

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20022

研究課題名(和文)変形性関節症において関節液中に存在し軟骨変性を誘導する因子の探索

研究課題名(英文)Exploration of possible catabolic factors in synovial fluid through protein and micro RNA analyses.

研究代表者

田中 信帆(Tanaka, Nobuho)

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)・政策医療企画部・研究員

研究者番号：60530920

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)：本研究では関節液中に存在し軟骨変性を誘導する因子を探るために、関節裂隙狭小化が進行している膝関節と狭小化が生じていない膝関節から得た関節液を比較検討した。初年度は進行例と非進行例からの各16検体についてタンパク解析を行った結果、MMP-1とMMP-3の濃度が進行群で有意に高いことが明らかになった。第二年度には関節液中に存在するエクソソームのmiRNAを解析した結果、進行群でmiR-21とmiR-150の濃度が有意に低いという結果が得られ、同じ32例のOA関節から滑膜組織を解析した結果、MMP-1、3とmiR-21、miR-26a、miR-150の発現の間に有意な負の相関があることが確認された。

研究成果の概要(英文)：In year 2015, we compared concentrations of 28 proteins between 16 SFs from the progressors (P-SFs) and other 16 SFs from non-progressors (NP-SFs) using Luminex. This analysis revealed that the P-SFs contain MMP-1 and MMP-3 at significantly higher concentrations compared with the NP-SFs. In year 2016, we compared miRNA profiles between the P-SFs and NP-SFs. In results, we found that the concentrations of miR-21 and miR-150 were significantly higher in the P-SFs. We next investigated relationship in concentration between the above two miRNAs and two MMPs, and found that the concentration of miR-21 or miR-150 was inversely correlated with that of MMP-1 or MMP-3. We then investigated expression of these miRNAs and MMPs in OA cartilage and synovial tissues, and found inverse correlation between the expression of either MMP and miR-21 or miR-150 in synovium. Further analyses will be conducted in future as to the origins and relationships of these miRNAs and MMPs.

研究分野：関節病学

キーワード：変形性関節症 関節炎 エクソソーム 関節液 miRNA 滑膜

## 1. 研究開始当初の背景

(1)変形性関節症(以下 OA)では軟骨細胞自身がタンパク分解酵素を産生するようになり軟骨基質の変性・消失が引き起こされる。OA 軟骨では実際に複数の MMP や aggrecanase、cathepsin といったタンパク分解酵素の発現が亢進しており、また urokinase などタンパク分解酵素の活性化に關与する因子の発現も亢進している (Aigner T, et al. Arthritis Rheum 2001; Dejica VM, et al. Am J Pathol 2008)。しかし OA 軟骨においてこれらの酵素の発現がどのような機序によって誘導されるのかは、様々な研究がなされているにもかかわらず、まだ明らかになっていない。近年の臨床研究の結果は OA においても滑膜病変が軟骨の変性消失と密接に關連することを示しており、滑膜病変は軟骨変性を考える上で極めて重要な手掛かりとなると考えられる (Ayril X, et al. Osteoarthritis Cartilage 2005; Pelletier JP, et al. Osteoarthritis Cartilage 2008; Roemere FW, et al. Ann Rheum Dis 2011)。滑膜病変に伴って軟骨変性が進むとすれば、滑膜から何らかの因子が關節液中に放出され、これが基質中の軟骨細胞に作用して種々のタンパク分解酵素の発現を誘導し、さらにタンパク分解酵素を活性化して軟骨基質の変性を引き起こす可能性が考えられる。しかし關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。

本研究ではエクソソームに着目して滑膜病変と軟骨変性のリンクは何かを探った。本研究でエクソソームに着目したのは以下のような背景による。最近の研究から血液や關節液などの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核酸、とくに non-coding RNA (ncRNA) や mRNA が含まれていることがわかってきた (Simpson RJ, et al. Proteomics. 2008)。エクソソームは膜小胞からなる小胞体であり、細胞膜と容易に融合し

てその内部のタンパクや RNA を融合した細胞の内部へと注入する。その結果エクソソームが融合した細胞には挙動の変化が生じる。実際、OA の病態でもエクソソームが重要な役割を果たしている可能性が示されている。T 細胞や単球から放出されるエクソソームにより滑膜細胞に複数の MMP の産生が誘導されることが報告されている (Anderson HC, et al. Lab Invest. 2010)。また線維芽細胞ではエクソソームに含まれるタンパクによって MMP-1 の活性化が引き起こされることも知られている (Chavez-Muñoz C, et al. J Cell Biochem. 2008)。エクソソームに含まれる ncRNA には micro RNA (miRNA) も含まれるが、特定の miRNA が軟骨細胞に対して MMP-13 の発現を増加させるとする報告もある (Iliopoulos D, et al. PLoS ONE 2008)。これらの知見から關節液中に存在するエクソソームが軟骨細胞に対して複数のタンパク分解酵素の発現を誘導し、活性化を引き起こす可能性が考えられた。本研究でエクソソームに着目するもう一つの根拠が軟骨細胞における Toll-like receptor (TLR) の關与の可能性である。TLR は自然免疫を司る受容体として知られるが、ヒトの關節軟骨細胞も複数の TLR を発現している。たいへん興味深いことにそのうちの一つ TLR-3 を活性化することで軟骨細胞において MMP-13 の発現が強力に誘導されることが近年相次いで報告された (Radwan M, et al. Arthritis rheum 2013; Zhang Q, et al. Ann Rheum Dis 2008; Zhao C, et al. J Immunol 2014)。TLR-3 は主に細菌由来の二本鎖 RNA のみを認識するとされてきたが、最近、細胞の壊死などで放出された自己の一本鎖 RNA も認識することが明らかにされた (Tatematsu M, et al. Nature Commun 2013)。

本研究では我々の研究室に保存された OA 關節からの多数の關節液が研究に用いられた。我々の研究室では保存的に治療された多

数の膝 OA の症例から採取された関節液を過去 7 年にわたって保存しており、その数は現在 800 検体を超える。これらの症例のほとんどは臨床経過も記録されており、定期的に撮影された X-p の変化から、関節液採取時に軟骨変性が進行の最中にあった症例（以下、進行例）と関節液は採取されたもののその時点で軟骨変性はほとんど進んでいなかった症例（以下、非進行例）とを区別することが可能である。もしタンパク分解酵素の発現や活性化を誘導し軟骨変性を引き起こす因子が関節液中にあるとすれば、その因子は非進行例と進行例の関節液を比較することで見出される可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、非進行例と進行例の関節液を様々な方法で比較検討することによって、OA 軟骨においてタンパク分解酵素の発現と活性化に関連する因子を見出すことである。さらに見出された因子が未知のものであったりその作用がまだ明確になっていないものであった場合にはさらにその因子によって軟骨細胞にタンパク分解酵素の発現あるいは活性化が誘導される機序についても明らかにする。研究代表者らが所属する研究室で過去 7 年にわたって保存的に治療された膝 OA の症例から採取された関節液の中から、軟骨変性の進行過程にあった症例と軟骨の変性がほとんど進んでいなかった症例からの関節液を選び出して比較解析することによって関節中に存在し、軟骨基質の変性を誘導する因子を同定する。

## 3. 研究の方法

【平成 27 年度】

### (1) 臨床情報に基づく関節液検体の選択

研究代表者らが所属する施設の整形外科を受診した患者の中で関節水腫があり治療上水腫の除去が行われた症例については、水腫が続く限り 6 カ月に 1 度の単純

X-p を撮影している。この X-p を基に、関節液採取時に軟骨変性が進行していた症例と水腫はあったが軟骨変性の進行はなかったと考えられる症例を区別し、それぞれの症例の関節液を解析に用いた。解析に用いる関節液は直近 3 カ月以内に薬物投与を受けなかったもののみとした。

また症例数は少ないが、一定の時期に関節水腫があり関節裂隙が狭小化したが、その後安定した状態となった症例もあり、このような症例では進行期と非進行期に採取した関節液を組み合わせる解析に用いる。同一関節から進行期、非進行期に採取した関節液を比較することで個体差の英起用を除外した解析が可能であるため、このような症例からの関節液の解析は極めて貴重なデータを提供してくれる可能性があると考えた。

### (2) 関節液の解析

当初の研究計画では抗体アレイによる解析を行って進行群と非進行群の間で濃度差のある因子を絞り込む予定であったが、合計 32 本の検体すべてについて抗体アレイを行うのは予算的に無理であり、一方、検体をプールして抗体アレイの解析を行った場合にはごく一部の検体で因子の値が高い場合などに結果の信頼性が不十分となる可能性が考えられた。このため計画を修正し、選別した検体について関節液中の様々な因子の濃度の比較を Luminex システム (suspension array technology による multiplex analyte profiling) および ELISA によるタンパク定量解析によって直接行った。

【平成 28 年度】

当初の研究計画では関節液中の解析について次世代シーケンシングプラットフォームを利用して遺伝子配列の解析を行う予定であったが、予算的に困難であったため、計画を修正した。また、軟骨組織の組織培養に LNA 化された核酸を導入したオリゴ RNA を

用いて遺伝子の発現抑制を行い、タンパク分解酵素の発現や活性化を誘導する機序を検討する予定であったが、候補因子の LNA のノックダウン効率が悪く、研究の継続は予算的にも困難であったため計画を以下のように修正した。

(1) 関節液からのエクソソームの抽出および解析

関節液からのエクソソームの分離および分離したエクソソームからの RNA の抽出はそれぞれ市販のキットを用いて行った。

エクソソームからの miRNA の抽出には miScript miRNA PCR Array (Qiagen) を用い、75 種の miRNA を real-time PCR (7500Fast, ABI) を用いて計測を行った。

(2) 末期 OA 関節からの検体の採取

人工関節置換術を行った末期 OA 患者より、関節液と滑膜を採取した。

関節液については前述の解析で同定できた RNA の定量解析を real-time PCR (7500Fast) を用いて行った。

滑膜については RNA を抽出後、cDNA 合成したのちに定量 PCR により以下のタンパク分解酵素の遺伝子発現を定量的に検討した。また、同時に同じ滑膜組織より miRNA も抽出しその発現解析も行った。

#### 4. 研究成果

##### 【平成 27 年度】

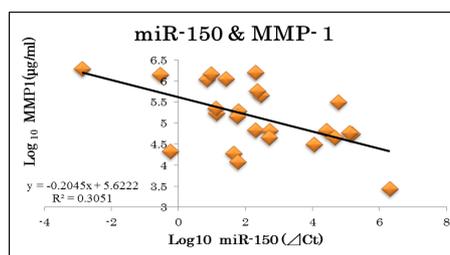
(1) レントゲンの所見に基づいて、まず関節裂隙狭小化が進行しているときに採取された関節液を 16 症例 16 検体（進行群）、関節裂隙狭小化が進行していない時点で採取された関節液 16 症例 16 検体を選択した（非進行群）。前者では関節裂隙狭小化は 1 年あたりにして平均 0.31 mm (0.2~0.7 mm/year) であるのに対して、後者については、全例で関節裂隙の狭小化は計測上認められなかった。

(2) Luminex を用いて以下の 21 因子

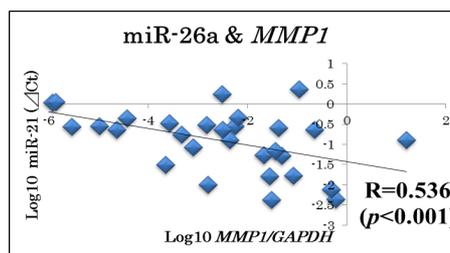
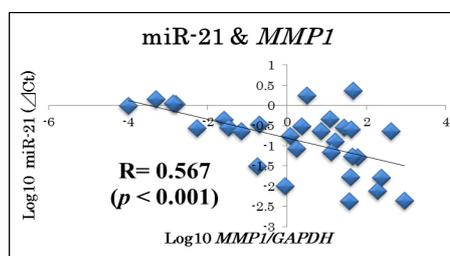
(Aggrecan, Adiponectin, FGF basic, IL-1b, IL1ra, MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, Leptin, S100A8, TNF-a, VEGF-A, VCAM-1, VEGFR2, uPA/Urokinase, Serpin E1/PAI-1) のタンパク濃度を進行群 16 検体と非進行群 16 検体について計測した。その結果、MMP-1 および MMP-3 は両群の間で濃度に有意の差がみられた。

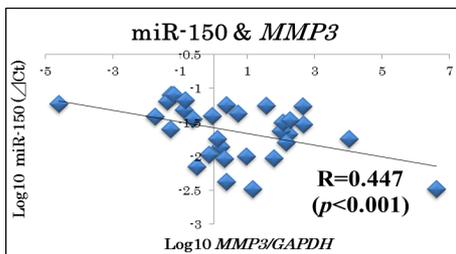
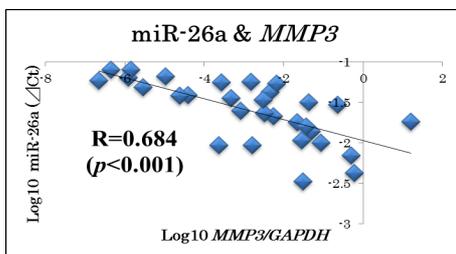
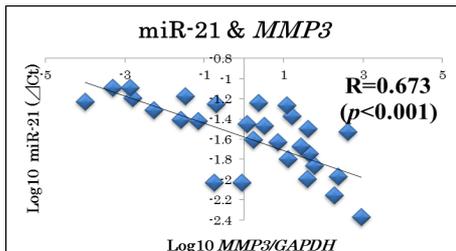
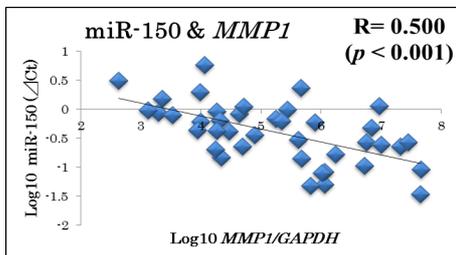
##### 【平成 28 年度】

(1) 関節液からエクソソームを抽出し、miRNA を解析して進行群、非進行群の間で比較した結果、進行群で miR-21 と miR-150 の濃度が有意に低いことが示された。次に miR-21、miR-150 と前述の 21 種のタンパク濃度の関連を調べたところ、miR-21、miR-150 と MMP-1 および MMP-3 の間にそれぞれ有意な負の相関があることがわかった。



(2) 末期 OA 関節の滑膜組織より得た miRNA と mRNA の発現解析を行った。MMP-1, MMP-3 と miR-21, miR-26a, miR-150 の間に有意な負の相関を認めた。





これらの結果より、関節液中に存在する MMP-1 と MMP-3 は滑膜由来である可能性が考えられた。さらに MMP-1 と MMP-3 が滑膜から関節液中に放出され、それが軟骨基質に作用して軟骨基質の変性・消失を引き起こしているのではないかと考えられた。また滑膜組織において MMP-1、MMP-3 と miR-21、miR-26a、miR-150 が負の相関を示したことから、これらの miRNA が減少することによって MMP-1 と MMP-3 の発現が亢進している可能性が考えられた。このような機序が OA の滑膜病変に実際に関係しているかは今後の解明を待つ必要があるが、本研究の結果は多くの研究が積み重ねられているにもかかわらずいまだに明らかとなっていない OA の滑膜病変

と軟骨変性の関連について、有力な手掛かりを示すものとする。

#### 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 6 件)

田中 信帆 他、変形性関節症の滑膜病変に  
関与する microRNA の探索 - 関節液の解析  
結果 - 第 28 回日本軟骨代謝学会 東京

田中 信帆 他、変形性関節症の滑膜病変に  
関与する microRNA の探索-関節液の解析結  
果- 第 7 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外  
科学会 北海道・札幌

田中 信帆 他、変形性関節症における滑膜  
病変に関与する miRNA の探索 - 関節液及  
び滑膜組織の解析 - 第 30 回 日本整形外  
科学会基礎学術集会 富山

田中 信帆 他、変形性関節症と関節リウマ  
チにおける miRNA の発現比較-滑膜組織にお  
ける検討- 第 29 回日本軟骨代謝学会 広島

田中 信帆 他、変形性関節症と関節リウマ  
チの滑膜組織における miRNA の発現比較  
第 8 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学  
会 福岡・博多

田中 信帆 他、変形性関節症と関節リウマ  
チの滑膜における検討-miRNA の発現比較-  
第 31 回 日本整形外科学会基礎学術集会、  
2016 年 10 月 13 日、福岡・博多

〔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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 信帆 (TANAKA, Nobuho)

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・政策医療企画部・研究員  
研究者番号： 60530920

(2)研究協力者

福井 尚志 (FUKUI, Naoshi)

森 俊仁 (MORI, Toshihito)