

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03785

研究課題名(和文)変形性関節症における老化細胞エクソソームの解明と機械学習を利用した治療薬の探索

研究課題名(英文)The role of chondrocyte/senescent cells-derived exosomal microRNA in pathogenesis of osteoarthritis, and in silico drug discovery pathogenesis of osteoarthritis and in silico drug discovery

研究代表者

味八木 茂 (Miyaki, Shigeru)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：10392490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、最も罹患者が多い関節疾患である変形性関節症(OA)の分子機構の理解と新たな治療薬開発のために軟骨細胞・老化細胞における遺伝子発現制御因子 microRNA(miRNA)に注目した。軟骨細胞で高発現していたmiR-23a/bクラスターおよびmiR-26aの遺伝子改変マウスを作製・解析した結果、細胞内および分泌型miRNAとしてもOA発症に本質的な役割がないことが明らかになった。しかし、各miRNAのノックアウトマウスは、骨密度の低下など老化様の表現系を示した。また、OA治療薬のためのドラッグリポジショニングに向けて既存薬ピックデータをもとに機械学習を取り入れた探索を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで in vitro 実験によりOAにおけるmiR-23a/bクラスターおよびmiR-26aの機能が報告されてきたが、議論の余地があった。本研究による遺伝子改変マウスの結果から、これらmiRNAは軟骨細胞で高発現しているものの、細胞内および分泌型miRNAとしてもOA発症に本質的な役割がないことを明らかにできた。さらに、これらmiRNAのノックアウトマウスは、骨密度の低下など老化様の表現系を示すことから、今後の研究によりmiR-23a/bクラスターとmiR-26aを介した老化メカニズムの新しい洞察を開く可能性がある。また、未だ治療薬のないOAの治療薬を探索することには意義がある。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis (OA) is the most prevalent arthritic disease. The present study focused on the role of chondrocyte/senescent cells-derived cellular/exosomal microRNA in OA pathogenesis and in silico drug discovery for OA treatment. Although miR-23 a/b cluster and miR-26a were highly expressed in articular chondrocytes, both cellular and exosomal miRNAs (miR-23a/b and miR-26a) are not essential for OA pathogenesis associated with aging, and mechanical overload and local inflammation by trauma. However, both knock out mice exhibited accelerated aging-phenotype such as bone loss. Thus, we should further examine what function of these miRNAs including exosomal miRNAs is derived from which cells, and their target genes in order to reveal the mechanism of accelerated aging-like phenotype such as osteopenia in knock out mice. These future results might open a new insight in aging mechanisms through miR-23 a/b clusters and miR-26a.

研究分野：軟骨代謝

キーワード：変形性関節症 microRNA 細胞老化 ドラッグリポジショニング 機械学習

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、変形性関節症(OA)は患者の生活の質を著しく低下させ、要支援から要介護となる原因第一位の運動器疾患の中で最も代表的な疾患である。現在、本邦だけでも約2千万人の患者がいるとされている。それゆえ、加齢に起因するOAの発症予防や治療は喫緊の課題である。しかし、現在の主な治療法は、鎮痛消炎剤等による対処療法および最終的な人工関節置換術によるものであり、進行抑制治療法や早期診断法の確立にも至っていない。そこで、分子機構の理解を通じて、新たな治療法や早期診断法の開発につながる標的分子を同定し、その効果を実証していくことが治療薬や診断マーカーの開発にとって非常に重要である。

老化促進マウス(SAMP8)は、これまでに学習・記憶障害といった認知症のモデルマウス(約40週齢)として知られているが、経時的に膝関節を解析したところ9週齢で軟骨において老化細胞が増加し、23週齢で一様に重篤なOAを示すことから一次性OAモデルとして有用であることを明らかにした(論文投稿中)。それゆえSAMP8を利用することでOA分子機構の解明や新たな治療法や早期診断法の開発につながると考えた。近年、多くの疾患で加齢により老化細胞を増加することが報告されているが、その機構の一部として加齢によるmicroRNA(miRNA)の発現変化が、老化細胞を増加させていると報告されている(*Cell Metabolism 2012, Aging Cell 2013*)。このようにmiRNAを介した遺伝子発現システムの破綻が老化や疾患発症に至ることが示唆される。そして近年、miRNAは“エクソソーム”と呼ばれる細胞外小胞に包まれて分泌され、新たな細胞間コミュニケーション因子としても機能することで一層注目されている。興味深いことに、関節軟骨より老化細胞を除去することでOAを抑制できること(*Nat Med 2017*)、視床下部に存在する幹細胞より分泌するエクソソームmiRNAは、全身老化に関与することが報告された(*Nature 2017*)。しかし、軟骨細胞・老化細胞より分泌したmiRNAを含むエクソソームの機能についてはほとんど明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、軟骨細胞・老化細胞より分泌するmiRNAが、老化やOA発症に関与しているのかを明らかにすること、そしてOA治療薬を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 関節軟骨・老化細胞由来エクソソームmiRNAの発現解析

ヒト関節軟骨や老化促進マウス(SAMP8)とそのコントロールマウスであるSAMR1各々より培養関節軟骨細胞およびその培養上清中のmiRNAの発現解析を行なった。また、老齢マウスより関節軟骨細胞を採取することは困難であるため、これまでに細胞老化誘導能の報告のある過酸化水素や抗がん剤の一種であるdoxorubicinなどの薬剤添加によりヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)やヒト軟骨細胞に細胞老化を誘導可能であるか検討した。そして、軟骨細胞・老化細胞由来のエクソソームmiRNAとして着目したmiRNAは、CRISPR/Cas9システムによるノックアウトマウスを作製した。

## (2) miRNA ノックアウトマウスの表現系解析

関節軟骨細胞より分泌したエクソソーム miRNA のトップ2である miRNA の遺伝子改変マウスを用いて解析を行なった。

### ① miRNA ノックアウトマウス由来軟骨細胞のエクソソーム機能解析

各ノックアウトマウスより関節軟骨細胞を単離・培養し、細胞内およびエクソソーム内、血清中にこれら miRNA が存在しないことを確認した。miRNAs KO による細胞老化への影響について各老化マーカー (SA- $\beta$  Gal、*CDKN2a* など) を指標に確認した。

### ② miRNA ノックアウトマウスの表現系解析 (miRNA ノックアウトによる OA 発症・進行に及ぼす影響)

全身もしくは軟骨特異的 miR-23a/b クラスターノックアウトマウスと全身 miR-26a ノックアウトマウスと軟骨特異的 miR-26a 過剰発現マウスは、加齢にともなう肉眼的評価、筋力、DEXA 法による骨密度解析を行なった。さらに、OA 発症や進行への影響を調べるために自然加齢モデル (18ヶ月齢まで)、靭帯切断による OA 誘導モデルを作製し、各種染色や関節構成組織 (軟骨、半月板、軟骨下骨、滑膜) の組織学的変化をスコアリングにより評価した。さらに、miR-23a/b、miR-26a の標的遺伝子を同定するために、コントロール (wild type)、miR-23a/b KO および miR-26a ノックアウトマウス由来の関節軟骨細胞、これらノックアウト関節軟骨細胞に mimic miRNA を過剰導入した細胞における遺伝子発現を RNA-Seq 解析および iTRAQ によるプロテオミクス解析によりマルチオミクス解析を行なった。得たデータを標的遺伝子予測データベース (TargetScan など) と比較し、リアルタイム PCR による遺伝子発現やウェスタンブロットングによるタンパク質の発現を確認し、候補遺伝子を絞込み、結合配列を用いたルシフェラーゼアッセイにより標的遺伝子を同定する予定とした。

## (3) In silico 創薬を利用した OA 治療薬のためのドラッグリポジショニングに向けて

C57BL6/J マウスにおける OA の自然発症には、1年半以上もの飼育が必要であることやその発症時期や程度が様でないことから、より簡便に比較的短期間に OA を誘導できるモデルマウス (靭帯切断などによる OA 誘導モデル) が利用されてきた。本研究では、主な投薬対象は加齢依存的な 1 次性 OA が重要であると考え、23 週齢で一様に重篤な OA を示した自然発症 OA モデルである SAMP8 を使用した。研究分担者である山西らが開発した機械学習プログラムを利用した in silico 創薬<sup>1-3)</sup>に向けて、これまで OA 誘導モデルマウスにより OA 抑制効果が報告されている既存薬物が機械学習の正例となり得るかを SAMP8 に投与し、OA 抑制効果を評価した。正例となり得た 5 種類の化合物を指標に、その既知情報と本研究で得た新たな発現解析データ、そして KEGG データベースなどを用いて日本や欧米で承認されている全ての薬物に適用し、薬物に関する構造を含むケミカル情報や副作用情報、薬物応答遺伝子発現情報、疾患に関するフェノタイプ情報やパスウェイ情報などの網羅的データを融合解析し、潜在的な薬物の効能を体系的に大規模予測するための in silico 手法を用いた解析を行うことで、候補既存薬を探索する。

## 4. 研究成果

### (1) 関節軟骨・老化細胞由来エクソソーム miRNA の発現解析

Doxorubicin 処理により MSC および軟骨細胞に細胞老化を誘導し、SA $\beta$ -Gal 染色、細胞老化マーカーなどの遺伝子・タンパク質の発現やエクソソーム分泌量の変化、さらには他の培養細胞への添加実験などを行なった結果、確かに 2 週間ほどの培養により SA $\beta$ -Gal および細胞老化マーカー陽性の老化細胞も認められたが、安定しない実験結果が得られた。ヒトおよびマウスの培養関節軟骨細胞の miRNA および培養上清中のエクソソーム miRNA は、細胞内およびエクソソーム内ともに同じような miRNA の構成パターンであった。着目した軟骨細胞で高発現し、エクソソーム内にも豊富に含まれていた miR-23a/b クラスターの軟骨特異的ノックアウトマウスと全身ノックアウトマウスと miR-26a の全身ノックアウトマウスを解析した。各 miRNA ノックアウトマウスの培養軟骨細胞由来のエクソソーム miRNA は確かに検出されず、全身ノックアウトマウス由来の血清中でも検出されなかった。この各 miRNA ノックアウトマウスの培養軟骨細胞由来のエクソソームを野生型マウスの培養軟骨細胞に添加しても遺伝子発現パターンに大きな変化は与えなかった。

### (2) miRNA ノックアウトマウスの表現系解析

軟骨特異的 miR-23a/b クラスターノックアウトマウスは、自然加齢による 18ヶ月齢マウスや OA 誘導モデルにおいてコントロールマウスと比較して膝関節における有意な病理組織学的変化は観察されなかった。しかし、全身ノックアウトマウスでは、3ヶ月齢から成長に伴う体重増加が見られず、12ヶ月齢では骨密度の低下など老化様の変化が認められた。しかし、関節軟骨細胞において老化細胞のマーカーの一つである p16<sup>INK4a</sup> 陽性細胞は増加していたが、膝関節組織における有意な病理組織学的変化は観察されず、OA を発症していなかった。また、miR-26a については軟骨特異的過剰発現マウスと全身ノックアウトマウスの解析を行なった。過剰発現およびノックアウトマウスの老齢 18ヶ月齢マウスは、コントロールマウスに比べて各関節組織における評価スコアに有意な差はなかった。しかし、全身 miR-26a ノックアウトマウスは、12ヶ月齢で骨密度の有意な低下が認められた。さらに、OA 誘導モデルにおいても miR-23a/b クラスターや miR-26a の遺伝子改変マウスともにコントロールマウスに比べて関節組織において有意な病理組織学的変化は観察されなかった。以上のように OA 発症には本質的な役割がなかったことで、軟骨細胞におけるこれら miRNA の標的遺伝子の同定に重要性は無いが、オミクス解析の結果と標的遺伝子予測データベースと比較により、miR-23a/b クラスターと miR-26a の標的遺伝子の候補群をリストすることができた。

軟骨細胞で高発現していた miR-23a/b クラスターおよび miR-26a であるが、出生直後および成長期における骨格系の発生・発達には影響がなく、細胞内およびエクソソーム miRNA としても OA 発症に本質的な役割がないことが明らかになった(論文投稿中)。しかし、miRNA のノックアウトマウスは、骨密度の低下など老化様の表現系を示すことから、今後の研究により miR-23 a/b クラスターと miR-26a を介した老化メカニズムの新しい洞察を開く可能性がある。

### (3) In silico 創薬を利用した OA 治療薬のためのドラッグリポジショニングに向けて

予備的に正例候補の既報 5 種類の薬剤について医薬データベース(発現データや KEGG データベースなど)を用いて日本や欧米で承認されている全ての薬物に適用し、薬物に関する構造を含むケミカル情報や副作用情報、薬物応答遺伝子発現情報、疾患に関するフェノタイプ情報やパスウェイ情報などの網羅的データを融合解析し、さらに正例候補として3つの候補既存薬を選択した。実際に In silico 創薬をさらに利用していくにあたり、正例となり得るのかを確認するために、5 週齢 SAMP8 マウスに既存薬 8 種を投与後、重篤な OA へと進行する 23 週齢で膝関節組織評価による OA 発症の抑制効果と大腿骨における骨密度を解析した。その結果、関節軟骨の組織学的評価基準となっている OARSI スコアにおいて、有意に OA 抑制を認めるものが 2 種類あったが、その効果は非常に軽微であった。これは、OA 誘導モデル と自然発症 OA モデルに対する効果の違いなども考えられる。OA 候補薬剤を抽出する精度をより高める上でも、正例とする化合物については、SAMP8 マウスモデルを用いて最低 5 種は確認する必要があり、本研究期間内で目標としていた正例化合物最低 5 種の決定には至っていない。今後は、上述したように正例化合物のデータ取得などについてさらに精査した上で In silico 解析を実施し、新たな OA 発症機構や科学的な証拠に基づいた OA 治療薬候補を同定していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sanada Y, Tan SJ0, Adachi N, Miyaki S.	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 Pharmacological Targeting of Heme Oxygenase-1 in Osteoarthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel)	6. 最初と最後の頁 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10030419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagira K, Ikuta Y, Shinohara M, Sanada Y, Omoto T, Kanaya H, Nakasa T, Ishikawa M, Adachi N, Miyaki S, Lotz M.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Histological scoring system for subchondral bone changes in murine models of joint aging and osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66979-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shirakawa Y, Nakasa T, Kanemitsu M, Nekomoto A, Ishikawa M, Yimiti D, Miyaki S, Adachi N.	4. 巻 Oct
2. 論文標題 Therapeutic effect of targeting Substance P on the progression of osteoarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mr/roab089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 味八木 茂
2. 発表標題 変形性関節症におけるmicroRNAとエピトランスクリプトーム
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原祐輔、味八木茂、眞田洋平、Chenyang Ding、秋本崇之、中佐智幸、石川正和、亀井直輔、安達伸生
2. 発表標題 変形性関節症の発症におけるmiR-23a/b clusterの役割
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 味八木 茂
2. 発表標題 新たな細胞間コミュニケーション因子 ” エクソソーム ” の関節疾患や組織再生への応用
3. 学会等名 第8回JAPSAM PRP・幹細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Sanada, Shigeru Miyaki, Yasunari Ikuta, Masahiro Shinohara, Keita Nagira4, Hiroyuki Ishitobi1, Kiminori Matsubara5, Masakazu Ishikawa1, Tomoyuki Nakasa, Nobuo Adachi
2. 発表標題 Senescence Accelerated Mice As A New Animal Model For Ageing related Osteoarthritis Development
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 眞田洋平、味八木茂、生田祥成、Dilimulati Yimiti、中佐智幸、石川正和、亀井直輔、安達伸生
2. 発表標題 糖・脂質代謝関連因子microRNA-26aの軟骨恒常性維持における役割について
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
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
研究分担者	眞田 洋平 (SANADA YOHEI) (50796117)	広島大学・病院(医)・研究員  (15401)	
研究分担者	山西 芳裕 (YAMANISHI YOSHIHIRO) (60437267)	九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授  (17104)	
研究分担者	中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI) (60467769)	広島大学・病院(医)・講師  (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	スクリプス研究所		