

令和元年6月25日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20056

研究課題名(和文) microRNAと骨髄単核球移植を併用した骨壊死症に対する新たな治療戦略

研究課題名(英文) A new strategy for osteonecrosis using bone-marrow-derived mononuclear cells and microRNA

研究代表者

庄司 剛士 (Shoji, Takeshi)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・寄附講座助教

研究者番号：50736569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨壊死症と関連の高い6つのmiRNA(miR-31, miR-34a, miR-92a, miR-146, miR-210, miR-218)のうち、in vitro実験系においてmiR-31とmiR-210の混合群において骨形成促進能、血管新生能が最も高い結果であった。また、ラット大腿骨骨折偽関節モデルを用いたin vivoにおけるmiRNA投与実験では、miR-31とmiR-210の混合投与後4週において、miRNA混合投与群において、non-functional siRNA投与群と比較し有意に豊富な仮骨形成を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性骨壊死症における治療においては、これまで壊死組織自体に対する骨修復を目的とした治療法は未だ確立されていない。

本研究の結果から、microRNAを局所投与することによって、血管新生・骨形成促進作用を高め、これまでの細胞移植による効果に加えて、新しい概念として、効果的なmicroRNAを投与することで周辺組織の再生環境を整えるというアプローチに特色がある。これまで、骨壊死症におけるmicroRNAの局所投与による骨修復、血管再生に着目した報告は我々のグループ以外になく、microRNA投与による新たな治療法として有用な知見となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Six miRNA (miR-31, miR-34a, miR-92a, miR-146, miR-210, miR-218) which were highly expressed in the femoral head of the patients with steroid associated osteonecrosis of the femoral head were selected as candidates. Of these, osteogenesis and angiogenesis in a group of miR-31 and miR-210 combination were the highest in in vitro experiment. Then, a rat thighbone pseudarthrosis model was applied for the evaluation of bone regeneration and angiogenesis in vivo. The plain radiograph and  $\mu$ CT findings revealed that there was significantly much callus formation in the miR-31 and miR-210 mixture administrated group, compared with the non-functional siRNA administrated group at four weeks after injection. The radiographic analysis also revealed that the radiographic scoring was significantly higher in the miR-31 and miR-210 mixture group and there was significantly much callus formation in the miR-31 and miR-210 mixture group, compared with the siRNA group at four weeks after injection.

研究分野：整形外科

キーワード：骨壊死症 microRNA

## 様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性骨壊死症は膠原病や各種臓器移植後などにおける、ステロイドの大量投与に関連して起こる疾患で、その多くは大腿骨頭に発生し、骨頭圧潰に続発して二次性股関節症へ進展する厚生労働省指定の難治性特定疾患である。本症の多くは青壮年期に発症するが、その治療に難渋することが多く、また骨壊死自体に対する骨修復を目的とした治療法は未だ確立されていない。

(2) これまで我々は、大腿骨頭壊死症の患者に対し低侵襲な骨髄単核球移植を開発し、その臨床応用として、特発性大腿骨頭壊死症の患者に対し自家骨髄単核球移植行ってきたが、骨修復効果と骨頭圧潰防止効果を示すことができたものの、その臨床成績は不安定であった。

(3) 近年、約 22 塩基対の短鎖 RNA 分子である microRNA(miRNA)が新しい遺伝子制御因子として注目されており、我々は動物モデルへの miRNA の局所投与による治療効果および再生促進効果、また大腿骨頭壊死症において、大腿骨頭の壊死骨における血管形成に関連した microRNA-210(miR-210)が壊死部周辺に発現していることについて報告している。

(4) そこで、骨髄単核球移植と併用し miRNA 投与を行うことにより、これまでの細胞移植による効果に加えて、miRNA による血管形成、骨形成効果、また骨髄単核球の移植細胞としての質(再生環境改善効果(骨形成、血管形成)のあるサイトカインの分泌)が高められ、大腿骨頭の圧潰ならびに関節症の進行を抑制する骨壊死症に対するより効果的な、新たな治療法の確立に繋がる可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、これまで我々が大腿骨頭壊死症の患者に対して行ってきた自家骨髄単核球移植と併せ、骨壊死症と関連のある、骨再生・血管新生に促進的に働く microRNA(miRNA)を投与することにより、骨壊死症に対するより効果的な治療法を開発することである。

本研究では、骨髄単核球移植と併せ miRNA 投与を行うことにより、壊死骨・骨壊死周辺領域の血管形成・骨形成促進作用を高め、併せて単核球の移植細胞としての質(骨形成能、血管形成能)が高められ、早期骨修復を促し、骨頭の圧潰を予防する効果があると仮説を立て、以下の 3 課題を明らかにする。

- ① ステロイド性骨壊死症と関連の強い miRNA の血管形成能と細胞分化促進能の評価
- ② miRNA 投与によるサイトカインと miRNA の分泌変化
- ③ 骨壊死モデルにおける miRNA 投与による壊死骨の再生効果。また骨髄単核球移植、miRNA 投与併用による壊死骨の再生効果

### 3. 研究の方法

(1) ステロイド性骨壊死患者由来骨髄単核球の miRNA 発現の網羅的解析

ステロイド性大腿骨頭壊死患者、また非大腿骨頭壊死症患者(変形性股関節症)から採取した骨組織より RNA を精製し、マイクロアレー法を用いた miRNA の網羅的発現解析を行う。次に real time PCR 法を用いて候補として挙げられた miRNA の定量化を行い、ステロイド性骨壊死症と関連の強い miRNA の同定を行う。

(2) ステロイド性骨壊死症と関連の強い miRNA のサイトカインの発現プロファイルに着目して、血管形成能と細胞分化促進能について検討する。

(1) より得られた結果を基に、候補として挙げられた miRNA を用いて、*In vitro* 実験系において血管形成能、骨形成能を評価する。

① 骨形成能：Mesenchymal stem cell (MSC) を用いて、骨分化誘導能を分化マーカー遺伝子の発現 (Runx2, osteocalcin, Alkaline phosphatase, Type I collagen) と免疫染色により評価する。

② 血管形成能：ヒト臍帯内皮細胞 (HUVEC) を用いて血管形成能の評価を行う

(3) 骨壊死モデルにおける miRNA 投与による壊死骨の再生効果。また骨髄単核球移植、miRNA 投与併用による壊死骨の再生効果の評価。

先に報告されたラットステロイド性骨壊死症モデルに準じ、Lipopolysaccharide (LPS) (2 mg/kg) を経静脈的に day0, 1 に投与後、day2, 3, 4 に methylprednisolone (20 mg/kg) の筋注しモデルを作成する。ラットステロイド性大腿骨頭壊死モデルを用いて、透視下に骨壊死部まで骨孔を作成した後、透視下に骨壊死部まで骨孔を作成した後、miRNA の局所投与を行い、骨修復、血管形成、細胞の apoptosis への影響につき組織学的、分子生物学的、免疫組織化学的、形態学的評価を行う。次に、骨髄単核球移植と併せ混合投与を行い、同様に骨修復、血管形成、細胞の apoptosis への影響につき組織学的、分子生物学的、免疫組織化学的、形態学的評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) ①ステロイド性大腿骨頭壊死症手術患者、また非大腿骨頭壊死症手術患者(変形性股関節症)の症例より、手術時に摘出した大腿骨頭を標本とし、大腿骨頭より採取した骨髄より RNA を精製し、マイクロアレー法を用いた miRNA, メッセンジャーRNA の網羅的発現解析を行い発現プロファイル解析の結果、発現の亢進を認めた 6 つの miRNA (miR-31, miR-34a, miR-92a, miR-146, miR-210, miR-218) を候補として選別した。

次に、miRNA の細胞内への transfection を確認するため、MSC に対し miRNA-31, miRNA-210 を用いて自然添加、また transfection kit と併せて添加した際の細胞内の miRNA を real time PCR で確認した。(図.1) 次に、miRNA の細胞内への transfection の確認、また最適濃度を決定するため、MSC に対し miRNA-140 (10nM, 50nM), nonfunctional siRNA を transfection kit と併せ添加し、添加直後、5 日、10 日における細胞内の miRNA を免疫組織学的染色で確認した。(図.2)

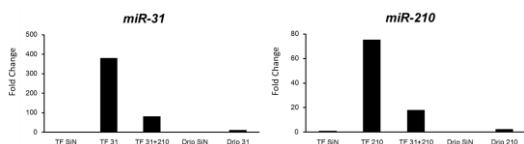


図.1 miRNA の発現解析

(TF; transfection kit 併用, drip; 自然添加)

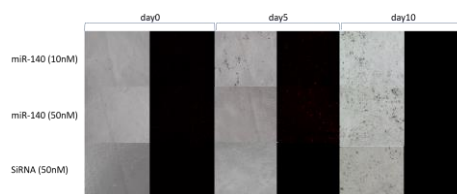


図.2 miRNA-140 の発現

②得られた miRNA の候補から *in vitro* 実験系において、骨形成促進、血管新生能を評価し、これら骨・血管新生に有用であると思われる 6 つの miRNA (miR-31, miR-34a, miR-92a, miR-146, miR-210, miR-218) の候補の選別を行った。

2-1. 骨分化培地に対し miRNA を transfection kit と併せて添加後 14 日後にアリザリンレッド、アルカリフォスファターゼ染色を行った。(図.3a, b) また、real time PCR を用いて collagen

Type1A1 (coll1), Runx2 を評価した。(図.4) その際, miR-31 と miR-210 の combination による血管新生能、骨増殖能についても評価し, miR-31 と miR-210 の combination が最も効果が高い結果となった。

2-2. ヒト臍帯内皮細胞(HUVEC)を用いて血管形成能の評価を Tube formation/ Branch point assay を用いて評価した結果, miR-31, miR-210, また miR-31/miR-210 combination において positive control として用いた VEGF よりも高い血管形成能を認めた。(図. 5a. b)

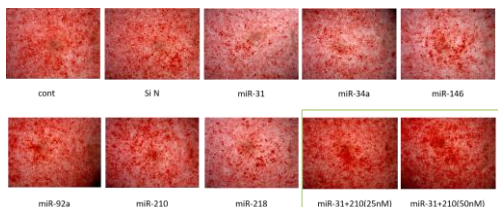


図. 3. a アリザリンレッド染色による評価

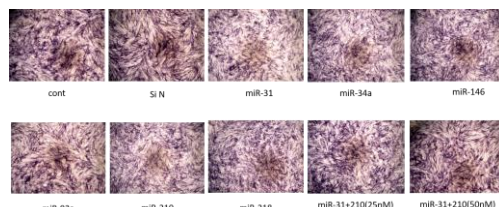
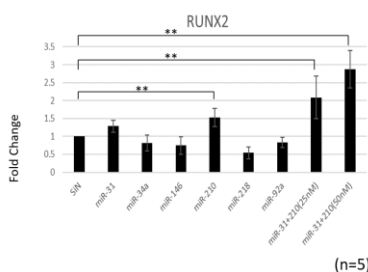
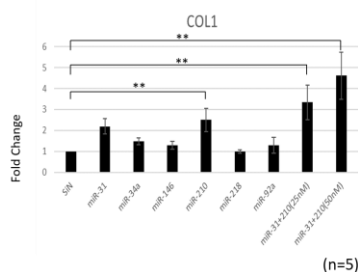


図. 3. b アルカリフォスファターゼ染色評価



Each miRNA transfection (50nM)

\*\*P<0.01

図. 4 各 miRNA の real time PCR による評価

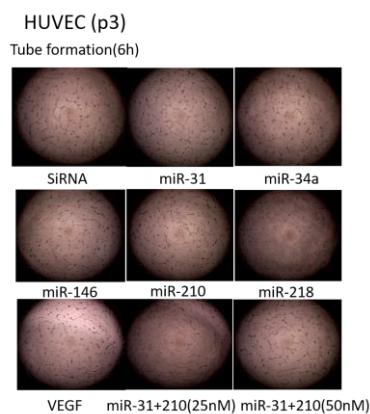


図. 5a Tube formation assay

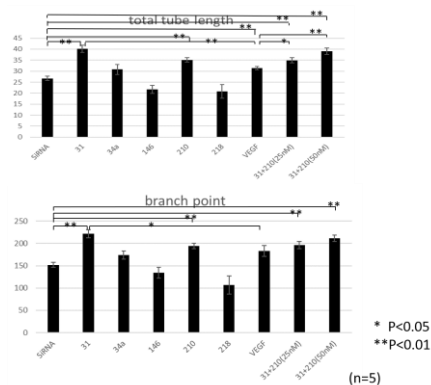


図. 5b Branch point assay

### ③ステロイド性骨壊死モデルでの検討

これまでの報告に基づき, methylprednisolone (20–30 mg/kg)を用いたラットステロイド性骨壊死モデルの作成を試みたが,再現性の高い骨壊死モデルの作成が困難であった。そのため,骨再生効果,血管新生効果の検討のため,ラット大腿骨骨折偽関節モデルを用いて実験を行った。大腿骨骨折偽関節モデルの作成は,ラット大腿骨骨幹部に骨折を作成し,骨折部を中心に周囲の骨膜を中枢,末梢側それぞれ 2mm 焼灼後, K-wire で内固定しモデルを作成した。(図. 6)



図. 6 大腿骨骨折偽関節モデル

次に、miR-31、miR-210 と atelocollagen の投与による血管新生、骨再生効果につき以下のタイムラインで評価を行った。



まず、miRNA, atelocollagen 局所投与後の miRNA の発現を評価するため、投与後 1 日、3 日、7 日後における miRNA の発現評価を行ったところ、投与後 1 週まで miRNA の発現の亢進を認めた。(図. 7) 次に、miRNA-31, 210 の combination と、control として siRNA を用いて atelocollagen と混合投与後、2 週、4 週後の画像評価を行った。単純レントゲンによる評価では、投与後 2 週では両群間に有意な差を認めなかったが、投与後 4 週において siRNA 投与群と比較し、miRNA 投与群で有意に仮骨形成を多く認め(図. 8a, b)、radiographic scoring においても miRNA 混合投与群が優位に高い結果であった。また、 $\mu$ CT を用いた評価においても同様の結果を認め、morphometric 解析では、投与後 4 週において miRNA 投与群では、仮骨形成が優位に高い結果であった。(図. 9a, b)

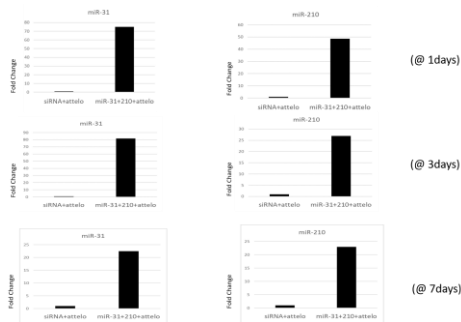


図. 7 miRNA 投与後の miRNA の発現解析

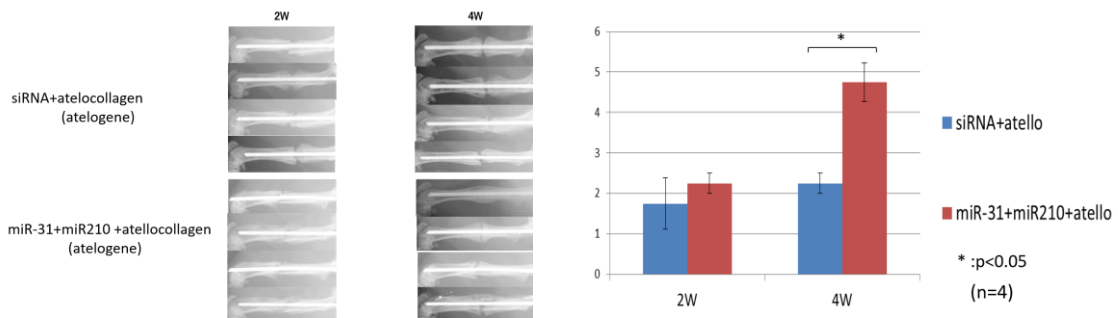


図. 8a miRNA 投与後 2 週、4 週におけるレントゲン評価 図. 8b Radiographic scoring

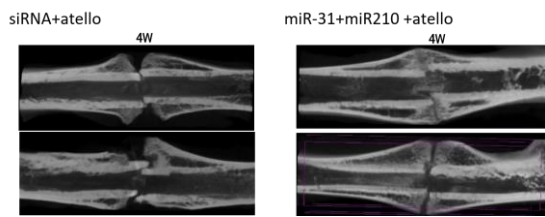


図. 9a miRNA 投与後 2 週、4 週における  $\mu$  CT 評価

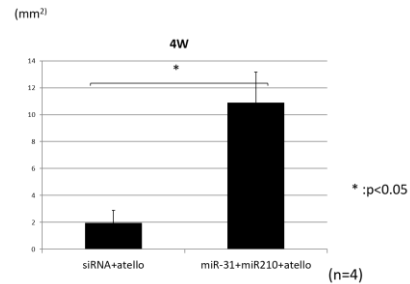


図. 9b Morphometric 解析

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Shoji T, Yamasaki T, Izumi S, Kenji M, Sawa M, Yasunaga Y, Adachi N. The effect of cup medialization and lateralization on hip range of motion in total hip arthroplasty. Clin Biomech (Bristol, Avon). 2018 Aug;57:121-128. 査読あり
2. Shoji T, Yamasaki T, Izumi S, Sawa M, Akiyama Y, Yasunaga Y, Adachi N. Evaluation of articular cartilage following rotational acetabular osteotomy for hip dysplasia using T2 mapping MRI. Skeletal Radiol. 2018 Nov;47(11): 1467-1474. 査読あり
3. Shoji T, Yamasaki T, Izumi S, Murakami H, Mifuji K, Sawa M, Yasunaga Y, Adachi N, Ochi M. Factors affecting the potential for posterior bony impingement after total hip arthroplasty. Bone and Joint Journal. 2017 Sep;99-B(9):1140-1146 査読あり
4. Shoji T, Nakasa T, Yoshizuka M, Yamasaki T, Yasunaga Y, Adachi N, Ochi M. Comparison of fibrin clots derived from peripheral blood and bone marrow. Connect Tissue Research. 2017 Mar;58(2):208-214. 査読あり
5. Shoji T, Yasunaga Y, Yamasaki T, Izumi S, Hachisuka S, Ochi M: Anterior Inferior Iliac Spine Bone Morphology in Hip Dysplasia and Its Effect on Hip Range of Motion in Total Hip Arthroplasty. J Arthroplasty. Sep;31(9):2058-63 2016 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. Hideki Saka The effect of local administration of microRNAs which highly express in osteonecrosis of femoral head on bone regeneration. Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting, Austin Convention center, Austin TX America, February 2-5, 2019
2. 坂 英樹 特発性大腿骨頭壊死の骨組織に特異的に発現する microRNA の骨形成促進効果 第 33 回日本整形外科基礎学術集会 奈良春日野国際フォーラム (奈良県奈良市) 2018 年 10 月 11 日~12 日
3. 坂 英樹 特発性大腿骨頭壊死症における特異的 microRNA の骨分化促進効果 第 91 回日本整形外科学会学術総会 神戸コンベンションセンター他 (神戸市中央区) 2018 年 5 月 24 日~27 日

[図書] (計 0 件)