

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16638

研究課題名（和文）エクソソームに着目した変形性関節症における軟骨変性の機序の解明

研究課題名（英文）Exploration of the mechanism(s) of cartilage degeneration in osteoarthritis through the analysis of exosomes in the synovial fluid.

研究代表者

津野 宏隆 (Tsunno, Hirotaka)

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）・リウマチ性疾患研究室・医師

研究者番号：90792135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：変形性関節症（OA）では痛みは最も重要な症状である。近年、疫学研究において滑膜病変がOAの臨床症状である痛みや疾患の進行に関与することが報告されている。しかしながら、多くの研究にもかかわらずOAにおける滑膜病変の本態は不明であり、滑膜病変に伴って痛みが生じる機序もわかっていない。本研究では、疼痛の強いOAと軽快した状態のOA、および人工膝関節置換術を受けたRA患者から採取した関節液中のexosomeを採取し、その中に存在する疼痛関連miRNAの発現を半網羅的に解析することにより、関節液中に存在して疼痛発現に関与する因子の特定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果からOAにおける疼痛の発現に関与するmiRNAが5種見出された。OAの痛みのうちとくに滑膜性の疼痛についてはその発現機序に関して定説はまだないが、これらのmiRNAはその機序を解明する手がかりとなることが期待される。今回の研究ではこのmiRNAがどの組織においてどのような機序で産生されるのか、それらのmiRNAがどのように痛みの発現に関与するのかの検討は行っていない。これらについては今後改めて研究費を獲得し検討を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：Although pain is the most critical symptom of osteoarthritis (OA). Recent epidemiological studies have shown that the synovial pathology is closely related to pain in OA knees. However, the mechanisms underlying synovial pathology in OA has not yet been clarified, and the same is true for the reasons why pain is associated with the synovial pathology. In this study, we focused on miRNA involved in the pain in OA knees. To that end, synovial fluid (SF) samples were collected from OA knees twice at the peak of pain and after the remission of pain, and exosomes were obtained from these SF samples. miRNA was extracted from the exosomes and the miRNAs related to pain were analyzed by qPCR analyses. The results were compared between the SF samples from respective knees, and miRNA was determined the concentrations of which differed significantly between the two points of time. In results, a total of 5 miRNAs were found which could be related to pain in OA knee joints.

研究分野：整形外科学関節疾患

キーワード：変形性関節症 痛み エクソソーム miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

OA は我が国で最も頻度の高い関節疾患であるが、その病態にはまだ不明の点が多い。OA では軟骨だけでなく、滑膜にも明らかな変化が生じる。近年、様々な研究者によって滑膜の変化が軟骨の変性と密接に関連しており、滑膜炎の強い症例ほど関節裂隙の狭小化が進みやすいことが相次いで報告されている (Ayril X, et al. Osteoarthritis Cartilage 2005; PelletierJP, et al. Osteoarthritis Cartilage 2008; Roemere FW, et al. Ann Rheum Dis 2011; Bastick AN, et al. Clin Orthop Relat Res 2015; Atukorala I, et al. Ann Rheum Dis 2016)。また、関節水腫、滑膜炎の存在が膝 OA の痛みと関連するという報告も多い (Fernandez-Madrid, et al. Magn Reson Imaging 1994; Heyes, et al., Radiology 2005; Kornaat et al., Radiology 2006; Torres, et al., Osteoarthritis Cartilage 2006; Hill CL, et al. Ann Rheum Dis 2007; Lo, et al., Osteoarthritis Cartilage 2009; Baker K, et al. Ann Rheum Dis 2010; Zhang Y, et al. Arthritis Rheum 2011; Ishijima M, et al. Arthritis Res Ther 2011; Scanzello CR, et al. Arthritis Rheum 2011; Sowers M, et al. J Bone Joint Surg 93A, 2011; Zhang Y, et al. Arthritis Rheum 2011; Crema MD, et al. Osteoarthritis Cartilage 2013; de Lange-Brokaar BJE, et al. Arthritis Rheum 2015; Sarmanova A, et al. Osteoarthritis Cartilage 2016; Chiba D, et al. Arthritis Res Ther 2016)。これらの背景から痛みや滑膜炎に伴って OA の症状が進行するとすれば、滑膜から何らかの因子が関節液中に放出され、OA の疼痛発現や軟骨変性を引き起こしている可能性が考えられる。しかしながら関節液中のどのような因子がその作用を持つのかは明らかになっていない。本研究では疼痛の強い OA と軽快した状態の OA、および人工膝関節置換術を受けた RA 患者からの関節液中のエクソソームを解析することで滑膜に由来する軟骨変性促進因子の特定を試みる。本研究でエクソソームに着目するのは以下のような背景による。血液や体液中にはエクソソームと呼ばれる 40-100nm の膜小胞が存在し、その内部には種々のタンパクや miRNA を含む non-coding RNA (ncRNA) といった核酸が含まれていることが報告されている (Simpson RJ, et al. Proteomics. 2008)。miRNA とはタンパク質をコードしていない 19-22 塩基の ncRNA で細胞内 RNA の約 0.01% を占めており、miRNA 発現は転写因子で調節され、標的 mRNA を分解し、発現を抑制あるいは標的 mRNA からのタンパクへの翻訳を阻害するため、ヒト遺伝子の約 60% は miRNA による制御下にあるとされている。エクソソームは細胞から分泌されたあとその一部が目的の細胞に取り込まれるが、その際、内部に含まれる miRNA やタンパクによって取り込まれた細胞の挙動を変化させると考えられている (Waldenström A, et al. PLoS. One. 2012; Witwer KW, et al. J Extracell Vesicles 2013)。そして OA や RA において関節液中のエクソソームは、滑膜や軟骨細胞から直接的に放出されている可能性がある (Malda J, et al. Nat Rev Rheumatol. 2016)。したがって滑膜で産生されたエクソソームが関節軟骨中の軟骨細胞の挙動に影響を与えたとしても不思議ではない。実際、IL-1 $\beta$  で刺激された線維芽細胞様滑膜細胞が産生するエクソソームが軟骨細胞において MMP-13 の発現を増加させること (Kato T, et al. Arthritis Res Ther. 2014)、エクソソームに含まれる特定の miRNA が軟骨細胞に対して MMP-13 の発現を増加させること (Iliopoulos D, et al. PLoS ONE 2008) が報告されている。RA は関節疾患の一つで滑膜が異常増殖することで関節の軟骨・骨破壊が起こる結果、関節変形・強直が生じる原因不明の炎症性疾患である。エクソソームの研究は従来 OA より RA について多くなされており、リウマチ患者から採取した線維芽細胞様滑膜細胞が産生するエクソソームには TNF- $\alpha$  が含まれており、TNF- $\alpha$  感受性のある細胞に対し傷害性をもつこと (Uttenreuther-Fischer MM, et al. J Immunol. 2006)、またリウマチの線維芽細胞用滑膜細胞からケモカインやサイトカインを含むエクソソームが放出され、これが滑膜の病態に関与している可能性 (Berckmans RJ, et al. Arthritis Res Ther. 2005) などが報告されている。一方、OA については関節液中のエクソソームの解析の報告は稀であり、関節液中のエクソソームが軟骨細胞の挙動を制御している可能性についてはほとんど検討されていない。本研究は以上のような背景に基づいて行われた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、エクソソームという比較的新しい生命現象をキーワードとして、疼痛の強い OA と軽快した状態の OA、および人工膝関節置換術を受けた RA 患者から採取した関節液中の exosome について、その中に存在する疼痛関連 miRNA の発現を半網羅的に解析することにより、関節液中に存在して疼痛発現に関与する因子を特定することであった。

## 3. 研究の方法

当初の計画では Exoquick™ (System Biosciences) を用いてエクソソームを回収し、外部に受託し LC-MS/MS を用いてタンパクを同定する予定であったが、予算的に困難が生じたため、計画を修正し、関節液について miRNA の網羅的解析を行うことで OA の疼痛発現に関与する可能性のある因子を特定し、さらに滑膜組織を用いて特定された miRNA が疼痛発現に関与する機序に関して検討を行った。

### A) 関節液の収集

A) OA 例の関節液は外来で保存的に治療された膝 OA の症例より治療上必要があつて除去さ

れたもののうち、疼痛の強い時期（P-OA）とその後に疼痛が軽快した時期（NP-OA）の2時点で同一の膝関節より採取された関節液 8 組を選択して解析に用いた。P-OA、NP - OA の判断基準は WOMAC の痛みスコアが 12 点以上改善したこと、P-OA を採取した時点の前後 6-10 カ月の間に単純レントゲン上、関節裂隙の狭小化が 1 mm 以上進行したこと、MRI で Bone Marrow Lesion の関与がないこととした。

RA 例からの関節液は人工膝関節置換術（TKA）の際に採取された関節液 8 症例 8 関節を解析した。

**B) エクソソームに含まれる miRNA の解析**

関節液中に含まれる miRNA の解析では、まず関節液中に含まれる exosome を採取し、次にそこに含まれる miRNA を解析した。抽出には miRCURY™ RNA Isolation Kit (Exiqon) を用い、抽出された miRNA を約 90 種の疼痛に関連する因子を探索できる miScript miRNA PCR Array™ (Qiagen) によって半網羅的・定量的に解析した。その結果から P-OA と NP - OA の間で発現量に有意差があった miRNA を OA の疼痛に関与しうる miRNA の候補と考え、さらに、その発現量を RA と OA で比較した。

**C) 候補因子の選択**

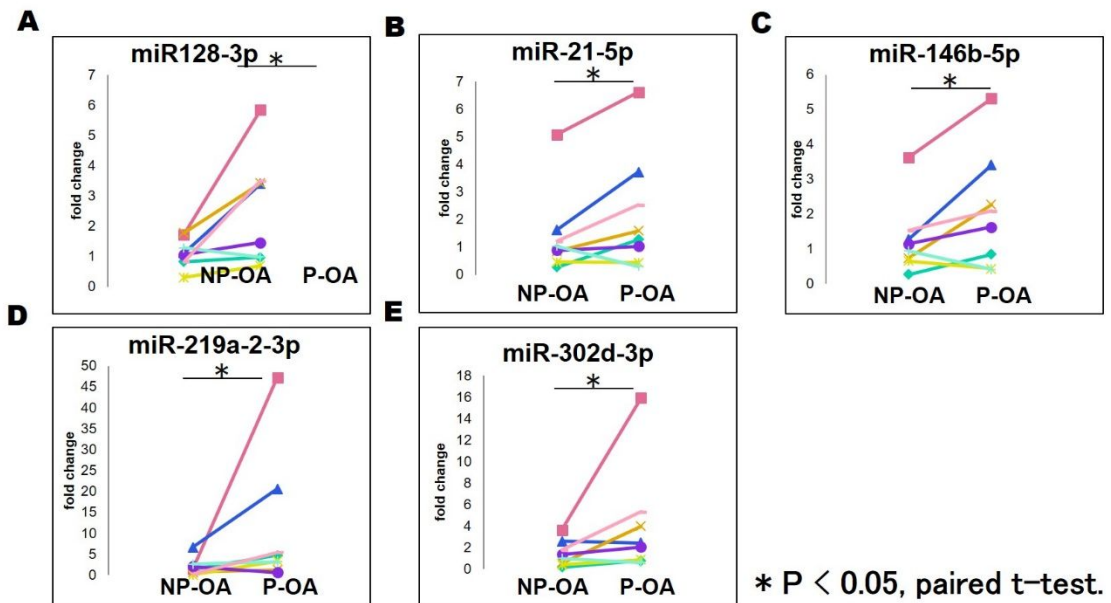
実際に着目する miRNA は、上記の解析に加え文献情報やオンラインで無償でのアクセスが可能なデータベースの情報なども活用した。

**D) 滑膜組織の検討**

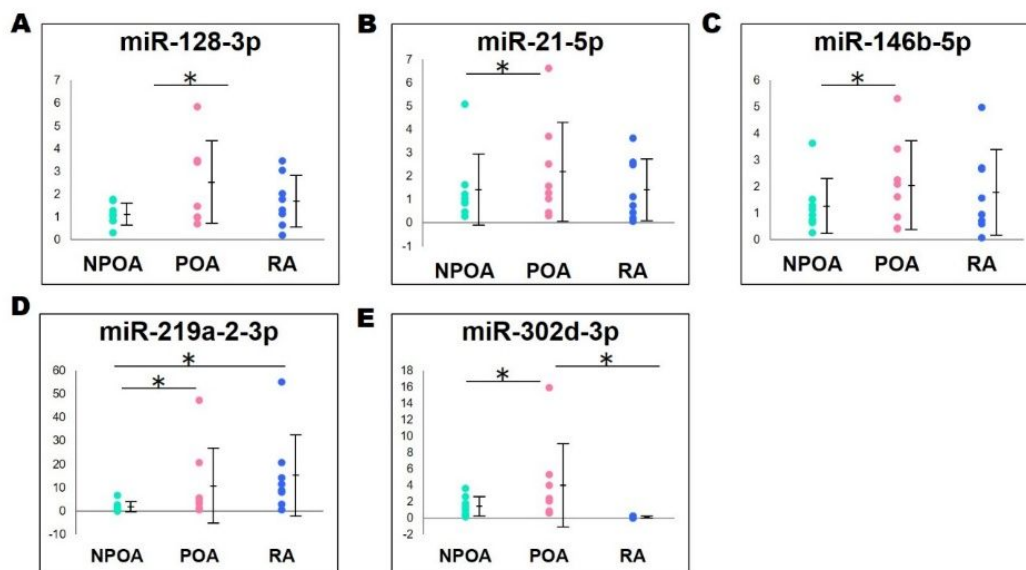
人工関節置換が行われた末期の膝 OA 35 症例と関節リウマチ 25 症例より滑膜を採取した。滑膜組織より miRNA と mRNA を miRNeasy Mini kit (QIAGEN) と RNA Mini kit (Thermo Fisher) を用いて抽出した。上記 C) までの実験で選択された候補因子について滑膜組織中の miRNA の発現を検討した。また、OA で疼痛に関与していると思われる遺伝子について OA 滑膜と RA 滑膜で遺伝子発現を定量的に解析し、比較検討した。

**4. 研究成果**

OA 関節液について、P-OA と NP-OA を比較解析した結果、miR-128-3p、miR-21-5p、miR-146b-5p、miR-219a-2-3p、miR-302d-3p の 5 つの miRNA が NP-OA に比して P-OA で有意に発現量が亢進していることが明らかとなった（下図参照）。



RA 例からの関節液と比較したところ、5 つの miRNA のうち、miR-219a-2-3p が NP-OA に比して RA で有意に発現量が多く、また miR-302d-3p が P-OA に比して RA で発現量が有意に少ないという結果が得られた。

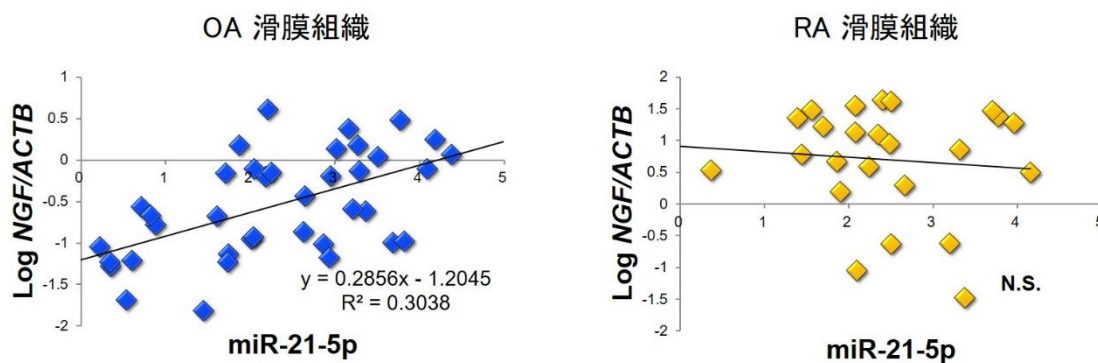


\* P < 0.05, one-way ANOVA and Fisher's PLSD test

P-OA と NP-OA の比較では上述のように5つの miRNA が濃度に有意差があるものとして見いだされたが、このうち miR-21 については、OA における疼痛発現において重要な役割をはたす因子として近年注目されている神経成長因子 (NGF) との関与が示唆されており、miR-21-5p が NGF シグナルを抑制する因子の発現を抑制することや miR-21 は NGF シグナルをポジティブに制御している可能性が報告されている (Steven M., et al. JBC. 2011, Enrica M., et al. Neuromol Med. 2014)。このため miR-21-5p についてさらに滑膜組織による検討を行った。

OA 症例及び RA 症例の滑膜組織から total RNA と miRNA を抽出して qPCR による解析を行ったところ、

OA 滑膜では miR-21 と NGF の発現レベルは有意な正の相関を示したが、RA 滑膜では miR-21 と NGF の発現レベルの間に有意の相関関係は認められなかった。



今回の結果から、OA 関節液中のエクソソームに存在している miR-21 が OA 疼痛発現に関与している可能性が考えられた。また、本研究結果より OA 滑膜における疼痛発現の機序は RA とは異なっている可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka N, Tsuno H, Ohashi S, Iwasawa M, Furukawa H, Kato T, Fukui N.	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 The attenuation of insulin-like growth factor signaling may be responsible for relative reduction in matrix synthesis in degenerated areas of osteoarthritic cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord .	6. 最初と最後の頁 231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-021-04096-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hashimoto A, Kawasaki Y, Tominaga A, Kakutani T, Kodama K, Nogi S, Tsuno H, Ogihara H, Nunokawa T, Ikenaka T, Watai K, Saito I, Matsui T.	4. 巻 26(5)
2. 論文標題 Squamous Cell Lung Cancer: Methotrexate Withdrawal Induced Spontaneous Regression of Liver Metastases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 e137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/RHU.0000000000001010.	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 Kakutani T, Hashimoto A, Tominaga A, Kodama K, Nogi S, Tsuno H, Ogihara H, Nunokawa T, Komiya A, Furukawa H, Tohma S, Matsui T.	4. 巻 30(3)
2. 論文標題 Related Factors, Increased Mortality and Causes of Death in Patients With Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 458-464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1621462.	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 Tsuno H, Arito M, Suematsu N, Sato T, Hashimoto A, Matsui T, Omoteyama K, Sato M, Okamoto K, Tohma S, Kurokawa M, Kato T	4. 巻 2
2. 論文標題 A proteomic analysis of serum-derived exosomes in rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Rheumatology	6. 最初と最後の頁 35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41927-018-0041-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野 裕介, 荻原 秀樹, 富永 晃都, 児玉 華子, 野木 真一, 津野 宏隆, 小宮 明子, 松井 利浩
2. 発表標題 呼吸困難で発症し、PR3-ANCA異常高値と蛋白尿を認めた血管内大細胞型B細胞リンパ腫の一例
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井 尚志, 田中 信帆, 津野 宏隆, 大橋 暁, 岩澤 三康, 古川 宏
2. 発表標題 変形性関節症における滑膜病変
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 信帆, 津野 宏隆, 大橋 暁, 岩澤 三康, 福井 尚志
2. 発表標題 タンパク分解酵素の活性化に着目した変形性膝関節症における軟骨の変性機序の検討
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆, 田中 信帆, 大橋 暁, 岩澤 三康, 松井 利浩, 福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症および関節リウマチに罹患した軟骨から荷重によって遊離する因子の網羅的解析
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野木 真一, 富永 晃都, 堀江 孝一郎, 児玉 華子, 岩田 加奈子, 津野 宏隆, 萩原 秀樹, 小宮 明子, 松井 利浩
2. 発表標題 当院で測定した全インターフェロン (T-SPOT) 検査の陽性率経時変化及びリウマチ科内での陽性者の対応及び結核発症の予後に関する検討
3. 学会等名 第64回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福井尚志、田中信帆、津野宏隆、大橋 暁、岩澤三康
2. 発表標題 変形性関節症の病態に関する最近の理解ー痛みと疾患進行のメカニズムを中心にー
3. 学会等名 第35回 日本整形外科基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆, 田中 信帆, 大橋 暁, 岩澤 三康, 福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症に罹患した軟骨によって遊離する因子の網羅的解析
3. 学会等名 第74回国立病院総合医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野木 真一、澤田 崇幸、矢野 裕介、児玉 華子、岩田 香奈子、津野 宏隆、萩原 秀樹、小宮 明子、松井 利浩
2. 発表標題 関節リウマチ診療において好中球表面CD64発現増加が結核症診断に有用であった3症例
3. 学会等名 第74回国立病院総合医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 信帆、津野 宏隆、大橋 暁、岩澤 三康、田代 俊之、桂川 陽三、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症における軟骨の変性・消失にはプラスミンが関与している可能性がある
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆、田中 信帆、大橋 暁、岩澤 三康、福井 尚志
2. 発表標題 変形性関節症に罹患した軟骨より荷重によって遊離する因子の網羅的解析
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 津野 宏隆、田中 信帆、大橋 暁、岩澤 三康、松井 利浩、福井 尚志
2. 発表標題 関節リウマチ（RA）と変形性関節症（OA）における疼痛に関与しうるmiRNAの検討-関節液中のexosomeに含まれるmiRNAの解析結果から-
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野木 真一、富永 晃人、堀江 孝一郎、角谷 拓哉、児玉 華子、岩田 香奈子、津野 宏隆、布川 貴博、荻原 秀樹、小宮 明子、橋本 篤、松井 利浩、當間 重人
2. 発表標題 関節リウマチ患者における7年後の筋肉量変化に及ぼす因子解析
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 田中信帆、津野宏隆、大橋 暁、岩澤三康、田代俊之、桂川陽三、福井尚志
2. 発表標題 変形性関節症における疼痛に関与しうるmiRNAの検討
3. 学会等名 第32回軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 津野宏隆、田中信帆、大橋暁、岩澤三康、松井利浩、福井尚志
2. 発表標題 関節リウマチ（RA）と変形性関節症（OA）における疼痛に関与しうるmiRNAの検討-関節液中のexosomeに含まれる解析結果から-
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 布川 貴博，富永 晃都，角谷 拓哉，児玉 華子，野木 真一，津野 宏隆，荻原 秀樹，橋本 篤，松井 利浩，當間 重人
2. 発表標題 関節リウマチにおけるサラソスルファピリジンのニューモシスチス肺炎予防効果
3. 学会等名 第72回国立病院総合学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野木 真一，周藤 詩織，堀江 孝一郎，岩田 香奈子，津野 宏隆，荻原 秀樹，橋本 篤，松井 利浩，當間 重人
2. 発表標題 悪性関節リウマチによる難治性下腿潰瘍にIVIg療法が著効した2例
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河崎 裕一郎, 富永 晃都, 児玉 華子, 津野 宏隆, 布川 貴博, 池中 達央, 渡井 健太郎, 橋本 篤, 松井 利浩
2. 発表標題 メトトレキサートの中止により多発肝転移を伴う肺癌が消失した関節リウマチの1例
3. 学会等名 第64回日本内科学会関東地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 篤, 野木 真一, 津野 宏隆, 荻原 秀樹, 布川 貴博, 松井 利浩, 當間 重人
2. 発表標題 エルデカルシトール投与中の膠原病リウマチ性疾患患者における高カルシウム尿症の検討
3. 学会等名 第29回日本リウマチ学会 関東支部学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------