

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791544

研究課題名(和文)骨折治癒過程におけるmicroRNAの関与と治療への応用

研究課題名(英文)Role of microRNA in fracture healing and its potential application

研究代表者

李 相亮 (Lee, Sang Yang)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：40533732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ラット閉鎖性骨折モデルおよび難治性骨折モデルを用いて、マイクロアレイ解析およびreal-time PCRを行い、骨折部において著明に発現が増加・低下する10種類のmiRNAを同定した。本研究により、今までに解明されていなかった骨折治癒過程で重要な役割を果たすことが予想され、骨折治癒促進・阻害に関連するmicroRNAが明らかとなった。

これらのmicroRNAを応用し、骨折治癒促進を目標とするmiRNA創薬への今後の展開が期待される。本研究により、microRNAを用いた骨折治療・骨再生療法への将来の臨床応用に有益な情報がもたらされるであろう。

研究成果の概要(英文)：We for the first time showed microRNA expression patterns specific for fracture healing in rats. Our study revealed five microRNAs that remarkably increased and five microRNAs that remarkably decreased in the process of fracture healing. To characterize microRNA profiles in fracture healing is important for understanding the molecular mechanism for fracture healing. This study may provide new evidence for the clinical application of microRNA for enhancement of fracture healing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学・運動器外傷学

キーワード：骨折治癒 microRNA 骨再生 偽関節

### 1. 研究開始当初の背景

microRNA(以下 miRNA)は、翻訳レベルでタンパク質の発現を制御する機能を持つ、近年同定された長さ 18~25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA である。miRNA は、分化、細胞増殖、アポトーシスなどの生物にとって欠かすことのできない生命現象に深く関わっていると考えられている。また、miRNA が、癌や生活習慣病などの疾患の病因に関与することが近年報告されている。関節リウマチや関節軟骨変性疾患における miRNA の関与も報告されており、整形外科領域でも関心が高まっている。

骨折は頻繁に発生する外傷であり、患者に大きな苦痛を与え、生活の質を著しく低下させる。高齢社会を迎えているわが国では、骨粗鬆症患者の増加に伴い、骨折患者が今後、爆発的に増加していくことが考えられる。一方、全骨折の約 5-10%は正常な治癒過程を経ず、骨癒合不全(遷延治癒、偽関節)に陥ると言われている。このような難治性骨折の治療は、非常に難渋することも少なくなく、たとえ治癒したとしても、治療期間が長期にわたり、患者に精神的肉体的苦痛をもたらす、後遺症に苦しむことも少なくない。したがって、骨折を確実に治癒させる方法を新たに確立できれば社会に大きな貢献ができる。また、骨折が治癒するまでの期間が長くなればなるほど、患者に社会生活において大きな不利益をもたらすことから、骨癒合までの期間を短縮する治療法の研究、開発は社会的・医学的急務といえる。

現在、わが国の臨床において、骨折治癒を促進する手段としては低出力超音波パルスの照射しか存在しないのが現状である。研究代表者は、臨床においても骨折治療を専門とし、骨折治癒を促進する他の治療手段を日々模索しており、今回、骨折治癒過程における miRNA の関与に着目した。

今までに明らかにされていなかった骨折治癒過程において重要な役割を果たす miRNA

が解明されれば、新たな骨折治癒メカニズム解明の一助にもなり、また、miRNA をターゲットとした骨再生・骨折治癒促進療法への応用、すなわち、骨折治癒促進のための「miRNA 創薬」が可能になるとの着想を得て、本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットの骨折治癒過程において重要な役割を果たしている miRNA を同定することである。また、骨癒合促進・阻害に関与する miRNA を明らかにし、これらをターゲットとした骨癒合促進治療法を展開させることである。本研究により、骨折治癒の新たなメカニズムの解明、および難治性骨折が起こる原因の解明の一助となることが期待される。さらに、miRNA を用いた骨折治癒促進・骨再生療法への将来の臨床応用に有益な情報をもたらすことを目標とした。

### 3. 研究の方法

ラット大腿骨骨折モデル・難治性骨折モデルにおける骨折部での miRNA の発現を miRNA マイクロアレイにて解析した。その解析結果から、骨折治癒に関与すると思われる候補の miRNA をピックアップし、real-time PCR でそれらの発現様式を検討した。

通常に治癒する骨折モデルとして、ラットの大腿骨骨折髓内釘固定モデルを用いた。このモデルは、骨折の正常な治癒過程を評価するのに最適な動物モデルとして広く認識されている。比較対象として難治性骨折モデルを用いる。このモデルは、大腿骨に骨折を作成した後に、骨折局所の周囲軟部組織を剥離し、骨膜を焼灼することで、骨折が治癒しなくなるモデルである。

骨折作成後 14 日目に、両モデルの骨折部の組織を採取し、total RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて miRNA の発現を網羅的に解析した。この解析で、両モデル間で発現に著明な差を認められた miRNA を選定し、real-time

PCRにてこれら miRNA の発現様式を解析した。これら一連の解析により、骨折治癒において重要な役割を果たすと考えられる miRNA を選定した。

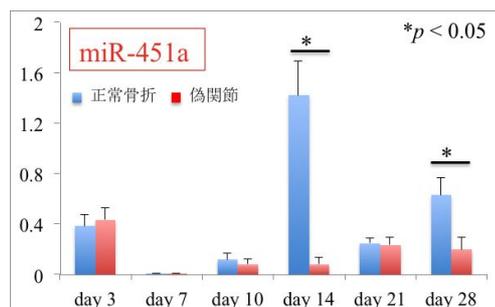
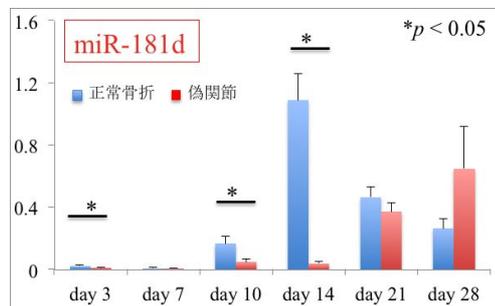
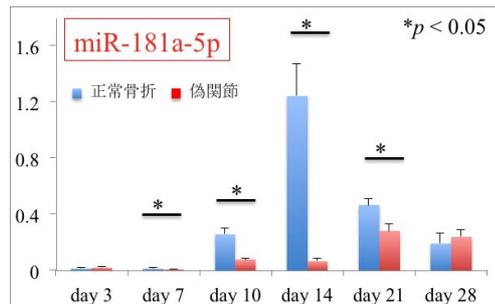
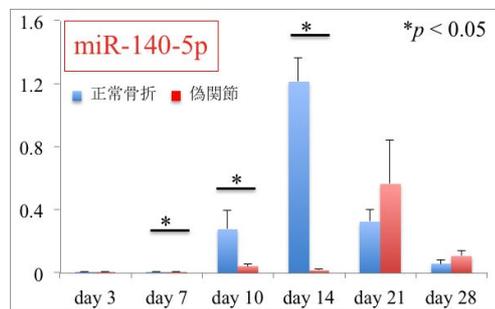
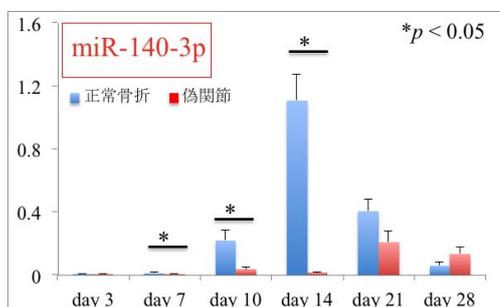
#### 4. 研究成果

骨折後 14 日目の骨折部の組織から抽出した miRNA に対して、miRBase Version 16 に基づき、680 種全てのラットの miRNA の発現量をマイクロアレイ解析により網羅的に検討したところ、miR-140-3p・miR-140-5p・miR-181a-5p・miR-181d・miR-451a が正常骨折群で有意に増加していた上位 5 種の miRNA であった(下表)。

miRNA	Fold change 正常骨折/偽関節-モデル	Target genes
miR-140-3p	2.15	NFYA, UBE2C, ZNF295
miR-140-5p	2.43	HDAC4, FGF2, VEGFA
miR-181a-5p	3.02	METAP1, PLCL2, ZNF594
miR-181d	3.53	ZNF799, CREBFR, ZNF788
miR-451a	2.65	MIF, CAB39, ABCB1

また、real-time PCR では、miR-140-3p と miR-140-5p は骨折後 7・10・14 日目に、miR-181a-5p は骨折後 7・10・14・21 日目に、miR-181d は骨折後 3・10・14 日目に、miR-451a は 14・28 日目に偽関節群に比べて正常骨折群で有意に発現増強を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 1)。

図 1 Real-time PCR



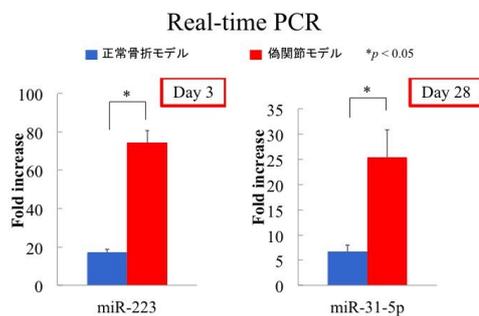
正常骨折群における経時的変化については、これら 5 種の miRNA 全てが骨折後 14 日目にピークを示す挙動を示し(図 1)、7 から 10 日目、10 から 14 日目にかけて有意差をもって増加を示し、14 から 21 日目にかけて有意差をもって減少を示した ( $p < 0.05$ )。

一方、正常骨折群で有意に発現が低下していた上位 5 種の miRNA は、miR-31-3p・miR-31-5p・miR-146a・miR-146b-5p・miR-223 であった ( $p < 0.05$ ) (下表)。

miRNA	Fold change 偽関節/正常骨折モデル	Target genes
miR-31-3p	3.54	SLC30A5, MASP1, GABBR2
miR-31-5p	3.39	PPP2R2A, NFAT5, FZD3
miR-146a	2.74	TRAF6, IRAK1, CD80
miR-146b-5p	2.25	NFKB1, TRAF6, IRAK1
miR-223	3.25	NFIA, RHOB, MEF2C

また、real-time PCRにて、骨折後14日目以外では、骨折後3日目にmiR-223が、骨折後28日目にmiR-31-5pが、骨折群で著明に発現が低下していたことが明らかとなった ( $p < 0.05$ ) (図2)。

図2 Real-time PCR



尚、これらmiRNAを用いたin vivo実験については、現在、どのmiRNAで、どのようなdoseを用いれば、効果的な骨折促進・骨再生が可能となるか、現在、下実験を行っている準備段階である。

#### 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9件)

1. Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E, Takahara S, Kurosaka M. Potential Role of MicroRNA during Fracture Healing. 2<sup>nd</sup> AOTra

uma Asia Pacific Scientific Congress. 2014.5.16-17, Seoul, South Korea.

2. Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E, Takahara S, Kurosaka M. Potential Role of MicroRNA in fracture nonunion. 2<sup>nd</sup> AOTrauma Asia Pacific Scientific Congress. 2014.5.16-17, Seoul, South Korea.
3. 脇貴洋、李相亮、新倉隆宏、岩倉崇、奥町悦子、高原俊介、黒田良祐、黒坂昌弘. 骨折治癒過程におけるmicroRNA発現の網羅的解析. 第122回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会. 2014年4月11日-12日. 岡山.
4. Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E, Takahara S, Kuroda R, Kurosaka M. Potential Role of microRNA in Fracture Healing in Rats. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2014.3.15-18, New Orleans, USA.
5. 脇貴洋、李相亮、新倉隆宏、岩倉崇、堂垣佳宏、高原俊介、黒田良祐、黒坂昌弘. 骨折治癒過程におけるmicroRNA発現の網羅的解析. 第13回日本再生医療学会総会. 2014年3月4日-6日. 京都.
6. 脇貴洋、李相亮、新倉隆宏、古賀敬章、堂垣佳宏、奥町悦子、黒坂昌弘. ラット偽関節モデルにおけるmicroRNA発現の網羅的解析. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013年10月18日-19日. 千葉.
7. Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E, Kuroda R, Kurosaka M. Profiling microRNA expression in fracture nonunion. 8<sup>th</sup> Combined Meeting of Orthopaedic Research Society. 2013.10.13-16, Venice, Italy.
8. 脇貴洋、李相亮、新倉隆宏、岩倉崇、黒田良祐、黒坂昌弘. 偽関節形成過程にお

けるmicroRNA発現の網羅的解析 . 第121  
回中部日本整形外科災害外科学会・学術  
集会 . 2013年10月3日-4日 . 名古屋 .

9. Waki T, Lee SY, Niikura T, Koga T, Dogaki Y, Okumachi E, Kurosaka M. Potential Role of microRNA in nonunion formation in Rat. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2013.1.26-29, San Antonio, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

李 相亮 (SANG YANG LEE)  
神戸大学医学部附属病院・特定助教  
研究者番号：40533732

##### (2)研究分担者

( )  
該当なし  
研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )  
該当なし  
研究者番号：