様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ９ 月 １２ 日現在

機関番号：３２６４５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2012～2015
課題番号：２４５９２２４５

研究課題名（和文）人工関節再置換率抑制を目指す、マイクロＲＮＡ・ＥＰ４作動薬併用による新規治療法

研究課題名（英文）miRNA expression profiling of PLFs stimulated with EP4 agonist

研究代表者
小坂　泰一（KOSAKA, TAIICHI）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：１０３２８２１３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：APL発症に関連するmiRNAの同定を試みた。PLFsへのEP4 agonist 刺激では、miR-543、miR132-3pの発現が上昇し、またIL-1b 存在下でのEP4 agonist 刺激では、miR-155-5pの減少を認めた。EP4の活性化によってMCP1,IL8、RANKLはmRNAレベルで抑制された。PLFs・MH7A対しmiR-155を強発現したところ、PLFsでは症例差があり、手術からAPL発症までの期間が短い例で、MH7A同様にTWIST1・POSTN・MMP1が抑制される傾向にあった。これら３種類のmiRNAとEP4 agonistの併用はAPL制御に応用しうる。

研究成果の概要（英文）：This study was to investigate miRNA expression profiling stimulated with EP4 agonist in PLFs and to evaluate the function of miR-155 in PLFs and MH7A . Agilent miRNA Array systems was used to screen for differentially expressed miRNAs in PLFs. Enforced over expression of miR-155 were used to investigate the function of miR-155 in PLFs and MH7A. Expression of Twist1, POSTN and MMP1 which were previously identified as the actual target of activity of PLFs and MH7A were examined by Western blot and real-time PCR . As a result of miRNA array system, the expression of miR-543 and miR-132-3p were significantly increased in EP4 agonist treated PLFs compared with non-treatedPLFs. The expression of miR-155-5p was decreased in EP4 agonist and IL-1b treated PLFs compared with IL-1btreated PLFs. Upregulation of miR-155 suppressed Twist1, POSTN, and MMP-1 levels. There is a possibility that these miRNA are an alternative treatment of EP4 agonist has been suggested.

研究分野：整形外科学

キーワード：(1) PLFs　miR-543　miR-155-5p　miR132-3p　EP4 agonist　MH7A　非感染性人工関節弛緩(APL)

１．研究開始当初の背景

変形性股関節症に対する人工股関節手術は世界中で年間約130万人にのぼる，10年から20年経過する過程で数%が再置換を余儀なくされている．人工関節再置換術の最大の原因は人工関節より生じる微細な摩耗粉により惹起される骨破壊を伴った **aseptic prosthesis loosening(APL)** によるもの考えられ，人工関節周囲組織に含まれる **prosthesis loosening fibroblasts (PLFs)**，Macrophages および Osteoclasts 等が関与していると考えられているが病態発症機序の詳細は不明であり，有効な予防・治療法は確立されていない①

２．研究の目的

これまでの先行研究として APL をきたした人工関節周囲組織を組織学的に検索した結果，骨破壊の原因と考えられている上記細胞群に加え，骨軟骨様の組織が混在することを確認し，さらにその周囲には PGE_2 が 0.1 - 1 nM 程度存在することを見いだした．そこで分離培養した PLFs を低濃度 PGE_2 または EP4 agonist で刺激し，DNA array および realtime PCR により網羅的に遺伝子解析をした結果，MCP (monocyte kemotactic protein)-1 をはじめとする約 20 種類の炎症性サイトカイン群の発現は抑制され，一方ヒアルロン酸合成酵素，軟骨型 collagen である coll/11A1 および骨軟骨化因子である FGF -18 発現の増加が観察され，同細胞において EP4 の活性化は抗炎症作用と骨軟骨化促進効果を有することが判明した(図1)②

一方、ある種の micro RNA が PLFs と類似した性質をもつと推測される **RA-FLS** の制御に関連している。この知見を当該病態にも利用すべく，APL 発症に関連する micro RNA の同定を試み、**EP4 agonist** の APL 抑制効果により人工関節再置換を大幅に減少させることを目指し，同病態に対する新規治療法の確立を目標とした。

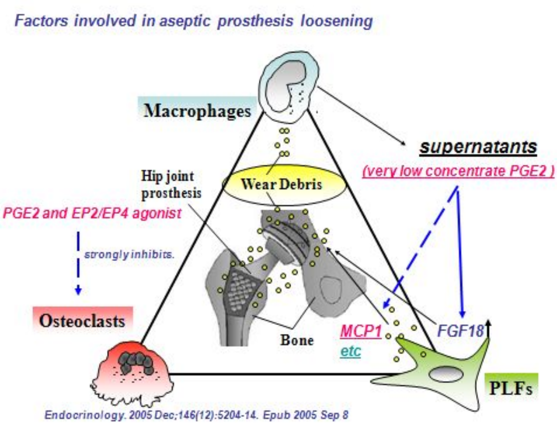

図１

３．研究の方法

(1)　患者由来の PLFs･RA-FLS および RA-FLS の cell line である **MH7A** を、A 群:(EP4 agonist-, IL-1b-)、B 群: EP4agonist 刺激群 (EP4 agonist+, IL-1b-)、C 群:IL-1b 刺激群　(EP4 agonist-, IL-1b+)、D 群:EP4agonist/ IL-1b 刺激群 (EP4 agonist+, IL-1b+) に分けて培養した。EP4 agonist は 1 μM、IL-1b は 10ng/ml で用い、24 時間培養後 total RNA を回収し real time-PCR 法により Twist1、POSTN、MMP1、 MCP1、IL8、RANKL の mRNA レベルでの変動を検討した。
発現解析は各症例において B 群/A 群、D 群/C 群の値を比較した。

(2) 患者由来 PLFs を、A 群: コントロール群 (EP4 agonist-, IL-1b-)、B 群: EP4 agonist 刺激群 (EP4 agonist+, IL-1b-)、C 群: IL-1b 刺激群 (EP4 agonist-, IL-1b+)、D 群: EP4 agonist/ IL-1b 刺激群 (EP4 agonist+, IL-1b+) に分けて培養した。EP4 agonist は 1 μM、 IL-1b は 10 ng/ml で用い、24 時間培養後 total RNA を回収し miRNA array (Agilent) を行った。発現解析は各症例において B 群/A 群､D 群/C 群の値を算出し、2 倍以上または 0.5 倍以下となっている miRNA を変動ありとした。

(3)PLFs および MH7A に has-miRNA155 の 3type (Mature/Match/Pre) をそれぞれ導入、24 時間培養後 total RNA を回収し real time-PCR 法および ELISA 法により Twist1、POSTN、MMP1、同時に MCP1、IL8、RANKL の変動を検討した。

４．研究成果

(1) TWIST1： PLFs・RA-FLS ・MH7A とも A 群/B 群では明らかな変動は認められなかった。C 群/D 群では IL1 存在下においては TWIST1 を上昇させる傾向にあり、EP4 刺激でこの傾向は抑制された。MMP1：PLFs・MH7A とも C 群/D 群､A 群/B 群において IL1 存在下で MMP1 を上昇させ EP4 刺激で有意に抑制した。
PLFs の性質が RASF と近い可能性､周辺の骨・軟骨成分を破壊すること、EP4 の活性化によって MCP1 など数種の攻撃因子が抑制され得ることは以前より示してきたが、今回患者由来の PLFs･RA-FLS および RA-FLS の cell line である MH7A に対し EP4 刺激の反応を RA の活動性に大きく関与する Twist1、POSTN、MMP1 および MCP1,IL8、RANKL を指標に検討したところ、PLFs・RA-FLS・MH7A のこれらの要素に対する反応はきわめて類似していることが判明した。
2) PLFs への EP4 agonist 刺激では､miR-543､mi132-3p の発現が上昇し、また IL-1b 存在下での EP4 agonist 刺激では、miR-155-5p の減少を認めた。また EP4 の活性化によって MCP1,IL8、RANKL は mRNA レベルで抑制され

(図2)。

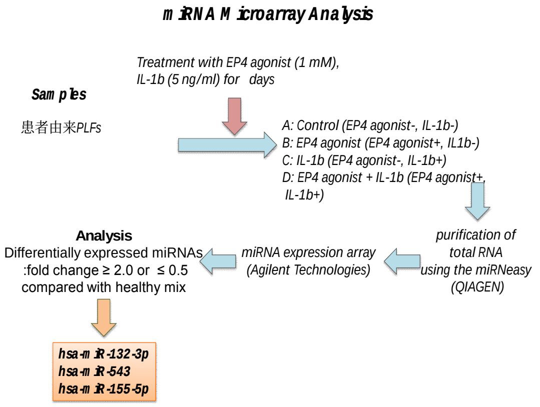

図2

miRNA-543 は endometrial cancer の癌転移において TWIST1 発現を制御することで転移を抑制しうる③。この TWIST1 は periostin(POSTN) とともに RA 滑膜の migration や invasion を制御する ④。miRNA132 は RA と比較し正常患者の血漿中に安定して存在することが報告されている⑤。また BDNF-ERK-CREB signal を制御することで、慢性疼痛の治療に関連する可能性が示唆されている⑥。
miR-155はRA患者の関節液で有意に認められ、関節液中のmiR-155と圧痛関節数は相関しているとの報告がある⑤。
よってこれら3種類のmiRNAをAPL患者の骨髄で強発現、あるいは抑制を併用することで、APL の骨破壊・慢性疼痛などの症状を制御しうるのではないかとの着想に至った。

(3)実験1)2)の成果をふまえ PLFs・MH7A に対しまず miR-155 を強発現したところ、MH7A について、TWIST1、POSTN、MMP1 は Mature・Match・Pre の 3type の miR-155、いずれの導入でも遺伝子レベル、蛋白レベルでで有意に抑制された。
患者由来のPLFsは症例差が大きく、miR-155の導入効率は一定しなかったが、手術からAPL発症までの期間が短い例で、MH7Aと同じ反応を示す傾向がみられた。

miR-155 は炎症性サイトカインを制御し、破骨細胞の分化にも大きくかかわっている可能性が示唆されている⑦。また患者由来のRAFsにおいてmiR-155の導入がMMP1を役制したとの報告もある。
よってこれらの結果は当初予想していたものと反しており、cell line である MH7A 固有の反応か否かは今後検討する必要があるとして、少なくとも EP4agonist との併用を試みる場合、miR-155 については強発現、抑制の双方の可能性を検討する必要があると思われた。

<引用文献>

① Yousef Abu-Amer, Isra Darwech,and John C Clohisy
“Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies”
2007;vol.9 Suppl 1:S6.

②小坂泰一,山本謙吾、森島満
“分子レベルからみた整形外科疾患ーシリーズVIII Aseptic prosthesis loosening における PGE2/EP4 受容体の役割”
整形・災害外科 52巻:7号:816-817

③ Bing L, Hong C, Li-Xin S, Wei G.
“MicroRNA-543 suppresses endometrial cancer oncogenicity via targeting FAK and TWIST1 expression”
Arch Gynecol Obstet. 2014 Sep;290(3):533-41.

④ You S, Yoo SA, Choi S, Kim JY, Park SJ, Ji JD, Kim TH, Kim KJ, Cho CS, Hwang D, Kim WU.
“Identification of key regulators for the migration and invasion of rheumatoid synoviocytes through a systems approach”
Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jan 7;111(1):550-5.

⑤ Buckland J.
“Biomarkers: microRNAs under the spotlight in inflammatory arthritis”
Nat Rev Rheumatol. 2010 Aug;6(8):436.

⑥ Yi LT, Li J, Liu BB, Luo L, Liu Q, Geng D.
“BDNF-ERK-CREB signalling mediates the role of miR-132 in the regulation of the effects of oleanolic acid in male mice”
J Psychiatry Neurosci. 2014 Sep;39(5):348-59.

⑦ Zhang J, Zhao H, Chen J, Xia B, Jin Y, Wei W, Shen J, Huang Y.
“Interferon-β-induced miR-155 inhibits osteoclast differentiation by targeting SOCS1 and MITF”

⑧ Long L, Yu P, Liu Y, Wang S, Li R, Shi J, Zhang X, Li Y, Sun X, Zhou B, Cui L, Li Z.
“Upregulated microRNA-155 expression in peripheral blood mononuclear cells and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis”
Clin Dev Immunol. 2013;2013:296139.

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）
〔学会発表〕（計５件）

① 小坂 泰一，山本 謙吾，澤地恭昇
“EP4agonis および miR-155 の RA-FLS に対する影響”
第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会
2016 年 10 月 13 日～14 日
福岡国際会議場(福岡県福岡市)

② 小坂 泰一，山本 謙吾， 澤地恭昇
“RA-FLS（MH7A）における miR-155 導入の効果に関する検討”
第 60 回日本リウマチ学会
2016 年 4 月 21 日～23 日
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

③ 小坂泰一,上田しのぶ,水谷隆之，澤地恭昇， 依藤麻紀子， 小山尊士， 正岡利紀， 宍戸孝明, 黒田雅彦,山本謙吾
“Fibroblast-Like Synoviocytes（MH７A）における miR-155 導入効果の検討”
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会
2015 年 10 月 22 日～23 日
富山国際会議場(富山県富山市)

④ 小坂泰一， 上田しのぶ， 澤地 恭昇， 依藤麻紀子 小山尊士 宍戸孝明
黒田雅彦 山本謙吾
RA synovialfibroblasts への EP4 agonist 刺激によって発現変動しうる、miRNA の検討
第 44 回日本人工関節学会
2014 年 2 月 21 日～2 月 22 日
沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

⑤ 小坂泰一 上田しのぶ 澤地 恭昇 依藤麻紀子 小山尊士 宍戸孝明
黒田雅彦 山本謙吾
“人工関節周囲組織線維芽細胞への EP4 agonist 刺激によって発現変動する miRNA の探索”
第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会
2013 年 10 月 17 日～10 月 19 日
幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)

６．研究組織
(1)研究代表者
小坂 泰一（KOSAKA Taiichi）
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：10328213

(2)研究分担者
山本 謙吾（YAMAMOTO Kengo）
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号： 10246316

(2)研究分担者
澤地 恭昇（SAWAJI Yasunobu）
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号： 20571152

(3)連携 研究者
黒田 雅彦（KURODA Masahiko）
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号： 80251304