

## 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5月10日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659273

研究課題名（和文） microRNA を用いた変形性関節症の治療戦略

研究課題名（英文） Therapeutic strategy for osteoarthritis by evaluation and regulation of microRNA

研究代表者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70177244

研究成果の概要（和文）：OA患者の血液、尿中のmicroRNA(miRNA)を解析し、早期診断のための新たなbiomarkerとなるか検討し、骨髄間葉系幹細胞からの分泌miRNAをOAモデル動物に関節内投与し、治療効果を検討することを目的とした。OA患者の血清中のmiRNA-146、223についてPCRを行ったところ、有意差は認めなかった。OAモデルラットへの分泌型miRNAの関節注射では、明らかな差は認めなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to examine the expression level of miRNA in serum and urine from osteoarthritis (OA) patients and determine its usefulness as biomarker of diagnosis of OA. In addition, secreted miRNA from mesenchymal stromal cells was injected into OA rat, and examine the therapeutic effect. In real time PCR analysis, there is no significant difference of expression of miRNA-146 and miRNA-223 between healthy subjects and OA patients. In animal model, there was no significant therapeutic effect of administration of secreted miRNA from mesenchymal stromal cell in OA rat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	300,000	2,400,000

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：変形性関節症、microRNA、軟骨、滑膜、biomarker

## 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 OA は、はかり知れない苦痛と運動機能障害を与え、総人口 125,000 万人のうち OA の患者数は 1,200 万人で要治療者は 700 万人と言われ

ている。しかし、その原因は解明されておらず、また、破壊されてしまった関節に対しては、人工関節しか有効な治療法がないのが現状である。すなわち、早期に OA の診断、予後を予測し、OA の進行を予防できれば、OA

により疼痛・機能障害に苦しむ患者への恩恵ははかりしれない。

近年、タンパク質に翻訳されない non-coding RNA である microRNA(miRNA)が、がん、白血病、ウイルス感染症といった様々な疾患にも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。OAにおいても、miRNAがその病態に関与している報告が散見されるようになってきている。これまで、血液中、尿中の軟骨分解産物を測定することによるOAの早期診断の試みが散見されているが、有効とは言い難く、新たな biomarker が必須である。また、軟骨の変性に、miRNA が強く関与していることが明らかとなっており、軟骨変性部に対してmiRNAを制御できればOAの治療法に発展する可能性がある。早期にOAと診断し、低侵襲で有効な治療を行えば末期OAへの進行を抑え、人工関節置換術が必要である症例も減ることとなる。

## 2. 研究の目的

OA患者より、血清・尿を採取し、RNAを抽出し、real time PCR法により、OA患者に特異的に検出できるmiRNAを同定する。同定したmiRNAにつき、OAの各グレードにおいて発現量を解析し、OAの早期診断、予後予測の biomarker として有用であるか検討する。ラットOAモデルの膝関節にOAに抑制的に働くmiRNAを投与し、OA進行防止効果をみる。

## 3. 研究の方法

### (1) OA患者の血清・尿に特異的に検出される miRNA の同定

OA患者より、血清・尿を採取し、RNAを抽出する。miRNAマイクロアレイ、real time PCRを用いて、健常者と比較し、OA患者の血清・尿に特異的に検出される miRNA を同定する。同定されたmiRNAにつき、Kellgren Lawrence 分類グレード0~4までのOA患者で、血清・

尿からRNAを採取し、real time PCRを用いて発現量の比較を行う。さらに、現在OAの診断で用いられている biomarker であるケラタン硫酸、COMP、CTX IIなど測定し、同定されたmiRNAと比較を行う。

### (2) 合成2本鎖miRNA-リポソーム複合体の OAモデルラットへの関節内投与

OAモデルラットを作製し、合成2本鎖miRNAをリポソームに封入し、動物モデルに投与する。良好な結果が得られれば、磁性体を同時にリポソームに封入し、磁気ターゲティングが可能か検討する。

## 4. 研究成果

### (1) OA患者の血清・尿に特異的に検出される miRNA の同定

OA患者19名、健常者6名から末梢血を採取し、比重遠心法を用いて血清を分離してRNAを抽出した。このRNAを用いて、これまでOA患者の末梢血単核球中に高発現しているとされているmiRNA-146a、miRNA-223についてReal time PCRを行い、発現量を解析した。これらのmiRNAは、OA、患者の血清中では、発現量が低い傾向にあったが、統計学的有意差は認めなかった。これらの血清中に存在するケラタン硫酸についてもELZA法を用いて解析したが、明らかな相関は認めなかった。健常者、OA患者、関節リウマチ(RA)患者から尿を採取し、miRNAマイクロアレイを行い、特異的に発現するmiRNAの同定を試みた。miRNAマイクロアレイにて各尿中に含まれるmiRNAのプロファイルは、健常人の尿に比べて、534種類のmiRNAがOAおよびRA患者の尿で2倍以上増加していた。その中でも健常人と比べてOA患者の尿のみで増加しているmiRNAは56種類認めた。

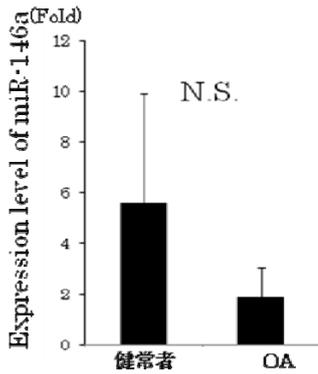


図1. 血清中のmiRNA-146aの発現。健常者よりOA患者でmiRNA-146aの発現が低い傾向を認めた。

(2) 合成2本鎖miRNA-リポソーム複合体のOAモデルラットへの関節内投与

人工的にリポソーム内に合成miRNAを封入することは困難であるため、エクソソーム中に含まれるmiRNAをOAモデル動物に投与し、治療効果を検討した。これまで、骨髄間葉系幹細胞(MSC)が軟骨修復に用いられており、その有用性が報告されている。そこで、MSCから分泌されるエクソソーム中のmiRNAに注目した。ヒトMSCを播種し、3日後の培地を回収し、Exoquickを用いて、エクソソームを回収した。まず、これが、軟骨に対して有用であることを示すため、アテロコラーゲンゲルにヒトOA軟骨細胞を混合し、3週間、3次元培養を行った。この間、1週間毎に培地中にエクソソームを混入した。3週間後、軟骨細胞数を計測したところ、MSC由来のエクソソームを混入したもので、有意に細胞数が増加していた。

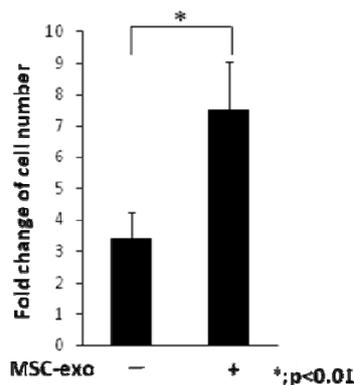


図2. OA軟骨細胞の3次元培養におけるMSC由来の分泌miRNAの効果。MSC由来のエクソソームにより、軟骨細胞数は増加していた。

続いて、動物モデルを作製した。モノヨード酢酸を10週齢のLewisラットの膝関節に注射した。2週間後、MSC由来のエクソソームを関節注射した。対照群は、PBSを関節注射した。3週間後、屠殺し、膝関節を採取し、切片を作製してサフラニンO染色を行い評価した。両群とも関節軟骨の基質の染色性が低下していたが、明らかな差は認めなかった。両群とも明らかな滑膜炎は認めなかった。

本研究では、統計学的有意差は認めなかったが、OA患者の血清中の分泌miRNAは低い傾向にあった。一方細胞内のmiRNAは高発現しており、健常者では、末梢血中単核球からのこれらのmiRNAが細胞外に分泌され、OA患者では、細胞外に分泌されにくいという可能性も考えられる。しかし、本研究を通じて、血清から質の高いRNAが抽出できておらず、このことが結果に影響していることも考えられる。血清中からのRNA抽出方法の検討が必要である。

尿中の分泌miRNAでは、健常者、OA、RAでの比較で、OA患者のみで発現量が高いmiRNAがみられた。尿中には、体内で分泌された様々な因子が混入しており、従来、軟骨、滑膜等の分解産物が、OAのbiomarkerとして用いられてきた。今回、検出されたmiRNAの由来を今後調べ、OAの各グレードの患者やその症状とともに評価していくことで、OAのbiomarkerとしての有用性を確認していく必要がある。

本研究では、MSC由来の分泌miRNAをOAモデルラットの膝関節に注射し、治療効果を検討したが、対照群と比較し、差は認めなかった。しかし、軟骨細胞に対しては、良い影響を与えており、今後投与量、時期を検討して

いく必要がある。また、OAモデルに関しても、モノヨード酢酸だけではなく、前十字靭帯切断モデル等でも同様の実験を行なっていく予定である。

#### 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)

[学会発表] (計0件)

[その他]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70177244

##### (2) 研究分担者

下瀬 省二 (SHIMOSE SHOUJI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30304439

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：70444685

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：60467769

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：