

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659271

研究課題名（和文）変形性関節症の病態形成における microRNA の役割について

研究課題名（英文）The pathological roles of microRNAs in osteoarthritis.

## 研究代表者

酒井 忠博 (SAKAI TADAHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：60378198

研究成果の概要（和文）：変形性関節症(OA)の病態形成における microRNA(miRNA) の関与について調査した。miR-125b は正常と OA 両方の軟骨細胞で発現しており、その発現は正常軟骨細胞より OA 軟骨細胞において減少していた。さらに、OA 軟骨細胞における IL-1 $\beta$  刺激による ADAMTS4 の活性化は miR-125b の過剰発現により抑制され、抑制することで活性が上昇した。

これらの結果より、miR-125b はヒト軟骨細胞において Aggrecanase-1 (ADAMTS4)の発現調節に関与することで OA 病態形成に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The pathological roles of microRNAs in osteoarthritis were analysed. We demonstrated that miR-125b is expressed in both normal and OA chondrocytes, with lower expression in OA chondrocytes than in normal chondrocytes. Furthermore, IL-1 $\beta$ -induced activation of ADAMTS4 was downregulated by overexpression of miR-125b in OA chondrocytes. Our results suggested that miR-125b plays a role in regulating the expression of ADAMTS4 in human chondrocytes and could be involved in the pathology of osteoarthritis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	360,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：変形性関節症、軟骨細胞、microRNA、ADAMTS4

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (Osteoarthritis :OA) は関節炎の中で最も頻度が高く、プロテオグリカンやコラーゲンなどの細胞外基質の構造的な蛋白融解に続く関節軟骨の消失により特

徴づけられる。軟骨は主に type II コラーゲンと aggrecan に代表されるプロテオグリカンによって構成される。軟骨吸収には 2 つの stage があり、まず aggrecan の分解消失が起こり、続いて collagen の消失が起こる。成熟

軟骨細胞は aggrecan を再合成できるため、最初の step は可逆性だが、成熟関節軟骨の軟骨細胞は original の fiber network を再構築できないため、2 つ目の step は不可逆性となる。コラーゲンの分解は主に matrix metalloproteinases (MMPs)により行われるが、aggrecanase と呼ばれる aggrecan 分解 metalloproteinases が aggrecan 分解において重要な役割を果たすと考えられている。マイクロ RNA (miRNA) は noncoding small RNA の一種で、特定の標的 mRNA の 3'-UTR 末端の特異配列との相関を通して、mRNA の分解を促進あるいは翻訳を抑制することにより、遺伝子発現の負の調整因子として生物学的 process において重要な役割を果たしている。miRNA は一般的に RNA polymerase II により long precursors である pri-miRNAs に転写され、さらに核内で酵素 Drosha により 70 塩基の hairpin 構造に代謝される。この産物が pre-miRNA であり、細胞質に輸送され multi-domain RNase III 様の酵素 Dicer により 22 塩基の成熟 miRNAs に代謝される。それぞれの miRNA 複製体は紐とかれ、安定性の低い 5'末端をもつ strand (guide strand) が選択され RNA-induced silencing complex (RISC)と呼ばれる動的な蛋白複合体に取り込まれる。MiRNA を取り込んだ RISC の標的は miRNA の 5'末端に 2 から 8 塩基のほぼ完全な相補性を有する配列( seed region と呼ばれる配列)がその 3'末端に存在する mRNA です。RISC は標的 mRNA に亀裂を入れるか、翻訳を阻害することにより、標的遺伝子の発現を抑制します。mRNA を分解するか、あるいは翻訳を阻害するかは、miRNA とその標的の相補性の程度により決定されるとされている。ほぼ完璧な相補性があれば、mRNA に亀裂がはいり、完全に分解されるのに対して、部分的な相補性であれば翻訳阻害を起こすと考えられている。脊椎動物では、ほとんどの case において、翻訳の阻害が行われていると考えられている。翻訳阻害に加えて、miRNA の相互作用は deadenylation や decapping を修飾し、急速な mRNA の衰退を

起こすと考えられている。最近の研究で、ヒト OA 軟骨細胞における miRNA の発現 profile が解明されてきたが、ADAMTS4 発現の制御をおこなう特定の miRNA に関しては一定の見解が得られていない。

## 2. 研究の目的

変形性関節症(OA)の病態形成における microRNA(miRNA) の関与について調査すること。最近の研究で、ヒト OA 軟骨細胞における miRNA の発現 profile が解明されてきたが、ADAMTS4 発現の制御をおこなう特定の miRNA に関しては一定の見解が得られていない。本研究では、ADAMTS4 に注目し、特定の miRNA 発現における IL-1 $\beta$  の効果を決定し、人 OA 軟骨細胞において特定の miRNA により ADAMTS4 の発現が制御されるかを評価する。

## 3. 研究の方法

Aggrecanase-1 (ADAMTS4) を標的とする miRNA をコンピューター解析を用いて推測した。ヒトOA軟骨細胞と正常軟骨細胞をIL-1 $\beta$ で刺激し、各遺伝子発現をRT-PCRにて定量した。また当該miRNAが標的配列に相補的に結合することで標的遺伝子発現を抑制することを証明するために、luciferase assayや precursor miRNA, antisense miRNAを用いて調査した。ADAMTS4 の蛋白発現をWestern blottingにて、活性をAggrecanase-1 Assay Kitにて測定した。

OAと診断された患者に対する人工膝関節置換手術時に軟骨組織を採取した。関節軟骨組織を1mm<sup>3</sup>以下の小切片に切断し、1mg/ml Collagenaseに溶解し、10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中にて37°Cで16時間振動させながら培養した。単離したヒトOA関節軟骨細胞をcell strainerに通して採取した。抽出した細胞は10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (Gibco-BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を含む培養液中で37°C、保湿5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養し、培養液は週に2回交換した。

正常軟骨細胞はTAKARA BIO INC社より

Normal Human Articular Chondrocytes, Knee cells を購入して使用した。

本研究では単層培養で維持した初代細胞のみを使用した。

miRNAの抽出：12-well platesで培養した軟骨細胞を一晩 serum starved とした後、recombinant human IL-1 $\beta$  (5ng/ml ; PeproTech, Rocky Hill, NJ) で一定時間刺激した。mirVana miRNA Isolation kit (Applied Biosystems)を使用してmiRNAを含むTotal RNA を抽出した。またmiR-125bを標的としたpre-miRNA (miRNA precursor) あるいは anti-miRNA (miRNA inhibitor) 分子、あるいは pre-miRの negative control と anti-miRの negative control (Applied Biosystems) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用して遺伝子導入した。遺伝子導入して48時間後、serum 遺伝子導入した軟骨細胞を一晩 serum starved とし、recombinant human IL-1 $\beta$  (5ng/ml) にて刺激を行い、24時間後に細胞を採取し、total RNA と 蛋白を抽出した。

RT-PCR: Total RNA中10ngをmiRNAとして TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用し逆転写した。コントロールと実験サンプルからmiRNAを miR-125b stem loop RT primer, 10 $\times$ RT buffer, 100mM dNTPs, 50 units MultiScribe reverse transcriptase, and 20 units of RNase inhibitorを使用して逆転写し、microRNA 産物を得た。Complementary DNA をHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用して精製した。コントロールと実験サンプルからcomplementary DNAの逆転写を 2 $\mu$ l of 10 $\times$ Reverse Transcription Buffer, 0.8 $\mu$ l of 25 $\times$ dNTP, 2 $\mu$ l of 10 $\times$ Random Primers, 1 $\mu$ l of 50 units MultiScribe Reverse Transcriptase and 1 $\mu$ l of RNase inhibitor 中でat 25 $^{\circ}$ C for 10 minutes, 37 $^{\circ}$ C for 120 minutes and 85 $^{\circ}$ C for 5 seconds で行い、cDNAを得た。

ADAMTS4とADAMTS5 mRNA の発現を TaqMan Gene Expression Assay(Applied Biosystems)、mature miRNA の発現を TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems)を使用して定量した。それぞれGAPDHとRNU6Bの

発現を内在性コントロールとして使用した。増幅期のexponential期で閾値を観察し、相対発現レベルの定量を  $\Delta\Delta C_t$  法にて行った。それぞれの control sampleの値を1とし、標的遺伝子の変化値を計算した。

Western blotting: 完全細胞溶解液をRIPA Lysis Buffer (sc-24948; Santa Cruz Biotechnology) を使用して準備し、還元した条件でsodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE)にかけ、ニトロセルロース膜(Bio-Rad)に移した。膜をnonfat dry milk powder を溶かしたTris buffered saline containing 0.1% Tween 20中でブロックし、1000倍に希釈したADAMTS4 (Cosmo Bio Co., LTD) あるいは  $\beta$ -Actin (Cell Signaling Technology)に対するポリクローナル抗体でprobeした。免疫反応蛋白をHRPを結合した2次抗体で可視化し、傾向発色物質(Thermo Scientific)にて強調した。画像を AE-9150 Ez-Capture II (Atto) にて撮影し、吸光度をCS Analyzer ver 3.0 (Atto) にて解析した。背景を補正してそれぞれのバンドをスキャンし、値を平均化し、平均  $\pm$  SDにて表示した。

#### 4. 研究成果

コンピューター解析により、ADAMTS4 mRNA の 3'末端配列の一部に miRNA-125b の配列の一部が相補性をもつことが分かった。miR-125b の発現は正常軟骨細胞と比較して OA 軟骨細胞で低下していた。OA 軟骨細胞では IL-1 $\beta$ により ADAMTS4 は発現増加し、miR-125b は抑制された。miR-125b の過剰発現は ADAMTS4 mRNA の 3'-UTR 末端配列を含む reporter construct の活性を増加させ、OA 軟骨細胞における IL-1 $\beta$ による ADAMTS4 の蛋白産生と活性の増加を阻害した。

luciferase assay に関しては positive な結果を得ていたが、後の検討により vector の construct に問題があると考えられたため、現在新しい construct を作成して再検中である。

また ADAMTS4 の酵素活性を培養上清を用

いた市販の Aggrecanase-1 Assay Kit にて測定し、これも positive な結果を得ているが、Aggrecanase の酵素活性の計測方法については他に種類がほとんどなく、一般的に認められるかどうかを検討中である。

以上の結果より miR-125b は正常と OA 両方の軟骨細胞で発現し、その発現は正常と比較して OA 軟骨細胞で低かった。さらに、OA 軟骨細胞における IL-1 $\beta$  刺激による ADAMTS4 の活性化は miR-125b の過剰発現により抑制され、抑制することで活性が上昇した。以上より、miR-125b はヒト軟骨細胞において ADAMTS4 の発現調節に関与していると考えた。

他にも、同様の手法によって近年 OA の病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) に関する調査検討をしており、miR-23b と miR-27b がその発現調整に関与している可能性があることについても新たな知見を得ており、今後も検討を続けていく予定である。

#### 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 0 件)

投稿中

[学会発表] (計 4 件)

1. Tetsuya Matsukawa, Tadahiro Sakai, Hideki Hiraiwa, Takashi Hamada, Takaaki Ohmachi, Yohei Ohno, Motoshige Nakashima, Shinya Ishizuka, et al. MicroRNA-125b regulates the expression of Aggrecanase-1 (ADAMTS4) in human osteoarthritic chondrocytes. Orthopaedic Research Society 2012. 2. 4 Spotlight Session No. 0075

2. Shinya Ishizuka, Tadahiro Sakai, Hideki Hiraiwa, Takashi Hamada, Takaaki Ohmachi, Yohei Ohno, Motoshige

Nakashima, Tetsuya Matsukawa, et al. MicroRNA-23b and 27b regulate both Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  and endochondral ossification related gene expressions in osteoarthritic chondrocytes.

Orthopaedic Research Society 2012. 2. 4 Spotlight Session No. 0074

3. 松川哲也、酒井忠博、平岩秀樹、濱田恭、大間知孝顕、中島基茂、他人 OA 軟骨細胞における microRNA-125b による Aggrecanase-1 (ADAMTS4) の発現制御 第 25 回日本軟骨代謝学会 2012. 3. 9~10
4. 石塚真哉、酒井忠博、平岩秀樹、濱田恭、大間知孝顕、中島基茂、他人 microRNA-23b, 27b は OA の軟骨細胞において Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  (HIF-2 $\alpha$ ) 及び軟骨内骨化関連遺伝子の発現を制御する。 第 25 回日本軟骨代謝学会 2012. 3. 9~10

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒井 忠博 (SAKAI TADAHIRO)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号：60378198

##### (2) 研究分担者

平岩 秀樹 (HIRAIWA HIDEKI)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70566976

濱田 恭 (HAMADA TAKASHI)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：90566978

山本 隆一郎 (YAMAMOTO RYUICHIRO)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：80586743

##### (3) 連携研究者

なし