

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659719

研究課題名（和文） 血漿・関節液・尿・唾液中マイクロ RNA を用いた骨軟骨・靭帯損傷の診断と病態解析

研究課題名（英文） Analysis for the mechanism of the repair from injury of bone, cartilage and ligament using fluid microRNAs

研究代表者

吉富 啓之 (YOSHITOMI HIROYUKI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50402920

研究成果の概要（和文）：

本研究では骨折を有する患者の血漿にて変化しているマイクロ RNA を網羅的に検索し 6 種類の血漿中マイクロ RNA が健常人と比して有意に変化していることを見出した。このうち血漿中 miR-D は骨折の受傷後 24 時間で血中濃度が健常人より有意に低下していた。miR-D の抑制が骨折の治癒に関与するかを明らかにするために、miR-D の発現を抑制する核酸を骨折モデルマウスに全身投与したところ、仮骨形成と血管新生が有意に増加し骨折治癒が促進した。これらの結果は、骨折の治癒過程におけるマイクロ RNA の新たな役割を明らかにすると同時に、血漿中マイクロ RNA の骨折へのバイオマーカーとしての有用性および新たな骨折治療の可能性を示す。

研究成果の概要（英文）：

We identified six microRNAs (miRs) that were significantly changed in the plasma of patients with a bone fracture compared to that of healthy volunteers (HVs). Among these, the plasma level of miR-D significantly decreased 24 h after the fracture. To investigate the possible involvement of miR-D in the bone repair, we administrated anti-miR-D nucleotides to the model mice of bone fractures. Callus formation and neovascularization were increased in the treated mice. This study demonstrated a new role of miRNAs in the process of bone repair and a possibility of an alternative treatment for bone fracture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科

キーワード：マイクロ RNA、骨折治療、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は哺乳類に存在する内在的機構で、アポトーシスや細胞分化、発生、癌などの多様な生命現象を制御している (Bartel DP, et al. 2004)。血漿中にはマイク

ロ RNA が安定な形で存在する事が報告され、特に癌の分野では癌特異的なマーカーとして有用である事が示されていた (Mitchell PS, et al. 2008)。我々は血漿だけでなく関節液中にもマイクロ RNA が安定した形で存在し、

関節リウマチおよび変形性関節症のバイオマーカーとして有用であることを示した (Murata K, et al. 2010)。一方で、骨折や軟骨損傷、靭帯損傷における分泌マイクロ RNA の報告はほとんど認められなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は骨軟骨に損傷を有する患者において変化している血漿中マイクロ RNA などの分泌マイクロ RNA を明らかにし、それらのマイクロ RNA がどのように骨関節疾患に関与しているのかを明らかにすることで、新たな診断や治療につなげることを目的とし研究を行った。

## 3. 研究の方法

骨折や軟骨、靭帯損傷を有する患者の血漿中マイクロ RNA をリアルタイム PCR 法にて測定し、患者にて変化しているマイクロ RNA の同定を試みた。また、唾液、尿など非侵襲的に採取可能な体液中でのマイクロ RNA を測定し同様の変化が認められるか検討を行った。

さらに、変化を認めたマイクロ RNA が骨関節損傷からの回復にはたす役割を明らかにするために、マイクロ RNA を抑制する核酸試薬をモデルマウスに投与し損傷からの回復機序の解明を試みた。骨癒合の過程を、マイクロ CT、レントゲン、病理組織学などの手法で解析した。

## 4. 研究成果

唾液は唾液自体の分泌量が個人により異なり、測定に十分に量が採取できない場合が時折認められたことから、採取は非侵襲的であるが一般的な検査には不向きであると考えられた。尿に関しては、目的とするマイクロ RNA の増幅が悪く、骨関節疾患の診断には不向きであると考えられた。マイクロ RNA の測定自体は可能であったため、腎・尿路系の疾患に関しては関与する可能性があると考えられた。

リアルタイム PCR 法で血漿中マイクロ RNA を測定し、骨折を有する患者において変化しているマイクロ RNA を 6 種類同定できた (図 1)。そのなかの 1 つである miR-D は骨折の受傷後 2 4 時間での血漿中濃度が健常人と比較して有意に低下していた。

miR-D の抑制が骨癒合に関してどのような働きを持つのかを明らかにするために、miR-D を抑制する核酸製剤を骨折モデルマウスに全身投与したところ、マイクロ CT、レントゲン、病理組織学的解析等にて仮骨形成、骨

癒合および血管新生の有意な促進を認めた。また、核酸製剤の骨折部位への局所投与においても同様の効果が確認された。

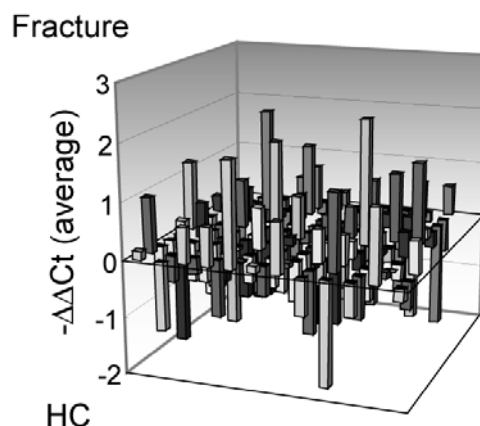


図 1 骨折患者と健常人での血漿中マイクロ RNA の発現。リアルタイム PCR 法にて測定した。うち 6 種類にて骨折患者の血漿中で変化を認めた。

この様に本研究では骨関節疾患を有する患者で変化している分泌マイクロ RNA を解析することで、マイクロ RNA が骨折治癒過程において果たす役割を明らかにすることができた。またこの知見は骨折治癒に対する新たな治療法へとつながる可能性がある。これらの成果は現在投稿中である。

## 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 7 件)

- (1) Tanida S, Yoshitomi H, Ishikawa M, Kasahara T, Murata K, Shibuya H, Ito H, Nakamura T. IL-27-producing CD14+ cells infiltrate inflamed joints of rheumatoid arthritis and regulate inflammation and chemotactic migration. Cytokine. 2011 55(2):237-44. 査読有.  
doi: 10.1371/journal.pone.0037163
- (2) Terao C, Ohmura K, Katayama M, Takahashi M, Kokubo M, Diop G, Toda Y, Yamamoto N; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura R, Shimizu M, Gut I, Heath S, Melchers I, Manabe T, Lathrop M, Mimori T, Yamada R, Matsuda F. Myelin

basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis—a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One*. 2011;6(6):e20457. 査読有.

doi: 10.1097/BOR.0b013e32832a2e2d

- (3) Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Kume N, Yoshitomi H, Mitsuoka H, Tanida S, Murata K, Shibuya H, Kasahara T, Kakino A, Fujita Y, Sawamura T, Yasuda T, Nakamura T. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal is a potent biomarker and therapeutic target for human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(4):1024-34. 査読有. doi: 10.1002/art.33452
- (4) Murata K, Kitaori T, Oishi S, Watanabe N, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Kasahara T, Shibuya H, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T, Ito H. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One*. 2012;7(5):e37163. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0037163
- (5) Yamada M, Aoyama T, Mori S, Nishiguchi S, Okamoto K, Ito T, Muto S, Ishihara T, Yoshitomi H, Ito H. Objective assessment of abnormal gait in patients with rheumatoid arthritis using a smartphone. *Rheumatol Int*. 2012;32(12):3869-74. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0037163
- (6) Nishiguchi S, Yamada M, Nagai K, Mori S, Kajiwara Y, Sonoda T, Yoshimura K, Yoshitomi H, Ito H, Okamoto K, Ito T, Muto S, Ishihara T, Aoyama T. Reliability and validity of gait analysis by android-based smartphone. *Telemed J E Health*. 2012 ;18(4):292-6. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0037163
- (7) Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. *PLoS One* 2013;8(3):e59341. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0059341

[学会発表] (計 16 件)

- (1) 吉富 啓之 伊藤 宣 中村孝志. 強直性

脊椎炎に対する レミケードの使用経. 京整会RA懇話会. 2011.7.3. 京都.

- (2) 吉富啓之、伊藤宣、中村孝志. 関節リウマチ滑膜にはIL-27産生性CD14陽性細胞が浸潤し炎症や遊走を制御する. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011. 11. 28. 千葉.
- (3) 吉富啓之、村田浩一、伊藤宣、中村孝志. 関節疾患と分泌microRNA. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011. 10. 20. 前橋.
- (4) 伊藤宣、吉富啓之、中村伸一郎、中村孝志. 施行した人工関節の種類によってその後の死亡率に差があるのか—人工関節置換術後生存率調査— 第55回日本リウマチ学会学術集会 2011. 7. 18. 神戸.
- (5) 村田浩一、吉富啓之、伊藤宣、中村孝志. 血漿・関節液マイクロRNAは関節リウマチの疾患バイオマーカーとなりうるか?. 第55回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2011.7.18. 神戸. JCR2011 ワークショップ賞受賞
- (6) 伊藤 宣. 生物製剤使用中患者の手術.—生物学的製剤の選択と実践— 第21回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 2011.9.3. 大阪
- (7) Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Yoshitomi H, Murata K, Tanida S, Shibuya H, Kume N, Sawamura T, Nakamura T. A crucial role for lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal on cartilage destruction in inflammatory arthritis. 58th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2012.2.6, San Francisco, USA
- (8) Murata K, Yoshitomi H, Ishikawa M, Shibuya H, Ito H, Matsuda S. Comprehensive microRNA analysis identifies miR-24, miR-26a, and miR-125a-5p as plasma biomarkers for rheumatoid arthritis. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting. 2012.11.11. Washington DC. USA.
- (9) 村田 浩一、北折 俊之、中村 孝志、伊藤 宣. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 第30回骨代謝学会. 2012.7.20. 東京.
- (10) Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *GCOE リポート* 2012. 2012.10.5. 淡路.

- (11) 村田 浩一、伊藤 宣、北折 俊之、吉富 啓之、石川 正洋、渋谷 秀幸、布留 守敏、中村 孝志、松田 秀一. SDF-1 は軟骨細胞のアクチン細胞骨格を制御し、肥大化を促進する. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 2012.10.27. 名古屋.
- (12) 吉富啓之、小林志緒. Analysis of synovial tissue with inflammation of rheumatoid arthritis as a tertiary lymphoid organ. 2012.12.5. 第41回日本免疫学会. 神戸.
- (13) Ishikawa M, Ito H, Akiyoshi M, Murata K, Tanida S, Shibuya H, Kasahara Y, Yoshitomi H, Nakamura T. A crucial role for lectin-like oxidized LDL receptor-1 signal on synovial inflammation in RA. The Annual European Congress of Rheumatology EULAR2012, June 6~9, 2012.6.6, Berlin, Germany.
- (14) Ishikawa M, Ito H, Yoshitomi H, Akiyoshi M, Murata K, Furu M, Matuda S. A crucial role for lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 signal in rheumatoid arthritis. 15th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR) 2012.9.11, JORDAN
- (15) 伊藤宣. 生物製剤使用中患者の手術 - 生物学的製剤の適正な使用と諸問題- 第22回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 2012.9.1. 大阪.
- (16) Murata K, Kitaori T, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Ishikawa M, Shibuya H, Matsuda S. Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. 59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2013.1.26. San Antonio, USA. NIRA finalist.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~seikeika/fundamental/nankotsu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉富 啓之 (YOSHITOMI HIROYUKI)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：50402920

### (2) 研究分担者

伊藤 宣 (ITO HIROMU)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：70397537

(3) 連携研究者  
なし