

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09651

研究課題名(和文) 大腿骨頭壊死症に対するmicroRNAを診断マーカーとした新たな診断法の確立

研究課題名(英文) New strategy for the diagnosis of osteonecrosis of the femoral head

研究代表者

庄司 剛士 (Shoji, Takeshi)

広島大学・医系科学研究科(医)・寄附講座助教

研究者番号：50736569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：特発性大腿骨頭壊死症患者の関節液中のmicroRNA(miRNA)の解析の結果、大腿骨頭壊死症症例においてmiRNA(let7c, miR-30, miR-31, miR-150, miR-210)で有意に高い発現を認めた。また、それらの発現は大腿骨頭壊死症のstage毎の差を認めなかった。一方、大腿骨頭壊死症での関連特異的(ステロイド関連、アルコール関連、狭義の特発性)な解析を試みたが、症例数が少ないことに起因してか、関連別でのそれぞれのmiRNAの発現量の差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性大腿骨頭壊死症症例の関節液中には、疾患特異的なmicroRNA(let7c, miR-30, miR-31, miR-150, miR-210)が高発現しており、さらに壊死症のどのstageにおいても恒常的に高発現していることが示された。これらの疾患特異的と考えられるmicroRNA(単独もしくは複数のmicroRNAを組み合わせることで)を用いることで、これまで少なからず誤診されてきた、特発性大腿骨頭壊死症に対し新たな診断マーカーになる可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated disease specific microRNA in the synovial fluid of the patients with idiopathic osteonecrosis of the femoral head (ONFH) for detection of the new biomarker. We detected several microRNAs including let7c, miR-30, miR-31, miR-150, miR-210 which were highly up-regulated in ONFH patients compared with control. Furthermore, our findings revealed that the expression level of up-regulated miRNAs didn't affect the ONFH stage. We tried to detect the association specific miRNA such as steroid-related, alcohol related, but there were no specific miRNAs with statistical significance, which might be caused from small number of the ONFH patients, especially the ONFH patients without steroid and alcohol relation.

研究分野：整形外科

キーワード：特発性大腿骨頭壊死症 microRNA 診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性骨壊死症は膠原病や各種臓器移植後などにおける、ステロイドの大量投与に関連して発生する疾患で、その多くは大腿骨頭に発生し、骨頭圧潰に続発して二次性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。本症の多くは青壮年期に発症するが、その治療に難渋することが多く、また骨壊死自体に対する骨修復を目的とした治療法は未だ確立されていない。本症の診断には単純レントゲン、CT、MRI、骨シンチ等を用いて総合的に診断されるが、本症と診断された症例の中には変形性股関節症、また大腿骨頭軟骨下骨折等の症例が少なからず存在することが報告されている(約 11.1%)。一般的に変形性股関節症、また大腿骨頭軟骨下骨折に対しては保存療法が選択される場合が多く、治療方針を決定する上でも本症に対する疾患特異的な新たな診断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おり、これまで癌などの疾患関連性が指摘されており、悪性腫瘍(膵癌、肺癌、肝臓癌)における疾患特異的バイオマーカーとして有用であることが報告されている。我々は関節リウマチ、変形性関節症、脊髄損傷に miRNA が関与すること、また ONFH においては、大腿骨頭の壊死領域で血管形成、骨形成等に関連する miRNA-210 が壊死部周辺に発現することを報告している。

(3)そこで、ONFH に関連した miRNA が周辺組織より分泌され、また血清中には組織間-細胞間を行き交う miRNA が存在する。ONFH における疾患関連因子特異的な miRNA が存在する。これら疾患関連因子が ONFH における骨梁構造の変化、それに引き続き発生する大腿骨頭の圧壊、また関節内の炎症性変化や関節症の進行に関連するという仮説を立てた。本研究によりこれらの仮説が明らかとなれば、従来画像検査と併せて本症に対する新たな効果的な診断法の確立につながるとともに、これら miRNA と組織所見との関連を解析することで ONFH における新たな病態解明に繋がる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、ONFH に関連した miRNA を同定することで、新たな疾患特異的バイオマーカーとして新たな診断法確立に繋げること。また、それら miRNA の ONFH における骨、関節内病変との関連を明らかにすること、ONFH での病態解明に繋げることである。

本研究では、ONFH に関連した miRNA が周辺組織より分泌され、また血清中には組織間-細胞間を行き交う miRNA が存在する。ONFH における疾患関連因子特異的な miRNA が存在する。

これら疾患関連因子が ONFH における骨梁構造の変化、それに引き続き発生する大腿骨頭の圧壊、また関節内の炎症性変化や関節症の進行に関連するという仮説を立て、以下の 3 課題を明らかにする。

ONFH 患者における股関節液中の miRNA の解析

ONFH 患者における股関節液中の疾患特異的 miRNA の同定

ONFH 患者の骨梁、また関節内所見と同定された miRNA の関連の評価

3. 研究の方法

(1)ONFH 患者由来の関節液における miRNA 発現の網羅的解析

ONFH の診断は、従来の各種画像検査を用いるが、最終的な診断は大腿骨頭の病理学的所見を

用いて行う。

ONFH 患者、また非 ONFH 患者(主に変形性股関節症)から手術時に採取した組織液(関節液)より RNA を精製し、マイクロアレー法を用いた miRNA の網羅的発現解析を行う。

(2) 疾患特異的 miRNA の同定

本症に罹患したその他の ONFH 患者の関節液を用いて、1)のアレーデータより候補として挙げられた miRNA の real time PCR 法を用いた定量化を行い、ONFH と関連の強い miRNA の同定を行う。

(3) 大腿骨頭壊死症における疾患関連因子と miRNA の関連との検討

本症の疾患関連因子(ステロイド関連、アルコール関連、狭義の特発性大腿骨頭壊死症)ごとの疾患関連特異的な miRNA の発現プロファイルを解析する。

(4) ONFH における骨・関節内病変と miRNA との関連評価

ONFH 患者での骨・関節内病変をそれぞれ骨梁構造解析ソフト(TRI/3D-BON-FCS64, Ratoc System Engineering Co., Tokyo, Japan)、また関節内の変性を T2 mapping MRI で評価し、2)で得られた miRNA との関連を評価する。

4. 研究成果

(1) ステロイド関連 ONFH 手術患者(n=3)、また非大腿骨頭壊死症手術患者(変形性股関節症)の症例より、手術時に採取した関節液より RNA を精製し、マイクロアレー法を用いた miRNA, メッセンジャーRNA の網羅的発現解析を行い発現プロファイル解析の結果、発現の亢進を認めた以下の miRNA を候補として選別した。(表.1)

Name	ratio	Name	ratio
hsa-miR-32	12.07	hsa-miR-23	5.93
hsa-miR-186	10.7	hsa-miR-571	5.67
hsa-miR-302c-3p	7.07	hsa-miR-591	5.17
hsa-miR-31	7.00	hsa-miR-128	5.01
hsa-miR-517	6.69	hsa-miR-150	4.67
hsa-miR-302	6.36	hsa-miR-30	2.54
hsa-let7c	6.01	hsa-miR-210-3p	2.01

表.1 候補として選択した miRNA

(2) 疾患特異的 miRNA の同定

本症に罹患したその他の ONFH 患者の関節液を用いて、1)のアレーデータより候補として挙げられた miRNA の real time PCR 法を用いた定量化を行い、ONFH 患者と control 間で比較した。その結果、以下の miRNA(let7c, miR-30, miR-31, miR-150, miR-210)で ONFH 患者と control の間に有意に差を認めた。(n=9) また、ONFH での関連特異的な解析を試みたが、アルコール関連、狭義の特発性 ONFH 症例数が双方ともに少ないこともあり、統計学的に有意となる miRNA の特定には至らなかった。(ステロイド関連、アルコール関連、狭義の特発性) また、ONFH の stage 別での miRNA の発現についても検討を行ったが、それぞれの miRNA の stage 別での発現量の差は認めなかった。

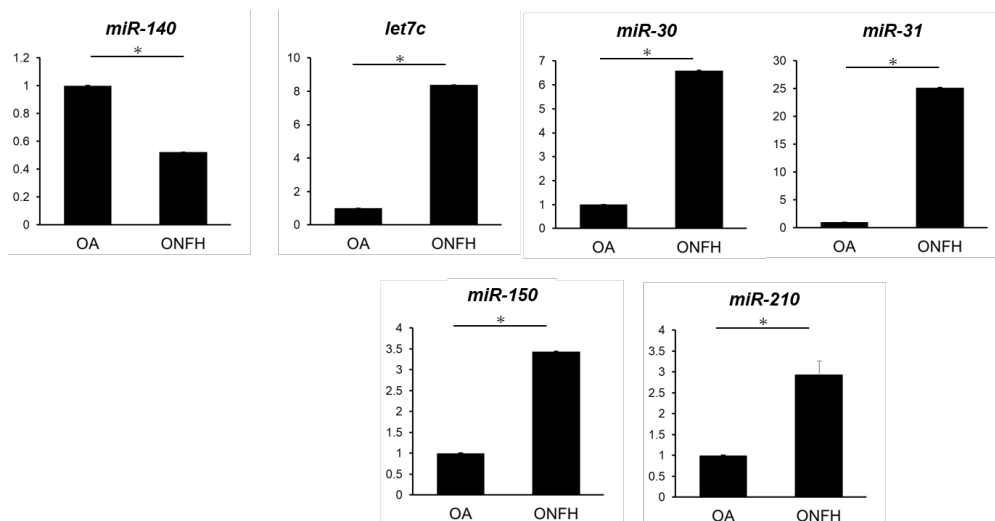


図.1 各 miRNA の real time PCR による評価 (*: p<0.05)

(3) ONFH 患者の軟骨下骨領域における骨梁、また関節内所見と同定された miRNA の関連の評価

3-1. ONFH 患者の軟骨下骨領域での骨梁解析

ONFH 患者症例を Association Research Circulation Osseous (ARCO) 分類をもとに type 別に分類し、大腿骨頭壊死部、また寛骨臼側の軟骨下骨領域での骨梁構造を CT 画像より骨梁解析ソフトを用いて定量的に解析した。ROI は大腿骨頭においては壊死領域辺縁部を評価し、また寛骨臼側は荷重部領域を関心領域とし、それぞれ 10×10×10mm の骨梁構造を評価した。また control として大腿骨頭荷重部領域を関心領域に設定した(図.2)

ONFH 症例における骨梁構造は、大腿骨頭においては stage が進むにつれ壊死領域辺縁部で骨硬化性変化を生じ、stage3 になると骨硬化性変化が減弱すること、また寛骨臼側においては stage1 においてもすでに骨硬化性変化が生じており、stage3 では骨硬化性変化が減少することが示された。(表.2a.b)

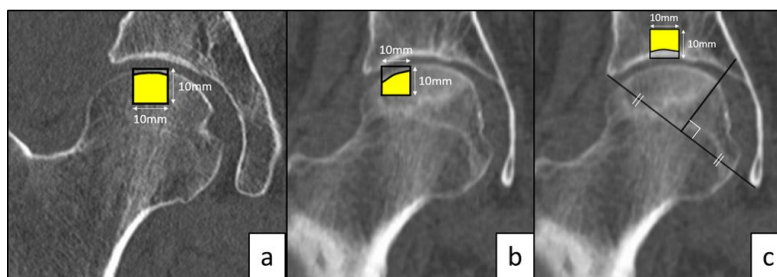


図.2 骨梁解析の関心領域 (a.control、b.壊死領域辺縁部、c.寛骨臼荷重部)

	Control	Stage 1	Stage 2	Stage 3
vBMD (mg/cm ³)	114 (41)	242** (111)	282** (149)	229 (148)
App BV/TV (%)	30.3 (10.1)	51.5** (17.1)	54.7* (22.0)	46.5 (25.3)
App Tb.Th (μm)	740 (68)	1007 (357)	1216** (522)	1004 (283)
App Tb.N (1/mm)	0.366 (0.106)	0.386 (0.141)	0.286 (0.148)	0.252* [†] (0.111)
App Tb.Sp (μm)	694 (143)	608 (130)	809 (340)	938 (638)
SMI	1.42 (0.43)	0.94* (0.60)	0.77 (1.02)	0.89 (0.87)
TBPf (1/mm)	2.16 (0.96)	0.53** (1.34)	-0.06** (1.68)	0.50* (1.79)
Euler's number	-73 (119)	-84 (96)	-48 (77)	-31 (81)
DA	1.67 (0.32)	1.77 (0.35)	1.63 (0.33)	1.67 (0.34)

Results are expressed as mean (standard deviation), * vs Stage 1 P<0.05, ** vs Stage 1 P<0.01, [†] vs Stage 2 P<0.05

表 2a. 大腿骨頭壊死領域における骨梁パラメーター

	Control	Stage 1	Stage 2	Stage 3
vBMD (mg/cm ³)	114 (36)	172** (54)	170** (54)	139 (66)
App BV/TV (%)	25.6 (8.3)	37.6** (11.4)	37.2** (10.2)	29.6 (12.1)
App Tb.Th (μm)	908 (141)	956 (220)	995 (278)	919 (201)
App Tb.N (1/mm)	0.169 (0.069)	0.287 (0.167)	0.262 (0.155)	0.218 (0.143)
App Tb.Sp (μm)	1047 (292)	807 (288)	827 (219)	1015 (371)
SMI	1.80 (0.30)	1.41 (0.57)	1.41* (0.33)	1.46 (0.46)
TBPf (1/mm)	2.37 (0.79)	1.52* (0.90)	1.46* (0.77)	1.69 (0.83)
Euler's number	58 (50)	-25** (79)	-32** (98)	0 (86)
DA	3.98 (2.50)	3.43 (1.88)	2.39 (0.67)	3.38 (1.97)

Results are expressed as mean (standard deviation), * vs Stage 1 P<0.05, ** vs Stage 1 P<0.01, † vs Stage 2 P<0.05

表 2b. 寛骨臼荷重部領域における骨梁パラメーター

3-2. ONFH 患者の関節内の変性評価

ONFH 患者の関節内変性の評価として、関節軟骨の変性を評価することとし、3-1 と同様、対象症例の大腿骨頭壊死部、また寛骨臼側の軟骨下骨領域での関節軟骨の変性を MRI T2mapping を用いて定量的に解析した。ROI は大腿骨頭においては壊死領域、健常領域上の関節軟骨、また寛骨臼側は荷重部領域(寛骨臼窩～寛骨臼外縁)を関心領域とし、それぞれ浅層、深層に分け評価した。なお、解析には Baum1.20b(大阪大学)を用いた。(図.3) 結果、ONFH 症例においては大腿骨頭だけでなく、寛骨臼側においても軟骨変性を認めた。(図.4) このことは、大腿骨頭の圧壊を生じていない症例においてもすでに軟骨変性が生じていることが示される結果であり、3-1 で得られた骨梁構造変化と同様、ONFH 症例では非圧壊症例においても、関節内の変性、また骨梁構造の変化(大腿骨頭、寛骨臼側)が生じていることが示される結果であった。

これらの骨梁構造パラメーターと関節軟骨 T2 値と、(2) で得られたそれぞれの miRNA の相関を検討したが、どの骨梁構造、また関節軟骨のパラメーターも miRNA との関連は検知不可であった。

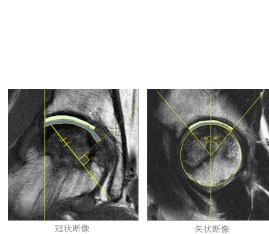


図 3. 関心領域

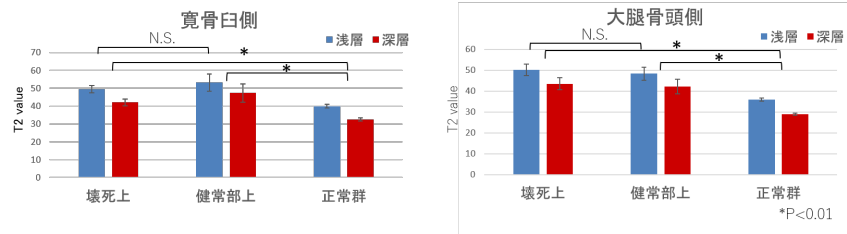


図 4. 大腿骨頭、寛骨臼側の関節軟骨の T2 値

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshi Shoji	4. 巻 71
2. 論文標題 Effect of transtrochanteric rotational osteotomy on impingement and contact state of a femoral implant in conversion total hip arthroplasty - Retrospective simulation study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Biomech (Bristol, Avon)	6. 最初と最後の頁 68-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinbiomech.2019.10.020.	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 -

1. 著者名 Takeshi Shoji	4. 巻 44(7)
2. 論文標題 Intra-articular pathology affects outcomes after joint preserving surgery for osteonecrosis of the femoral head	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Orthop. 2020	6. 最初と最後の頁 1295-1303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00264-020-04550-9.	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 -

1. 著者名 Takeshi Shoji	4. 巻 83
2. 論文標題 Three-dimensional analysis of the cortical contact state of short and conventional stems in different stem positions in total hip arthroplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Biomech (Bristol, Avon)	6. 最初と最後の頁 105297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinbiomech.2021.105297.	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 -

1. 著者名 Takeshi Shoji	4. 巻 80
2. 論文標題 Factors affecting impingement and dislocation after total hip arthroplasty - Computer simulation analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Biomech (Bristol, Avon)	6. 最初と最後の頁 105151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinbiomech.2020.105151.	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 -

1. 著者名 Takeshi Shoji	4. 巻 103-B(9)
2. 論文標題 Preoperative T2 mapping MRI of articular cartilage values predicts postoperative osteoarthritis progression following rotational acetabular osteotomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Joint Journal	6. 最初と最後の頁 1472-1478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1302/0301-620X.103B9.BJJ-2021-0266.	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂 英樹, 庄司 剛士
2. 発表標題 大腿骨頭壊死部で高発現するmicroRNAの血管新生および骨再生効果
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 庄司 剛士
2. 発表標題 特発性大腿骨頭壊死症における滑膜炎の鏡視下評価
3. 学会等名 JOSKAS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂 英樹, 庄司 剛士
2. 発表標題 特発性大腿骨頭壊死組織に特異的に発現するmicroRNAの骨再生効果
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 忠, 庄司 剛士
2. 発表標題 特発性大腿骨頭壊死症におけるMulti-detector CTを用いた骨梁評価
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 忠, 庄司 剛士
2. 発表標題 大腿骨頭壊死症における大腿骨頭および寛骨臼の骨梁構造と病期進行
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上 忠, 庄司 剛士
2. 発表標題 大腿骨頭壊死症における大腿骨頭および寛骨臼の骨梁構造と病期進行, 関節症進行との関連
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庄司 剛士
2. 発表標題 特発性大腿骨頭壊死症における鏡視による滑膜炎所見と術後成績との関連
3. 学会等名 JOSKAS/JOSSM meeting 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上 忠, 庄司 剛士
2. 発表標題 大腿骨頭壊死症における大腿骨頭および寛骨臼の骨梁構造と病期進行
3. 学会等名 第48回日本股関節学会学術集会
4. 発表年 2021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	味八木 茂 (Miyaki Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	
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
---------	---------