

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19727

研究課題名(和文)変形性関節症の新規診断法リキッドバイオプシーの開発

研究課題名(英文)Challenge for liquid biopsy of osteoarthritis

研究代表者

廣畑 聡 (HIROHATA, SATOSHI)

岡山大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90332791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症には適切な早期診断法がない。リキッド・バイオプシーは新たな早期診断法となる可能性がある。

ラット膝関節の前十字靭帯及び内側側副靭帯を切離し、内側半月板を切除した変形性関節症手術モデルを作成し、経時的にそれぞれ関節液および末梢血液を採取した。サンプルからエクソソームを含む小胞成分を精製し、粒子径を測定した。次にエクソソーム中に含まれているRNA成分を定量した。一連の結果から、変形性関節症早期では関節液よりも血液によるリキッド・バイオプシーを目指すことが妥当であると考えられた。さらに、血液中のエクソソーム内のRNA解析結果から超高感度測定系が必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラット変形性関節症モデルを作製、関節液および末梢血液を採取して、リキッドバイオプシーが可能であるかに挑戦した。ヒト変形性関節症においても膝に水(関節液)がたまるといった状況は、早期ではなくむしろ進行期で見られることから、X線などで診断可能な進行期ではなく早期の診断目的としては、そのソースは関節液よりも血液に注目すべきであることが明らかとなった。さらに血液中のエクソソームに着目してRNA解析を行ったところ、非常に微量であり実用化を目指すには超高感度解析系の構築が求められる。

研究成果の概要(英文)：There is no definite early diagnosis of osteoarthritis. Can liquid biopsy be a new early diagnosis for osteoarthritis?

To answer this important question, rat anterior cruciate ligament and the medial collateral ligament of the rat knee joint were dissected and the medial meniscus was taken, and the osteoarthritis surgical model was prepared. The joint fluid and peripheral blood were collected over time. The vesicle component containing exosomes was purified from the sample and the particle size was measured. Next, RNA components contained in exosomes were quantified. From the series of results, it was considered appropriate to aim at liquid biopsy with blood rather than joint fluid at the early stage of osteoarthritis. Furthermore, the analysis of RNA in exosomes in blood revealed that a highly sensitive measurement system is required.

研究分野：整形外科

キーワード：遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は OA の早期で観察されるアグリカンの分解に極めて重要な役割を持つアグリカナーゼの研究に関わってきた。アグリカナーゼ 1、2 はそれぞれ ADAMTS4、ADAMTS5 であることが示され (*Science* 1999; 284(5420): 1664-1666., *J Biol Chem.* 1999; 274(33): 23443-23450) ADAMTS5 のノックアウトマウスでは OA が悪化しないことから、その重要性が益々注目されることとなった (*Nature* 2005; 434(7033): 648-652, *Nature* 2005; 434(7033): 644-648)。最近では ADAMTS を制御する microRNA の働きに注目が集まっており (*Arthritis Rheum.* 2009; 60(9): 2723-30.) 申請者は他分野で microRNA がリキッドバイオブシーに利用されていることに強い関心を持っていた。2016 年 6 月の米国臨床腫瘍学会 (ASCO) でリキッドバイオブシーが将来、組織生検の代替となる可能性を示す報告がなされた。大規模遺伝子解析により、肺がん、乳がん、大腸がんを含む多種類のがん診断において、リキッドバイオブシーが従来の腫瘍生検で同定されたものと同じ変異を 94 ~ 100% の確率で検出できたという画期的な報告である。循環血液中に存在する全 DNA の 0.4% 未満の変異を検出できる高感度診断系のリキッドバイオブシーの技術発展には目を見張るものがある。既に米国では非小細胞肺癌における EGFR 変異検査でリキッドバイオブシーが承認されることが決定している。これらの研究の進展状況から関節内の microRNA を血中で検出するリキッドバイオブシーが可能であると着想するに至った。

2. 研究の目的

近年、がんの診断分野において「リキッド・バイオブシー」が注目されている。リキッド・バイオブシーは少量の血液や尿などで実施できるため、低侵襲 がんの早期診断 ゲノム解析による治療薬選択 など多くの利点が報告されており世界中の研究機関や医療機器メーカーが開発に乗り出している。しかし骨・関節領域でのリキッドバイオブシーは例がない。変形性関節症 (OA) の膝関節から microRNA がエキソソームに取り込まれて血中に移行したりする現象を血液中の微量な変化として高感度解析技術でとらえる『変形性関節症のリキッドバイオブシー』に挑戦するのが本研究の目的である
とりわけ、がんのリキッドバイオブシーでは血液循環腫瘍 DNA とも呼ばれる cfDNA の概念は浸透しているが、OA の関節軟骨から血中へ cfDNA が移行する報告はこれまでになく挑戦的な試みである。

3. 研究の方法

本研究では二つのテーマを設定した。

(1) ラット OA モデルを用いたリキッドバイオブシー

(2) リキッドバイオブシーで新たに同定した OA バイオマーカーの役割と意義

雄性 SD ラットを用いて前十字靭帯、内側側副靭帯切離、内側半月板切除による OA モデルを作成する。OA 作成前および作成後 1, 2, 3, 4, 5, 6 週目に採血を行う。同モデルはこれまでの研究によって、2, 4, 6 週と関節軟骨の破壊が進行していくことをサフラニン O 染色による Mankin score で確認している。

まず、OA 作成前に採血 (0 日とする) を行い以後は 1, 2, 4, 6 週目にそれぞれ採血を行った。シャム手術を行ったラットからも同様に採血を行い、血液に含まれる成分のうち、関節由来エキソソーム中の microRNA を比較することで OA 特異的なものを検出する事を目指した。個体差を考慮して各群の解析を行った。同時に各個体の関節液を採取し、microRNA を検出して血液からのデータと比較検討した。

cfDNA の測定はデジタル PCR を採用することを計画している。従来のリアルタイム定量 PCR を改良して高感度化したデジタル PCR はサンプル中の DNA を 10,000 個以上の微小分画に分けたのちに、各微小分画内で PCR 反応を行う手法である。シンプルかつ高感度で、信頼性も高いデジタル PCR によって早期 OA のバイオマーカーとなり得る微量の cfDNA を検出することが可能であると考えている。

次にエキソソーム成分を超遠心法によって回収し、エキソソーム内に含まれている microRNA の解析を行う。

手術を行わないシャムラットと比較することによって、OA ラットでのみ特異的に変動する cfDNA・microRNA を同定する。同定された特異的 cfDNA・microRNA は OA 病態および治療効果の関連性を検討して OA のバイオマーカーとして実用化を目指す。

4. 研究成果

ラットに膝関節の前十字靭帯及び内側側副靭帯を切離し、内側半月板を切除した変形性関節症手術モデルを作成した。変形性関節症手術の施行前および作成 10 日後、2 週間後、4 週間後、6 週間後にそれぞれ関節液および末梢血液の採取を行った。得られた関節液および血漿成分からエクソソームを含む小胞成分を精製した。小胞成分の粒子径を測定したところエクソソームが含まれていることが確認された。次にエクソソーム中に含まれている RNA 成分を定量した。関節液は OA 早期での採取量が少ないこともあって RNA 検出が非常に困難であることが明らかとなった。生理食塩水などで灌流して回収する方法でポリ

ュームを増やしても最終的には含まれているエクソソーム量が極めて少ないことから定性的な評価は困難であると結論した。一方で、血液中のエクソソームに含まれるRNAは一定量存在することが確認された。これら一連の結果は、ヒト変形性関節症においても膝に水(関節液)がたまるといった状況は、早期ではなくむしろ進行期で見られることから、関節液によるリキッド・バイオプシーの妥当性に解を与えると考えられた。すなわち、変形性関節症早期の時点では膝関節痛は強くなく、関節液貯留も見られないため、関節液を採取する場面にはならない。関節腔穿刺を行うような関節液貯留のみられるステージは既に進行した変形性関節症であると考えられる。したがってX線などで診断可能な進行期ではなく早期の診断目的としては、リキッドバイオプシーのソースは関節液よりも血液に注目すべきであるとの結論に至った。さらに、血液中のエクソソーム内のRNA解析結果からエクソソーム内に含まれているmicroRNAは非常に微量であり、実用化を目指すためには超高感度測定系の確立が必要となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Ohtsuki T, Asano K, Inagaki J, Shinaoka A, Kumagishi-Shinaoka K, Cilek MZ, Hatipoglu OF, Oohashi T, Nishida K, Komatsubara I, Hirohata S. High molecular weight hyaluronan protects cartilage from degradation by inhibiting aggrecanase expression. *J Orthop Res*. 査読有, 2018 Dec; 36(12): 3247-3255. doi: 10.1002/jor.24126.

Yamaji H, Murakami T, Hina K, Higashiya S, Kawamura H, Murakami M, Kamikawa S, Hirohata S, Kusachi S. Adjunctive left anterior line ablation induced left atrial dysfunction and dyssynchrony in atrial fibrillation ablation. *Heart Vessels*. 査読有, 2018 Aug 7. doi: 10.1007/s00380-018-1238-x.

Asano K, Edamatsu M, Hatipoglu OF, Inagaki J, Ono M, Ohtsuki T, Oohashi T, Hirohata S. Host-produced ADAMTS4 Inhibits Early-Stage Tumor Growth. *Acta Med Okayama*. 査読有, 2018 Jun; 72(3): 257-266. doi: 10.18926/AMO/56071.

Yamaji H, Murakami T, Hina K, Higashiya S, Kawamura H, Murakami M, Kamikawa S, Hirohata S, Kusachi S. Differences in activated clotting time and initial heparin dosage during atrial fibrillation ablation for patients with edoxaban compared with warfarin. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 査読有, 2018 Mar 13. doi: 10.1111/jce.13483.

Watanabe S, Kumazaki S, Kusunoki K, Inoue T, Maeda Y, Usui S, Shinohata R, Ohtsuki T, Hirohata S, Kusachi S, Kitamori K, Mori M, Yamori Y, Oka H. A High-Fat and High-Cholesterol Diet Induces Cardiac Fibrosis, Vascular Endothelial, and Left Ventricular Diastolic Dysfunction in SHRSP5/Dmcr Rats. *J Atheroscler Thromb*. 査読有, 2018 May 1; 25(5): 439-453. doi: 10.5551/jat.40956.

Asano K, Nelson CM, Nandadasa S, Aramaki-Hattori N, Lindner DJ, Alban T, Inagaki J, Ohtsuki T, Oohashi T, Apte SS, Hirohata S. Stromal Versican Regulates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis. *Sci Rep*. 査読有, 2017 Dec 8; 7(1): 17225. doi: 10.1038/s41598-017-17613-6.

Takagi W, Miyoshi T, Doi M, Okawa K, Nosaka K, Nishibe T, Matsuo N, Hirohata S, Ito H. Circulating adipocyte fatty acid-binding protein is a predictor of cardiovascular events in patients with stable angina undergoing percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc Disord*. 査読有, 2017 Oct 10; 17(1): 258. doi: 10.1186/s12872-017-0691-2.

Hirohata S, Inagaki J, Ohtsuki T. Diverse Functions of a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif-1. *Yakugaku Zasshi*. 査読有, 2017; 137(7): 811-814.

〔学会発表〕(計30件)

廣畑 聡 他、メカニカルストレスによるHYBID遺伝子の発現抑制、第32回日本軟骨代謝学会、2019年3月

廣畑 聡 他、癌微小環境におけるVersicanおよびADAMTSによる分解産物の分布様式、第27回プロテオグリカンフォーラム グルコサミノグリカン/プロテオグリカン(GAG/PG)研究の最前線、2018年

Hirohata S 他、Isolation and characterization of extracellular microvesicles in osteoarthritis. 第41回日本分子生物学会年会、2018年

Hirohata S 他、Inflammatory cytokine induced HYBID (HYALURONAN-BINDING PROTEIN INVOLVED IN HYALURONAN DEPOLYMERIZATION) -Expression mechanism- HA2017 米国オハイオ州クリーブランド、2017年

廣畑 聡 他、Molecular and biochemical analysis of HYBID (HYALURONAN-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) gene expression. 第30回日本軟骨代謝学会、2017

年

廣畑 聡 他、がん微小環境におけるパーシカン分解酵素 ADAMTS の局在と血管新生におけるパーシカンの意義、第 49 回 日本結合組織学会学術大会、2017 年

廣畑 聡 他、メカニカルストレスの軟骨細胞に及ぼす多彩な作用-マトリックス合成促進と炎症性サイトカイン誘導性マトリックス分解活性抑制、第 49 回 日本結合組織学会学術大会、2017 年

廣畑 聡 他、炎症性サイトカイン誘導性マトリックス分解酵素発現のイオンチャネルを介した抑制とその機構解析 Inflammatory cytokine-induced matrix degrading enzymes expression were attenuated by mechanical stress through transient receptor potential cation channel. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://soran.cc.okayama-u.ac.jp/search?m=home&l=catalog>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

大月 孝志

(OHTSUKI, Takashi)

岡山大学

保健学研究科

非常勤研究員

研究者番号: 10534802

臼井 真一

(Usui, Shinichi)

岡山大学

保健学研究科

准教授

研究者番号: 50346417

稲垣 純子

(Inagaki, Junko)

岡山大学

医歯薬学総合研究科

助教

研究者番号: 90271056

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。