

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390367

研究課題名(和文)分泌型microRNAによる運動器疾患への治療戦略

研究課題名(英文)Novel strategy for musculoskeletal diseases using secreted microRNA

研究代表者

安達 伸生 (Adachi, Nobuo)

広島大学・大学病院・准教授

研究者番号：30294383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,000,000円、(間接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：分泌型microRNA(miRNA)を尿中から抽出し、変形性関節症といった運動器疾患の診断マーカーとなり得るかどうかが検討した。健康人3名、初期変形性関節症患者(OA)6名、末期OA患者6名から、尿を採取した。超遠心法によって、尿中に含まれているベジクルを分離し、ベジクル量とmiRNA マイクロアレイによりOAにおいて特異的に変動するmiRNAの同定を試みた。ベジクル量は、末期OAで尿中に多く含まれていた。尿中に含まれるmiRNA-16, 24, 25, let-7bの発現を解析したところ、これらは初期で発現が高値であった。尿中miRNAは、OAの新たな診断マーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine whether secreted microRNA (miRNA) in urine from osteoarthritis (OA) patients could be a novel diagnostic marker for OA. Three healthy subjects, 6 low grade OA patients and 6 severe OA patients were included. Vesicle was isolated from urine by ultra-centrifugation, and quantity of vesicle and miRNAs in urine were identified using microarray. Severe OA urine had large amount vesicle compared to healthy and low grade OA. miRNA-16, 24, 25 and let-7b in urine from low grade OA were highly expressed compared to healthy and severe OA. These results suggested that urine miRNA could be a novel diagnostic marker for OA diagnosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：microRNA non coding RNA 尿 血清 運動器

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、約22塩基程度のnon-coding RNAであるmicroRNA(miRNA)が、様々な疾患に関与していることが明らかとなっている。miRNAは、組織特異的・発生段階特異的に発現し、細胞増殖・分化・アポトーシスなどの生命現象に重要な役割を担っている。したがって、miRNAの発現異常により、様々な疾患が引き起こされることがわかってきた。また、miRNAがエクソソームに封入され、細胞内から放出され、RNAであるにも関わらず、分泌型miRNAとして体液中に存在することが明らかとなり、がん等の早期診断マーカーとしての有用性が報告されている。さらに、母乳中の分泌型miRNAが、乳児に移行して免疫能に寄与しているという報告もあり、分泌型miRNAは、細胞間・組織間の情報伝達の役割を担っていると考えられており、分泌型miRNAの、機能的RNAとしての側面も注目されている。体内のmiRNAの発現を抑制あるいは増加させることで、miRNAの発現を制御するといった新たな治療の試みも行われており、miRNAの重要性が認識されてきている。

2. 研究の目的

本研究では、この分泌型miRNAを血清・尿中から抽出し、変形性関節症といった運動器疾患の診断マーカーとなり得るかどうか、また、その機能を解析し、さらに、筋損傷・骨折・関節疾患といった運動器疾患モデルに投与することで、低侵襲で新しい運動器疾患の治療戦略に発展させることを目指す。

3. 研究の方法

健常人、変形性関節症患者(OA)患者から、尿を採取した。OA患者は、OAの重症度評価であるKellgren Lawrence分類において、度を初期OA、度を末期OAとした。健常人3名、初期OA6名、末期OA6名を対象とした(表1)。

これらの健常人、OA患者の尿から、超遠心法(60,000prm、2回)によって、尿中に含まれているベジクルを分離した。ウェスタンブロッティングにより、ベジクル量を評価し、また、このベジクルからRNAを単離して、miRNA マイクロアレイを行い、網羅的解析を行うことで、変形性関節症において特異的に変動するmiRNAの同定を試みた。さらに、miRNA マイクロアレイの結果において、発現が特異的と思われるmiRNAについて、real time PCRを行い、OAの重症度で、尿中のmiRNAの発現が変動するか検討した。

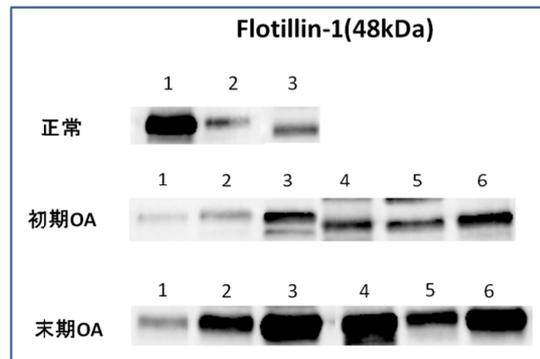
病態	年齢	性別	K/L分類	既往歴	NSAID内服	そのほか内服
正常1	35	M	0	なし	なし	なし
正常2	35	M	0	なし	なし	なし
正常3	35	M	0	なし	なし	なし
初期OA 1	58	F	I	乳癌術後	あり	ホルモン剤
初期OA 2	79	F	I	乳癌術後	なし	ビタミンD製剤
初期OA 3	70	F	I	外陰部扁平上皮癌術後	あり	なし
初期OA 4	56	F	I	なし	なし	なし
初期OA 5	54	F	I	身体表現性障害	なし	向精神薬
初期OA 6	71	M	I	十二指腸癌術後、糖尿病	あり	なし
末期OA 1	72	F	III	なし	あり	抗血小板薬
末期OA 2	73	M	IV	高血圧	降圧薬	降圧薬
末期OA 3	74	M	IV	なし	なし	なし
末期OA 4	70	M	IV	大腸癌術後	なし	なし
末期OA 5	77	M	IV	胃癌術後	あり	なし
末期OA 6	82	M	IV	直腸癌術後、前立腺癌術後、糖尿病、高血圧	あり	降圧薬

表1. 被験者profile

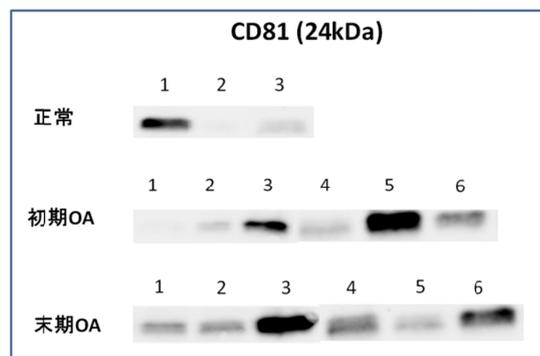
4. 研究成果

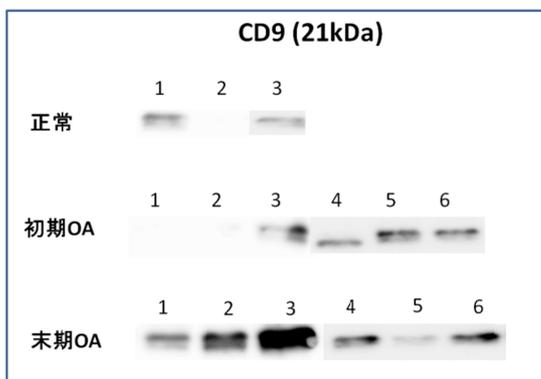
(1) ウェスタンブロッティングによるベジクル中のエクソソームの発現量

エクソソームのマーカーの1つであるflotillin-1は、末期OA患者で強く発現していることが明らかとなった。



また、他のエクソソームのマーカーであるCD81、CD9についても末期OA患者で強く発現している傾向にあった。





これらのことから、末期OA患者では、尿中にエクソソームが多く含まれる傾向にあることがわかった。

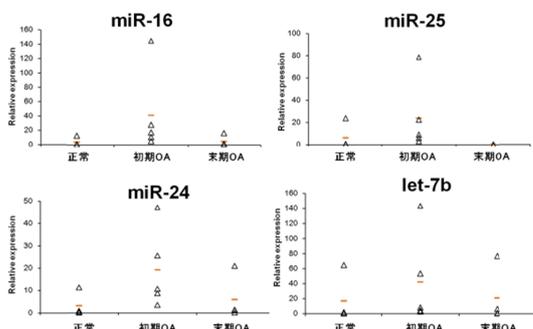
(2) マイクロアレイによる尿中miRNAの網羅的解析

健常人と比較し、変形性関節症患者において56種類のmiRNAが、2倍以上発現が高くなっていた。

- miR-575
- miR-139-3p
- miR-4443
- miR-4476
- miR-3678-3p
- miR-16
- miR-24
- miR-4419a
- miR-491-5p
- miR-4294
- miR-4678
- miR-3173-3p
- miR-183
- miR-296-3p
- miR-3605-5p
- miR-614
- miR-3124-5p
- miR-193b
- miR-194
- miR-4743
- miR-130b
- miR-3150a-3p
- miR-4300
- miR-3074-3p
- miR-196b
- miR-150
- miR-205
- miR-4450
- miR-1911
- miR-30d
- miR-541
- miR-3191
- miR-25
- miR-2909
- miR-422a
- miR-4257
- miR-2110
- miR-134
- miR-3127-5p
- miR-4526
- miR-4703
- miR-4535
- miR-494
- miR-3170
- miR-612
- miR-513b
- miR-596
- miR-512-3p
- miR-4722-5p
- miR-631
- miR-4515
- miR-3176
- miR-139
- miR-4684-5p
- miR-let-7b
- miR-184

(3) OA重症度による尿中miRNAの発現解析

miRNA マイクロアレイの結果において、発現が特異的と思われ、かつすでに多くの報告があり、ある程度機能の明らかとなっているmiR-16, 24, 25, let-7bについて、健常人、OA初期、OA末期患者の尿中での発現をreal time PCRにて解析した。これらのmiRNAは、ばらつきはあるが、OAの初期では、尿中の発現は高く、OAが進行するにつれて発現が低下していた。



今回の検討で尿中ベジクル量が病態によって増減していること、また尿中に含まれるmiRNAの種類が病態によって異なっていることが確認できた。変形性関節症患者、関節リウマチ患者において、体液中に存在するmiRNAについて、これまで報告されてきたものは少なく、本研究では、尿中のmiRNAが重症度などの診断マーカーになる可能性が示唆された。変形性関節症は、進行性で、末期には、人工関節置換術といった手術が必要となり、早期に診断し、治療を行う必要がある。しかしながら、現在では、早期診断を可能とするような有用な診断マーカーはない。今後、大規模な調査・検討を行うことで、尿中の分泌型miRNAは、新たな変形性関節症の診断マーカーになりうる可能性が示唆される。今回解析した4つのmiRNAは、細胞増殖、筋分化などに関与していることが報告されている。尿中から抽出したこれらを多く含むmiRNAは、エクソソームの中に含まれ、尿などの体液に存在している。当科からの報告で、合成2本鎖miRNAを細胞に強制導入し、エクソソームに包まれた状態で分泌されたmiRNAは、トランスフェクション試薬がなくても細胞に取り込まれ、機能することが明らかとなった。(Sinbo K et al. BBRC 2014)。つまり、尿中に存在するエクソソームに包まれたmiRNAも、細胞に取り込まれ、機能する可能性がある。尿中から超遠心法により単離したエクソソームに包まれたmiRNAを投与するという、新しい治療方法の開発も考えられる。現状では、超遠心法で得られるエクソソームの収量は少なく、今後、効率的に多くのエクソソームを尿中から分離・濃縮する技術の開発も必要と思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

加藤智弘 尿中 microRNA による変形性関節症バイオマーカーとしての可能性
第28回日本整形外科学会基礎学術集会
平成25年10月18日 幕張メッセ 千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 伸生 (ADACHI NOBUO)
広島大学・病院・准教授
研究者番号：30294383

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授

研究者番号：70177244

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：70444685

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60467769