

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670666

研究課題名(和文) マイクロRNAと磁気ターゲティングを併用した難治性骨折の治療戦略

研究課題名(英文) The strategy for refractory fracture using the combination of microRNA with magnetic targeting system

研究代表者

越智 光夫(OCHI, MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長

研究者番号：70177244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：偽関節等の難治性骨折はしばしば治療に難渋する。microRNA(miRNA)は様々な生命現象に重要な役割を担っており、疾患の病態にも関与している。本研究は、骨形成を促進するmiRNAを同定し、難治性骨折モデル動物に合成miRNAを磁気ターゲティングと併用することにより骨癒合を促進することを目的とした。ヒト骨髄間葉系幹細胞(hMSC)を骨分化誘導し、分化前後で発現変動するmiRNAを網羅的に解析し、microRNA-222(miR-222)を抑制すると骨分化が促進することがわかった。miR-222 inhibitorを、ラット難治性骨折モデルに局所注射したところ、骨形成が促進されていた。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to achieve bone union for refractory fracture cases with a non-invasive technique. MicroRNAs (miRNAs) are short, non-coding RNAs that act as repressors of gene expression at the level of post transcriptional regulation. The aim of this study was to identify miRNA which play an important role in osteogenesis, and acceleration of bone union by regulating identified miRNA in rat refractory fracture model. miR-222 was identified by microarray analysis during osteogenesis. Inhibition of miR-222 promoted osteogenesis and over-expression of miR-222 inhibited osteogenesis from human mesenchymal stem cells in vitro. miR-222 inhibitor was administered into the fracture site in rat refractory fracture model. Bone union at the fracture site was achieved in the miR-222 inhibitor administration by confirming radiographic and histological evaluation. Local administration of miR-222 inhibitor could accelerate bone healing through enhancing osteogenesis in the rat refractory model.

研究分野：整形外科学、再生医療

キーワード：マイクロRNA 磁気ターゲティング 難治性骨折

1. 研究開始当初の背景

運動器において、偽関節等に至りしばしば治療に難渋する難治性骨折には、これまで有効な治療法は確立していない。miRNA は、約 22 塩基程度の non coding RNA であり、様々な疾患の病態に関与している。さらに近年 miRNA を利用した新たな治療の試みもなされている。当科では、これまで運動器の疾患に、miRNA が関与していることを報告し、様々な動物モデルを用いて合成 miRNA 等の投与による研究を積極的に行っている。さらに、磁性化した細胞を生体内で目的の場所に集積させる磁気ターゲティングを開発・応用している。これらの実績から、骨折治癒に重要な骨形成能・血管新生能を有する miRNA と磁気ターゲティングを用いた難治性骨折の治療を確立する。

2. 研究の目的

(1)骨形成能・血管新生能を有する miRNA を同定すること

ヒト骨髄間葉系幹細胞を骨分化誘導し、分化前後で発現変動する miRNA を網羅的に解析する。有意に発現が変動する miRNA につき、骨分化を促進するかどうか検討する。

これらの miRNA が血管新生能を有するか検討する。

(2)骨形成能・血管新生能を有する miRNA を利用した難治性骨折の治療

骨分化能・血管新生能を有する miRNA について、合成 2 本鎖 miRNA あるいは inhibitor を、ラット難治性骨折モデルに局所注射する。レントゲン、CT 等を用いて骨癒合を評価する。

(3)miRNA と外磁場装置を用いたより効果的な難治性骨折の治療

合成 miRNA あるいは inhibitor と MRI 造影剤であるフェルカルボトランをアテロコラーゲンと混合し、ラット難治性骨折部に局所注射する。外磁場装置を用いて骨折部に集

積させ、拡散することを防ぎ、より効果的な難治性骨折の治療を目指す。

3. 研究の方法

(1)骨形成能と血管新生能を有する miRNA の同定

ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) から骨分化誘導をかけ 2 週間経過した細胞と骨分化誘導をかけていない細胞から RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイを用いて、発現が上昇あるいは減少している miRNA を pick up する。これらの miRNA について、骨分化誘導 1、3、7、14 日での発現を、継時的に real time PCR を用いて解析する。

骨分化誘導において発現が上昇あるいは減少している miRNA について、miRNA mimic あるいは inhibitor を用いて miRNA の過剰発現・発現抑制を行い、その機能を解析する。すなわち、MSC に過剰発現・発現抑制を行い、骨分化が促進されるか、また、血管内皮細胞である HUVEC 細胞に過剰発現・発現抑制を行い、血管形成が促進されるか評価する。骨分化促進の評価は、real time PCR による osteocalcin、RUNX2 等を測定し、アリザリンレッド染色、吸光度計を用いたアルカリフォスファターゼの定量評価を行う。

(2)骨形成能・血管形成能を有する miRNA の mimic あるいは inhibitor を核酸導入用のアテロコラーゲンと混合し、ラット難治性骨折部に局所投与

8 週齢 Sprague-Dawley ラットの大腿骨の中央で骨膜を、電気メスを用いて全周性に焼灼し、髄内に wire を挿入した後、骨折させ難治性骨折モデルとする。対照群として、非機能性の scrambled RNA あるいは scrambled antisense を投与する。投与後、7、14、28、56 日でレントゲンを撮影する。また、56 日目に CT を撮影後、屠殺し、切片を作製し、トルイジンブルー染色等を用いて組

織学的に評価する。さらに、isolectin B4、CD31、VEGF 等の免疫染色を行い、骨形成だけでなく、血管形成の評価も行う。

(3)骨形成能・血管形成能を有する miRNA の mimic あるいは inhibitor を、局所注射後、外磁場装置を用いて骨折部に集積させる。

局所注射のみでは、投与した核酸が、投与部から拡散してしまい、効果が減弱する可能性がある。また、miRNA は、複数の標的遺伝子を持つため、体内に拡散することにより、予期せぬ副作用が生じる可能性がある。これらを防ぐため、MRI 造影剤であるフェルカルボトランと核酸を混合し、投与する。投与後、すぐに外磁場装置を用いて核酸を骨折部に集積させる。投与後、7、14、28、56 日でレントゲンを撮影し、さらに 56 日目に屠殺し、組織学的評価を行う。

4. 研究成果

(1) 骨形成能と血管新生能を有する miRNA の同定

hMSC から骨芽細胞分化において miRNA-222 の発現が有意に低下することがわかった (表 1)。

Downregulation miRNA			Up-regulated miRNA				
Name	Δ CT(MSC)	Δ CT(Osteo) fold change	Name	Δ CT(MSC)	Δ CT(Osteo) fold change		
miR-31	2.209	4.578	0.194	miR-888	4.638	3.591	2.07
miR-222	0.223	2.373	0.222	miR-302a	5.531	3.681	3.61
miR-191	2.919	4.386	0.362	miR-518	13.863	1.495	>10
miR-16	2.893	3.880	0.364	miR-519d	U.D.	0.457	>10
miR-21	2.893	4.025	0.456				
miR-24	0.447	1.578	0.457				

U.D.: undetectable, Osteo.: osteoblast
Control: U6 snRNA, Δ CT=CTsample-CTu6snRNA, fold change= $2^{-\Delta\Delta$ ct} ($\Delta\Delta$ CT= Δ CTosteo- Δ CTMSC)

表 1. ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) と hMSC から分化した骨芽細胞を用いたマイクロアレイの結果。miRNA-222 が骨芽細胞分化後に有意に発現が低下していた。

hMSC からの骨芽細胞分化を誘導すると、miRNA-222 の発現が低下していくことがわかった。また、合成 miRNA-222 を hMSC に強制導入し骨芽細胞分化を誘導すると骨芽細胞分が抑制された。一方で miRNA inhibitor (antisense) を hMSC に導入し、骨芽細胞分化誘導を行うと骨芽細胞分が促進された (図

1、2)。

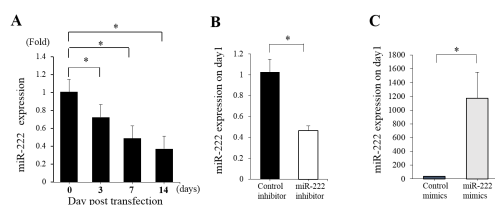


図 1. (A)Real time PCR による miRNA-222 の発現解析。miRNA-222 は、骨芽細胞分化において経時的に発現が低下していた。(B)miRNA-222 inhibitor の効果。hMSC に miRNA-222 inhibitor を導入すると miRNA-222 の発現は有意に低下した。(C)miRNA-222 mimic による miRNA-222 の過剰発現。hMSC に miRNA-222 を強制導入すると、miRNA-222 の発現は有意に増加した。

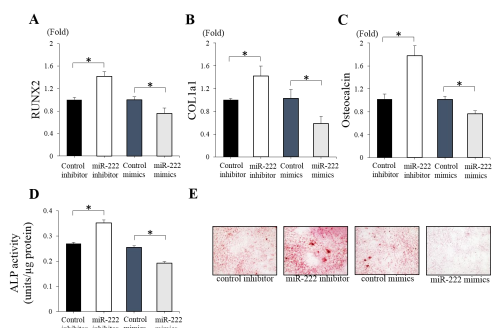


図 2. (A)Real time PCR による RUNX2 の発現解析。(B) Real time PCR による COL1a1 の発現解析。(C) Real time PCR によるオステオカルシンの発現解析。(D) アルカリフォスファターゼ活性の解析。(E) アリザリンレッド染色。

(2) 骨形成能・血管形成能を有する miRNA の mimic あるいは inhibitor のラット難治性骨折部への局所投与の効果

ラットの大腿骨骨幹部を骨折させ、髄腔に鋼線を刺入し固定した後、骨折部の骨膜を焼灼し難治性骨折モデルとした。難治性骨折モデルを作製した直後にアテロコラーゲンと混合した miRNA-222 inhibitor を局所投与した。対照群として非機能性の一本鎖 DNA をアテロコラーゲンと混合して局所投与した。2, 4, 6, 8 週とレントゲンを撮影したところ、miRNA-222 inhibitor を投与した群では骨形成が促進し、8 週では骨癒合していたが、対照群では、仮骨の形成は認めたと骨

癒合はしなかった。8週でのCTにおいても、miRNA-222 inhibitorを投与した群では骨癒合を認めた(図3)。

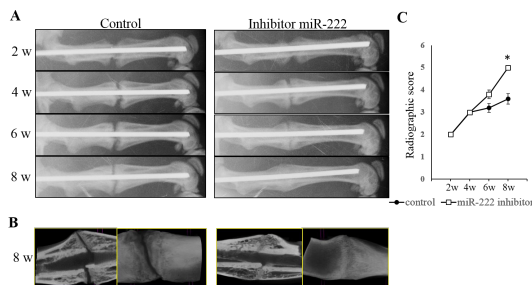


図3.(A)単純レントゲン写真。対照群では8週においても骨癒合が得られていないのに対し、miRNA-222 inhibitorを局所投与した群では、8週で骨癒合を得た。(B)8週におけるCT画像。miRNA-222 inhibitorを局所投与した群では、良好な骨形成を認める。(C)Radiographic score。miRNA-222 inhibitorを局所投与した群では、対照群より有意に高値を示した。

8週での組織標本では、miRNA-222 inhibitorを投与した群において、骨折部の良好な骨形成を認めたのに対し、対照群では、骨折部に癒痕組織を認めた。2週の組織標本にて isolectin B4 の免疫染色を行ったところ、miRNA-222 inhibitorを投与した群では骨折部周辺に良好な血管形成を認めた(図4)。

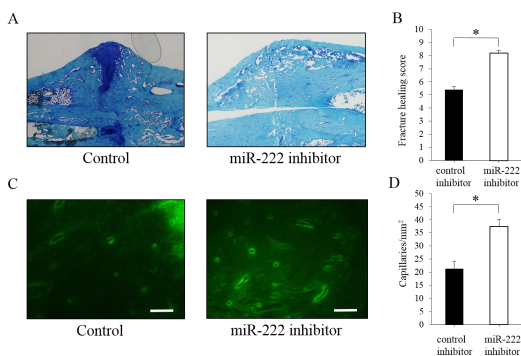


図4.(A)8週でのトルイジンブルー染色。対照群では、骨折部に線維組織と、軟骨様組織を認めるのに対し、miRNA-222 inhibitorを局所投与した群では、良好な骨形成を認める。(B)Fracture healing score。miRNA-222 inhibitorを局所投与した群では、対照群と比較し有意に高値を示した。(C)2週での isolectin B4 染色。miRNA-222 inhibitorを局所投与した群では、良好な血管新生を認める。(D)1mm²あたりの血管数。miRNA-222

inhibitorを局所投与した群では、対照群と比較し有意に多くの血管を認めた。

以上の結果より、難治性骨折部においてmiRNA-222の発現を抑制すると、骨形成および血管新生が促進することがわかった。miRNA-222の骨形成促進作用に関する報告はこれまで報告はなく、本研究により、miRNA-222の新たな機能が明らかとなった。

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3件)

1. 吉塚将昭、中佐智幸、川西啓生、蜂須賀晋、古田太輔、越智光夫
microRNA-222の発現抑制による骨形成促進の検討
第58回日本手外科学会学術集会
2015.4.16-17 京王プラザホテル(東京都新宿区)

2. Masaaki Yoshizuka, Tomoyuki Nakasa, Yoshitaka Kawanishi, Mitsuo Ochi.
Inhibition of microRNA-222 expression accelerates bone fracture healing with enhancement of angiogenesis and osteogenesis in atrophic non-union model in rat.
the 2015 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.
March 28 -31, 2015 at the MGM Grand Hotel, Las Vegas, NV (U.S.A.).

3. 吉塚将昭、中佐智幸、川西啓生、蜂須賀晋、古田太輔、越智光夫
microRNA-222の発現抑制による骨形成促進の検討

第 14 回日本再生医療学会総会

2015.3.19-21 パシフィコ横浜（横浜市西区）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長

研究者番号：7 0 1 7 7 2 4 4

(2)研究分担者

味八木 茂 (MIYAKI SHIGERU)

広島大学・病院・講師

研究者番号：1 0 3 9 2 4 9 0

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・講師

研究者番号：7 0 4 4 4 6 8 5

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：6 0 4 6 7 7 6 9

(平成26年度のみ)

(3)連携研究者

()

研究者番号：