

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10443

研究課題名(和文) microRNAをターゲットとした新規骨再生療法の開発

研究課題名(英文) Novel strategy for bone regeneration using micro RNA

研究代表者

大江 啓介 (Oe, Keisuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20514623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット大腿骨骨折モデルを用いて、骨折部のmiRNAを採取し、マイクロアレイおよびreal-time PCR解析を行い、「血管新生に関連するmiRNA」としてmiR-126a-3pとmiR-146a-5pを選定した。これらmiRNAが生体内で血管新生の制御を介し、骨折治癒を促進させるかを検証するため、ラット大腿骨偽関節モデルを用いた動物実験を行った。偽関節作製後、miR-126a-3pもしくはmiR-146a-5pに対応するanti-miRNA oligonucleotideを偽関節部に局所投与し、投与8週後にX線学的評価・組織学的評価を行ったが、両治療群とも骨折治癒促進効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：After creating a closed femoral fracture model in rats, miRNA was extracted from the newly generated tissue at the fracture site. Microarray and real-time PCR analyses were performed with miRNA samples. From the results, we selected two angiogenesis-related miRNAs, miR-126a-3p and miR-146a-5p. We next investigated whether local administration of anti-miRNA oligonucleotides of miR-126a-3p or miR-146a-5p into the fracture site could achieve bone union in a rat refractory femur fracture model. Radiological and histological assessments revealed that these treatments did not lead to successful bone union at week 8.

研究分野：整形外科学

キーワード：microRNA 骨再生 骨折 偽関節 血管新生

1. 研究開始当初の背景

骨折は、わが国での年間罹患患者が非常に多い代表的な外傷性疾患であり、患者の日常生活動作を妨げ、生活の質を著しく低下させる。高齢化社会を迎えている我が国では、骨粗鬆症患者の増加に伴い、骨折患者が今後、増加していくことが考えられる。一方、全骨折の約5%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が多く、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し、後遺症に苦しむことも少なくない。従って、このような難治骨折を確実に早期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。

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、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報告されており、治療への応用も期待されている。整形外科領域においても、関節リウマチや関節変性疾患におけるmiRNAの関与も報告されており、骨折の治癒過程においてもmiRNAが重要な役割を果たしていることが示唆されている。

一方、骨折を起こすと局所の血行が絶たれ、骨折部周辺は虚血状態に陥る。その後時間経過と共に新たな血行が再構築され、それとともに骨形成(再生)すなわち骨折治癒が進んでいく。骨癒合不全・偽関節といった骨癒合不全例においては、局所血流不全が必ず存在すると考えられており、近年、血管再生を介した骨再生・骨折治癒促進療法が注目されている。我々は、血管新生・再生に関与するmiRNAを偽関節部や骨欠損部に局所投与すれば、骨再生・血管新生が促進され、有望な骨

再生療法・骨折治癒促進療法となりうると仮説を立て、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、骨折治癒過程において重要な役割を果たしていると予想される「血管新生に関連するmiRNA」を、ラット大腿骨閉鎖性骨折モデルを用いて、マイクロアレイ・real-time PCRの手法により同定することである。第二の目的は、同定したmiRNAをターゲットとした骨癒合促進・血管新生療法を動物実験にて行い、その効果を検証することである。本研究により、骨折治癒の新たなメカニズムの解明の一助となること、miRNAを用いた骨折治癒促進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

まず、ラット大腿骨閉鎖性骨折モデルにおける骨折部でのmiRNAの発現をマイクロアレイにて網羅的に解析した。骨折モデルには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。比較対象として健常の大腿骨よりmiRNAを採取した。骨折作成後5・11・14日目に、骨折部の組織を採取し、miRNA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、健常大腿骨と比べ、発現量が著明な差を認めたmiRNAを候補として抽出した。この中から、血管新生に関与したmiRNAと過去に報告のあるものを、pubmedを用い検索し、5つのmiRNAを選定し、real-time PCRにてこれらmiRNAの骨折部での発現様式を解析した。これら一連の解析により、骨折治癒過程において重要な役割を果たしていると予想される「血管新生に関連するmiRNA」を2つ同定した。

次に、これら2つのmiRNAが実際に、生体内の骨折部で血管新生の制御を介し、骨折治

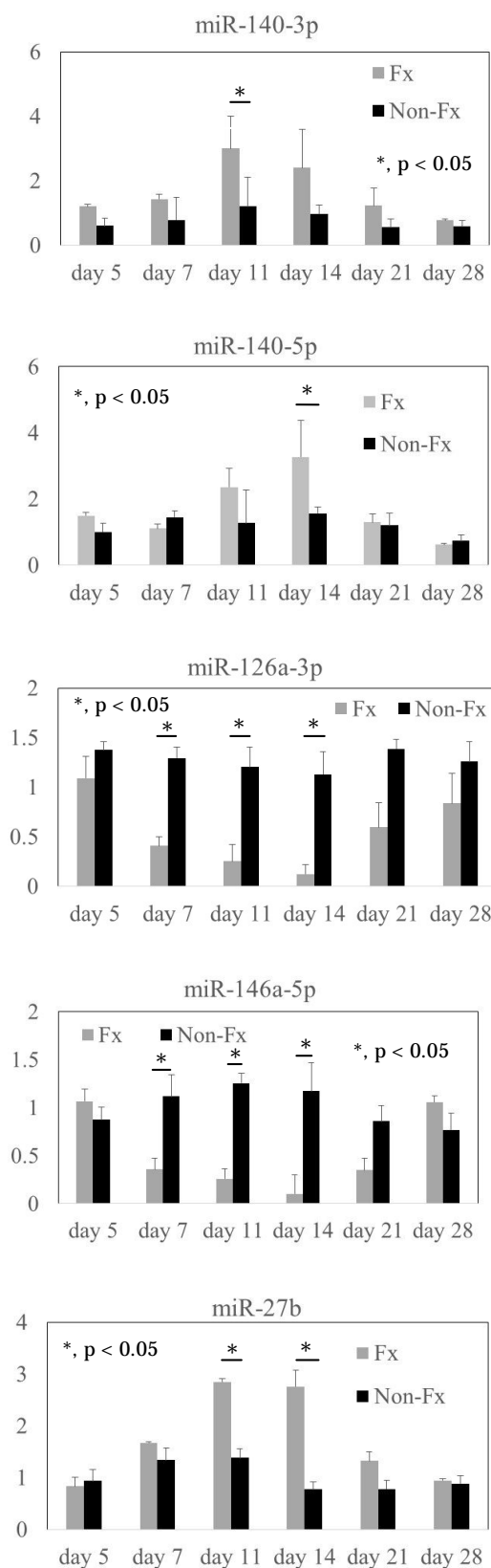
癒を促進させるかを検証するため、ラットの偽関節に対する miRNA の移植実験を行った。偽関節モデルには、ラット大腿骨偽関節モデルを用いた。このモデルは、大腿骨を髓内釘固定した後に大腿骨骨幹部に骨折を作成した後、骨折局所を切開・展開し、周囲軟部組織を剥離、骨膜を焼灼することで骨折が治癒に至らなくなり、放置すると偽関節となるモデルである。これらのモデルを作製後、アテロコラーゲンを担体として、同定した2つの miRNA に対応した anti-miRNA oligonucleotide を骨折部に局所投与した。対照として、コントロール siRNA を骨折部に局所投与した。8 週後にドップラー計による下肢の血流評価、X 線学的評価、組織学的評価を行い、対照群に比べ、局所の血流は改善しているか、偽関節部の骨性癒合・骨再生が起きているかを検討した。

4. 研究成果

骨折後 5・11・14 日目の骨折部の組織から抽出した miRNA に対して、727 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。発現量比が 2 以上もしくは 0.5 以下であった miRNA は全部で 43 個認めた。これら miRNA のうち、pubmed を用いて "angiogenesis (血管新生)" に関連する miRNA の報告がある全ての英文論文を調べた結果、「骨折部における血管新生に関連する miRNA」の候補として、miR-140-3p・miR-140-5p・miR-126a-3p・miR-146a-5p・miR-27b の 5 つを選定した。

マイクロアレイの結果の validation、および骨折後 5・7・11・14・21・28 日目の経時的な発現の挙動を調べるため、real-time PCR による解析を行った。miR-140-3p は骨折後 11 日目に、miR-140-5p は骨折後 14 日目に、miR-27b は骨折後 11・14 日目に、健常大腿骨と比べ骨折部で有意な発現増強を認めた ($p < 0.05$) (図 1)。miR-126a-3p および miR-146a-5p は、骨折後 7・11・14 日目に、健常大腿骨と

図 1 Real-time PCR



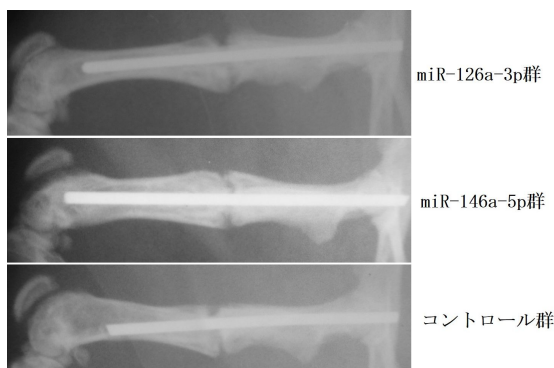
比べ骨折部で有意な発現低下を認めた ($p < 0.05$) (図 1)。骨折部での miRNA 発現の経時的变化については、miR-140-3p および

miR-27b は骨折後 11 日目に、miR-140-5p は骨折後 14 日目に増加のピークを示す挙動を示した (図 1)。miR-126a-3p および miR-146a-5p は、骨折後 14 日に減少のピークを示す挙動を示した (図 1)。

Real-time PCR の結果を基に、過去の英文論文による報告を pubmed にて詳細に検討した結果、miR-126a-3p および miR-146a-5p が血管新生に重要な因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) と stromal-cell derived factor 1 (SDF-1) を制御するという報告が多数なされていることを見出した。miR-126a-3p・miR-146a-5 を骨折治癒過程において重要な役割を果たしていると予想される「血管新生に関連する miRNA」として選定し、動物実験を行うこととした。

12 週齢の雄の Sprague-Dawley ラットに対し偽関節を作製後、miR-126a-3p もしくは miR-146a-5p に対応する anti-miRNA oligonucleotide (miScript miRNA inhibitor; QIAGEN 社) を偽関節部に局所投与した。濃度は過去の研究報告を参考に、アテロコラーゲン 30 μ l 中に 15 μ g の anti-miRNA oligonucleotide を溶かし、全量局所投与した。偽関節作製後 8 週後に X 線学的評価を行ったが、miR-126a-3 群・miR-146a-5p 群・コントロール群のいずれにおいても偽関節部の骨性架橋は認めなかった (図 2)。

図 2 X 線画像

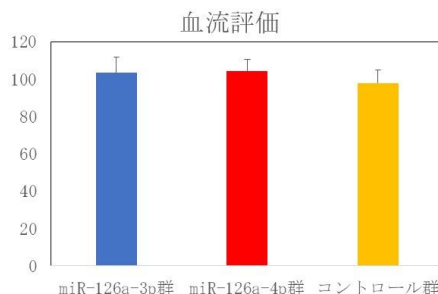


偽関節作製後 8 週後に組織学的評価を行ったが、X 線学的評価と同様に三群とも組織学

的な骨癒合は認めなかった。

偽関節作製 8 週後にドップラー計による下肢の血流評価を行ったが、三群間で患肢の血流量の有意差は認めなかった (図 3)。

図 3 血流評価



いずれの治療群でも有意な効果は認めなかったため、anti-miRNA oligonucleotide の濃度を増加させ、再度動物実験を行った。偽関節モデルを作製後、アテロコラーゲン 30 μ l 中に 30 μ g の anti-miRNA oligonucleotide を溶かし、局所投与した。しかしながら、偽関節作製 8 週後において、いずれの評価項目においても三群間に有意な差は認めなかった。

以上より、本研究における投与濃度においては、miR-126a-3p もしくは miR-146a-5p に対応する anti-miRNA oligonucleotide の局所投与で、予想された骨癒合促進・血管新生作用は認められなかった。今後は、濃度のさらなる増量や miRNA inhibitor の種類の変更などを行い、miR-126a-3p inhibitor・miR-146a-5p inhibitor の局所投与による偽関節部の骨癒合促進・血管新生効果につきさらに検討していく予定である。

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 3 件)

Takahara S, Lee SY, Iwakura T, Oe K, Fukui T, Okumachi E, Waki T, Arakura M, Sakai Y, Nishida K, Kuroda R, Niikura T. Altered expression of microRNA during fracture healing in diabetic rats. Bone Joint Res. 2017;7(2):139-47. 査読あり. DOI:10.1302/2046-3758.72.BJR-2017-0082.R1.

Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T,

Dogaki Y, Okumachi E, Oe K, Kuroda R, Kurosaka M. Profiling microRNA expression during fracture healing. BMC Musculoskelet Disord. 2016;17:83. 査読あり

DOI: 10.1186/s12891-016-0931-0.

Waki T, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Okumachi E, Kuroda R, Kurosaka M. Profiling microRNA expression in fracture nonunions: Potential role of microRNAs in nonunion formation studied in a rat model. Bone Joint J. 2015 ;97-B(8):1144-51. 査読あり . DOI: 10.1302/0301-620X.97B8.34966.

〔学会発表〕(計4件)

Takahara S, Lee SY, Niikura T, Oe K, Fukui T, Arakura M, Sakai Y, Kuroda R. Analysis of MiRNA Expression Profiles during Fracture Healing in Rats with Diabetes. Annual meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会). 2018年3月10 - 13日 New Orleans, USA.

高原俊介、李相亮、新倉隆宏、大江啓介、福井友章、新倉路生、黒岩祐、隈部洋平、酒井良忠、黒田良祐。骨折治癒過程における microRNA の発現：糖尿病・健常ラット間の比較検討。第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会。2017 年 10 月 26 日 - 27 日。沖縄県宜野湾市。

Takahara S, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Waki T, Arakura M, Sakai Y, Kuroda R, Kurosaka M. Analysis of MiRNA Expression Profiles during Fracture Healing in Rats with Diabetes. Annual meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)。2016 年 3 月 5 - 8 日。Orlando, USA.

高原俊介、李相亮、新倉隆宏、岩倉崇、奥町悦子、脇貴洋、新倉路生、酒井良忠、黒坂昌弘。糖尿病ラットの骨折治癒過程における microRNA 発現の解析。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。富山県富山市。

〔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

大江 啓介(OE, Keisuke)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20514623

(2)研究分担者

新倉 隆宏(NIIKURA, Takahiro)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40448171

李 相亮(LEE, Sang Yang)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号：40533732

岩倉 崇(IWAKURA, Takashi)
神戸大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：60437473

福井 友章(FUKUI, Tomoaki)
神戸大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50437688