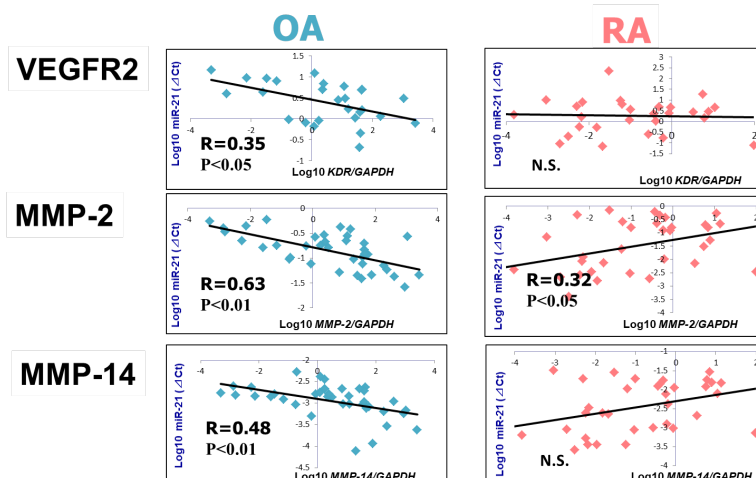
- (1) エクソソームより抽出した miRNA を PCR パネルで解析した結果を以下に示す。OA 滑膜と RA 滑膜の比較から、miR-21 と miR-26a が RA 滑膜に比して OA 滑膜で顕著に発現が低下していることが分かった。また、ターゲット遺伝子解析ツールの情報に照らして miRNA の絞り込みを行った結果、miR-21, miR-26a, miR-195 の 3 つが OA の滑膜病変に関連する可能性のある miRNA として選択された。

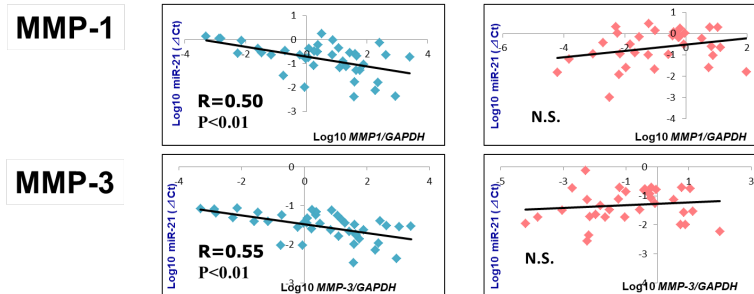


- (2) 研究代表者が所属する研究室では今までの解析結果から OA の滑膜病変に関連していると思われる遺伝子として MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-14、uPA、VEGF-R2 の 6 種の遺伝子に着目している。このことから今回収集した滑膜組織についてもこの 6 つの遺伝子の発現を OA 滑膜と RA 滑膜で比較した。結果は以下に示す通りで、MMP-2、MMP-14、uPA、VEGF-R2 の発現レベルは RA 滑膜に比して OA 滑膜で有意に高かった。一方、MMP-1 および MMP-3 の発現レベルは RA 滑膜に比して OA 滑膜で有意に低かった。この結果は研究室における以前のデータと一致するものであった。

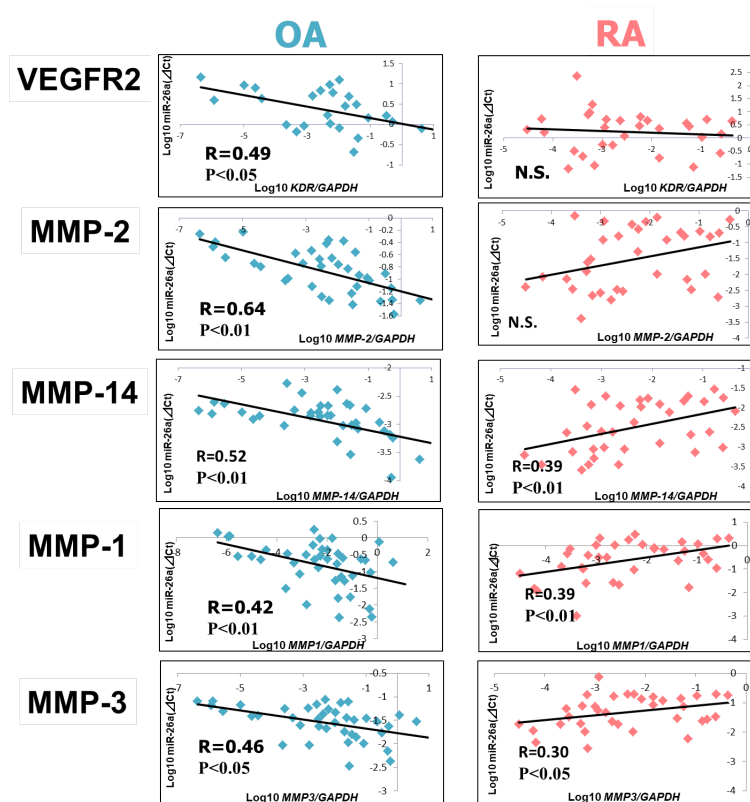


- (3) 先に選択された 3 つの miRNA と上記の 6 つの遺伝子との発現レベルの関連を調べたところ、3 つの miRNA のうち miR-21 が OA 滑膜において MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-14、VEGF-R2 との間に有意の負の相関があること、一方、RA 滑膜ではこれらの相関関係は認められないかむしろ有意の正の相関があることが明らかになった。





次に miR-26a と 6 つの遺伝子の発現の関連を調べたところ、miR-21 と同様に OA 滑膜において miR-26a と MMP-2、MMP-14、VEGF-R2 の間に有意の負の相関がみられ、一方、RA 滑膜ではこれらの相関関係は認められないか逆に有意の正の相関がみられるという結果が得られた。



一方、miR-195 については OA 滑膜、RA 滑膜ともに上記の 6 つの遺伝子のいずれとも有意の相関を示さなかった。今回の結果より、OA 滑膜では miR-21 と miR-26a の 2 つの miRNA が、OA の滑膜病変に関与すると思われる 6 個の遺伝子のうち 5 つと発現レベルが有意の負の相関を示した。これらの関係は OA 滑膜においてのみ認められ RA 滑膜では観察されず、OA 滑膜固有の現象と考えられた。じつは上記の 6 個の遺伝子のうち 4 個 (MMP-2、MMP-14、uPA、VEGF-R2) は血管新生に関係するものであり、残る 2 個 (MMP-1 および MMP-3) は血管新生の結果生じた線維芽細胞様滑膜細胞の活性化に伴って発現すると考えられる遺伝子である。今まで報告されている知見も含めて検討した結果、OA 滑膜では miR-21 と miR-26a の 2 つの miRNA が減少することで血管新生が起こりやすくなっている可能性が考えられた。以上、本研究の結果から OA 滑膜において miR-21 と miR-26a の減少が滑膜病変に関与する可能性が示されたと考えられた。

5 . 主な発表論文等 [雑誌論文](計 2 件)

Tanaka N, Tashiro T, Katsuragawa Y, Sawabe M, Furukawa H, Fukui N. Expression of minor cartilage collagens and small leucine rich proteoglycans may be relatively reduced in osteoarthritic cartilage. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019 May 18;20(1):232. doi: 10.1186/s12891-019-2596-y. 査読あり

Liu Y, Chang JC, Hon CC, Fukui N, Tanaka N, Zhang Z, Lee MTM, Minoda A. Chromatin accessibility landscape of articular knee cartilage reveals aberrant enhancer regulation in osteoarthritis. Sci Rep. 2018 Oct 19;8(1):15499. doi: 10.1038/s41598-018-33779-z. 査読あり

〔学会発表〕(計 16 件)

田中 信帆 他、変形性関節症における滑膜病変の成立機序の検討 - 関節リウマチとの遺伝子発現の比較からわかること -、第 61 回日本リウマチ学会、2017
大橋 暁、田中 信帆 他、CR 型 Guided motion TKA 屈伸時の大腿骨コンポーネントの位置、第 9 回 JOSKAS、2017
田中 信帆 他、コラーゲン線維束の形成障害が変形性関節症の進行の一因かもしれない、第 9 回 JOSKAS、2017
福井 尚志、田中 信帆 他、変形性関節症では angiopietin-2 と VEGF-A が協調的に作用して滑膜に血管新生が誘導される、第 32 回日本整形外科基礎学会、2017
田中 信帆 他、変形性関節症では 型コラーゲンの線維束形成が障害されている可能性がある、第 32 回日本整形外科基礎学会、2017
福井 尚志、田中 信帆 他、関節リウマチとの比較による変形性関節症の滑膜病変の成立機序に関する検討、第 28 回日本リウマチ学会 関東支部学会、2017
田中 信帆 他、変形性関節症と関節リウマチの滑膜組織における miRNA の発現比較、第 28 回日本リウマチ学会 関東支部学会、2017
田中 信帆 他、OA における治療標的としての滑膜組織、第 45 回日本関節病学会、2017
福井 尚志、田中 信帆 他、変形性関節症では angiopietin2 と VEGFA が協調的に作用して滑膜に血管新生が誘導される、第 31 回日本軟骨代謝学会、2018
福井 尚志、田中 信帆 他、変形性関節症における滑膜病変、第 62 回日本リウマチ学会、2018
福井 尚志、田中 信帆 他、変形性関節症では angiopietin2 と VEGFA が協調的に作用して滑膜に血管新生が誘導される、第 10 回 JOSKAS、2018
田中 信帆 他、変形性関節症では変性軟骨から MIF が遊離して滑膜病変に関与する可能性がある、第 10 回 JOSKAS、2018
大橋 暁、田中 信帆 他、両膝蓋骨欠損を呈する Trichorhinophalangeal syndrome の変形性関節症に対して BCS 型人工膝関節置換術を施行した一例、第 10 回 JOSKAS、2018
田中 信帆 他、変形性関節症では変性軟骨から遊離した MIF が滑膜病変を引き起こす一因となっているのかもしれない、第 33 回日本整形外科学会基礎学会、2018
福井 尚志、田中 信帆 他、滑膜病変と早期 OA、第 46 回日本関節病学会、2018
田中 信帆 他、変形性関節症 (OA) における疼痛に関与しうる miRNA の検討-関節液中の exosome に含まれる miRNA の解析結果から-、第 32 回日本軟骨代謝学会、2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者氏名：田中 信帆

ローマ字氏名：TANAKA Nobuho

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構相模原病院臨床研究センター

部局名：政策医療企画部

職名：研究員

研究者番号 (8 桁)：60530920

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：津野 宏隆

ローマ字氏名：TSUNO Hirotaka

研究協力者氏名：大橋 暁

ローマ字氏名：OHASHI Satoru

研究協力者氏名：福井 尚志

ローマ字氏名：FUKUI Naoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。