

平成 22 年 4 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791044

研究課題名（和文）変形性膝関節症の関節軟骨における miRNA-146 の発現

研究課題名（英文）Expression of microRNA-146 in osteoarthritis cartilage

研究代表者

中佐 智幸（NAKASA TOMOYUKI）

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60467769

研究成果の概要（和文）：炎症反応に関連がある microRNA(miR)-146 の変形性関節症（OA）軟骨における発現を解析した。OA 軟骨の変性程度と miR-146 の発現の関連を検討したところ、変性の低い軟骨では発現が高く、変性が進行すると発現が低下していた。また miR-146 は軟骨組織表層に強く発現していた。また、正常軟骨細胞において、炎症性サイトカインにより miR-146 の発現は誘導された。miR-146 は、OA における初期の軟骨変性に関与している可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the expression pattern of microRNA-146 (miR-146) in osteoarthritis (OA) cartilage. MiR-146 is intensely expressed in low grade OA cartilage, especially in superficial zone. MiR-146 might play a role in OA cartilage pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：病理学・再生医学・細胞・組織・生体分子・臨床

1. 研究開始当初の背景

関節破壊をきたす代表的な疾患である変形性関節症（OA）は、その原因は解明されておらず、新たな治療ターゲットを発見することは、従来にない画期的な治療法の開発につながる。Non coding RNA である microRNA(miRNA)

は、約 22 塩基程度の小さな RNA で、細胞増殖、分化、アポトーシスなどの生命現象に関与している。miRNA は、標的とする遺伝子の mRNA の 3' UTR に部分あるいは完全相補的に結合し、翻訳抑制あるいは、mRNA の直接的に分解することにより、遺伝子発現を制御して

いる。また、癌、白血病、ウイルス疾患といった様々な疾患に関与していることが明らかとなっており、原因不明の疾患において、その病態に miRNA が関与している可能性が示唆されている。いまだ原因の解明されていない OA の病態においても、miRNA が重要な役割を担っている可能性がある。miRNA-146 は、自然免疫、炎症反応に関与していると報告されており、その発現は NFkappaB により誘導されるといわれている。OA の病態において炎症性サイトカインの関与が示されており、miRNA-146 も OA の病態に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

炎症反応に関与する miRNA-146a の OA 軟骨における発現パターンを解析し、炎症性サイトカインにより軟骨細胞において、その発現が誘導されることを示す。

3. 研究の方法

(1) OA 軟骨における miRNA-146a の発現定量：OA と診断され、人工関節置換術等の手術を施行された 15 患者において、手術時に摘出された OA 軟骨を使用した。OA 軟骨から RNA を抽出し、real time PCR 法により miRNA-146a、軟骨組織の主要成分である Col2a1、軟骨破壊をきたす MMP(matrix metalloproteinase)13 の発現を定量評価した。軟骨組織は、パラフィン包埋切片を作製し、サフランin O 染色を行った後、Mankin score を用いて、変性の程度を分類し、変性の程度と、miRNA-146a、Col2a1、MMP13 の発現との関連を調べた。

Demographic features of the study subjects

subject	age	sex	source of cartilage	K/L score	CRP (mg/ml)	medication
1	18	female	patella	I	0	NSAIDs
2	51	female	femoral head	V	0.3	NSAIDs
3	64	female	medial femoral condyle	V	0	NSAIDs
4	76	female	femoral head	V	0	NSAIDs
5	74	female	medial femoral condyle	V	0.8	NSAIDs
6	71	male	femoral head	V	0	NSAIDs
7	65	female	femoral head	V	0	NSAIDs
8	79	female	femoral head	V	0	NSAIDs
9	49	male	medial femoral condyle	II	0.7	none
10	59	female	medial femoral condyle	II	0	NSAIDs
11	75	female	medial femoral condyle	II	0	NSAIDs
12	63	female	femoral head	IV	0	NSAIDs
13	74	male	femoral head	IV	0.5	NSAIDs
14	73	female	femoral head	IV	0	NSAIDs
15	73	female	femoral head	IV	0.2	NSAIDs

K/L - Kellgren / Lawrence CRP - C-reactive protein
NSAIDs - nonsteroidal antiinflammatory drugs

表 1. 患者データ

(2) 組織学的評価：OA 軟骨の切片を作製し、*in situ* hybridization により、miRNA-146a の発現分布を調べた。

(3) *in vitro* における炎症性サイトカインによる miRNA-146a の発現誘導：初代ヒト正常軟骨細胞を 6 ウェルプレートに 1×10^5 個播種し、細胞が接着した後、IL-1 β (5ng/ml) を添加した。24 時間後、RNA を抽出し、miRNA-146a、

MMP13 の発現を real time PCR 法により評価した。

4. 研究成果

(1) OA 軟骨の変性と miRNA-146a の発現の関連：OA 軟骨の変性程度を Mankin score により grade I ~ III の 3 段階に分け、miRNA-146a の発現と変性程度の関連を調べた。grade I の軟骨では、miRNA-146a、Col2a1 の発現は高値を示したが、MMP13 の発現は低値であった。Grade II の軟骨では、miRNA-146a、Col2a1 の発現は低下したが、MMP13 の発現は上昇していた。Grade III では、miRNA-146a、Col2a1、MMP13 の発現すべて低下していた。miRNA-146a は、初期の OA 軟骨で発現が高く、変性が進行するにつれて、Col2a1 とともに発現が低下することが判明した。(図 1)。

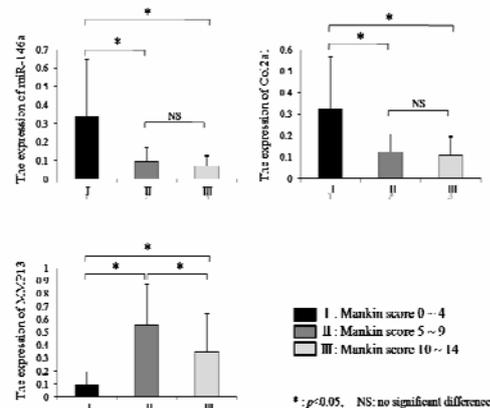


図 1. OA 軟骨変性と miRNA-146a の発現。Mankin score の低い初期の OA 軟骨では、miRNA-146a、Col2a1 の発現が高く、MMP13 の発現は有意に低い。変性が進行すると、miRNA-146a、Col2a1 の発現は低下し、MMP13 の発現は増加した。さらに変性が進行すると、miRNA-146a、Col2a1、MMP13 の発現は低下していた。*; $p < 0.05$; NS; no significant difference

(2) OA 軟骨における miRNA-146a の発現分布：*In situ* hybridization による発現解析では、変性の軽度～中等度の OA 軟骨において、miRNA-146a はほぼ全層にわたって発現していたが、特に表層で強く発現していた。また、変性の強い部位では、miRNA-146a の発現はほとんどみられなかった。クラスター形成している軟骨細胞にも miRNA-146a の発現を認めた。変性の進行した軟骨では、fibrillation

を起こしている部位にわずかに miRNA-146a の発現を認めたが、その他ほとんど認めなかった (図2)。

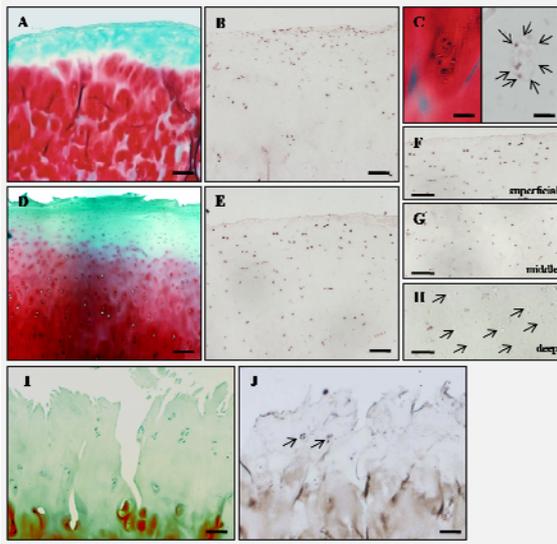


図2. miRNA-146a の発現分布. A, C, D, I : サフラニンO 染色. B, E, F, G, H, J : *in situ* hybridization. AB; Mankin score 4. DE; Mankin score 7. IJ; Mankin score 11. C; クラスタ形成している軟骨細胞にも miRNA-146a の発現を認めた. F; superficial zone. G; middle zone. H; deep zone. Deep zone では、miRNA-146a を発現している軟骨細胞は少ない (矢印).

(3)炎症性サイトカインによる miRNA-146a の発現誘導: 初代ヒト正常軟骨細胞に IL-1 β (5ng/ml) を添加し、24 時間後、RNA を回収し、real time PCR により発現を評価した。その結果、IL-1 β の添加により miRNA-146a は、MMP13 とともに有意に発現が増加した (図3)。

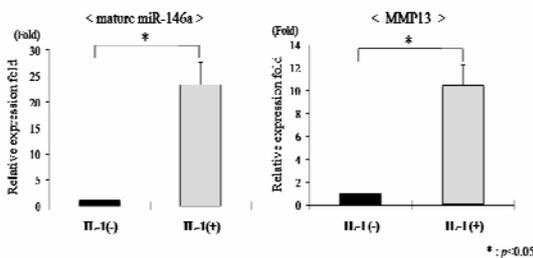


図3. 炎症性サイトカインによる miRNA-146a の発現誘導. ヒト正常軟骨細胞に IL-1 β を添加すると miRNA-146a の発現は MMP13 の発現とともに有意に増加した。*: p<0.05

近年、miRNA が様々な疾患に関与していることが注目されており、原因が明らかにされていない疾患においても、miRNA がその病態に関与していることが明らかとなってきている。本研究においても、OA 軟骨に miRNA-146 が発現していることが明らかとなり、OA の病態にも miRNA が関与していることが判明した。MiRNA-146a は、炎症反応に関与する TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)、IRAK1(interleukin-1 receptor-associated kinase 1)を標的としており、これらの発現を抑制することにより、炎症反応のネガティブフィードバックを担っているといわれている。本研究結果より、初期 OA 軟骨では、炎症性サイトカインにより軟骨細胞において miR-146 の発現が誘導され、これがネガティブフィードバックにより、軟骨細胞の炎症反応を抑制し、軟骨変性を抑制しようとしているのではないかと推察された。一つの miRNA は、複数の標的遺伝子をもち、複雑な制御網を形成しているといわれている。OA 軟骨においても、miRNA-146 は TRAF6、IRAK1 以外にもいくつかの標的遺伝子を有していると考えられ、複雑な分子ネットワークを形成し、OA の病態に関与している可能性がある。また、*in vivo* において内在性の miRNA を制御することにより治療を行う試みもなされてきている。miRNA-146 の機能を詳細に解析し、miRNA-146 を制御できれば、新たな OA の治療に発展するものと考えられる。

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1件)

- ① Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, Deie M, Adachi N, Yasunaga Y, Asahara H, Ochi M. Expression of microRNA-146 in osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* 査読あり 2009. 60(4), 1035-41.

[学会発表] (計2件)

- ① Tomoyuki Nakasa Expression of microRNA-146 in osteoarthritis cartilage 2008 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting 平成20年10月28日 San Fransisco, USA

- ② 山崎啓一郎 変形性関節症軟骨における microRNA-146 の発現 第23回日本整形外科学会基礎学術集会 平成20年10月24日 京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60467769

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：