

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592234

研究課題名(和文)分泌型マイクロRNAによる血管新生を基軸とした運動器損傷の新たな治療戦略

研究課題名(英文)Therapeutic strategy based on angiogenesis induce by microRNA in orthopaedic field

研究代表者

中佐 智幸(Nakasa, Tomoyuki)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：60467769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：組織修復に重要な血管新生を促進するmicroRNA(miRNA)の運動器疾患に対する治療効果を検討した。特に細胞から分泌させるmiRNAに注目した。健康人より採取した末梢血単核球を低酸素培養し、分泌されたmiRNAをマイクロアレイにより網羅的に解析し特異的発現パターンを示すmiRNAを同定した。これらのmiRNAを線維芽細胞に過剰発現させたところ、有意に細胞増殖が亢進した。また、ラットを用いて腱損傷、難治性骨折、半月板損傷の動物モデルを作製し、血管新生促進作用を有するmiRNAを投与したところ、いずれの動物モデルも良好な治療効果を示した。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic effect of microRNA (miRNA) which play a role in angiogenesis on injury in orthopaedic field. Especially, we focused on secreted miRNAs from cell. Peripheral blood mononucleated cells were isolated from healthy subjects, and cultured. Stimuli by hypoxia environment was given during culture, and the medium with or without hypoxia were analyzed using miRNA microarray. Several miRNAs showed specific expression pattern, and over expression of these miRNAs in fibroblast induced cell proliferation. In vivo, administration of miRNA related to angiogenesis into rat model of meniscus, tendon injury and atrophic non-union showed successful results.

研究分野：四肢機能再建学

キーワード：microRNA 血管新生 エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科領域においては様々な組織損傷が存在し、軟骨などの特殊な組織を除いて血管は必ず存在している。組織を構成する細胞や、成長因子等の供給のため、血管は組織修復には不可欠であり、これまで、血管新生を促進させるために細胞移植などの治療法が開発されてきた。我々は、近年注目されている non coding RNA である microRNA(miRNA)に注目し、変形性関節症、関節リウマチといった様々な運動器疾患に miRNA の発現異常が関与していることを示し、また、合成 miRNA の生体への投与により、組織修復がなされることを報告してきた。さらに、miRNA は、細胞から分泌され、体内を循環し、情報伝達を行っているといわれている。細胞から分泌される miRNA を治療に応用できれば新たな運動器の治療戦略となり得る。

## 2. 研究の目的

本研究では、組織修復に重要な血管新生を促進する microRNA(miRNA)を筋損傷、靭帯損傷、骨折部等へ注射し、治療効果を検討する。その際、既存の合成 miRNA ではなく、血管新生を誘導するような分泌型 miRNA を様々な条件下で、細胞から分泌させ、もっとも血管新生に有効である分泌型 miRNA を探索する。健常人より採取した末梢血単核球を播種し、これに低酸素、無血清等の外的刺激を加え、その培地から抽出したエクソソームの血管新生促進作用を解析する。また、血管新生促進作用以外にも、分化能促進効果、抗炎症作用等についても検討していく。最も血管新生促進作用を認めたエクソソームを、運動器損傷モデル動物に投与し、その治療効果の評価する。合成 miRNA ではなく、細胞から分泌される miRNA では、早期の臨床応用への展開も期待でき、本研究により、分泌型 miRNA による運動器疾患に対する新たな治療を開発する。

## 3. 研究の方法

(1) 組織修復を促す分泌 miRNA の解析  
健常成人より、末梢血を採取し、末梢血単核球 (PBMC) を分離する。これを播種し、接

着したことを確認後、低酸素状態 (2%) のインキュベーターで 24 時間培養を行う。培地を回収し、培地に含まれる miRNA の解析を行う。培地を 6000rpm で 90 分間超遠心し、得られたペレットを解析に用いた。ペレットから RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイを行った。また、マイクロアレイで発現が上昇していた miRNA につき、合成 miRNA を線維芽細胞に lipofection 法により transfection し、細胞増殖能を検討した。また線維芽細胞に得られた培地を添加し、同様に細胞増殖能を検討した。

(2) 動物モデルにおける血管新生を介した miRNA による治療効果の検討

①アキレス腱損傷モデル・・・12 週齢ラットのアキレス腱を露出し、腱中央部で切離した後、6-0 ナイロン糸で縫合した。皮膚を閉じた後に、アテロコラーゲンと混合した合成 miRNA を局所注射した。2、6 週で組織学的評価、力学試験、12 週で組織学的評価を行った。

②半月板損傷モデル・・・12 週齢ラットの内側半月板の無血行野に縦断裂を加え、アテロコラーゲンと混合した合成 miRNA を関節注射した。4 週、12 週で組織学的評価、遺伝子発現解析を行った。

③難治性骨折モデル・・・12 週齢ラットの大腿骨骨幹部を骨折させ、髓腔を wire で固定した後、骨折部の骨膜を全周性に焼灼した。直後にアテロコラーゲンと混合した合成 miRNA を注射した。経時的にレントゲンを撮影し、8 週で組織学的評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 組織修復を促す分泌 miRNA の解析  
miRNA マイクロアレイの結果、特異的発現パターンを示す miRNA が確認できた (図 1)。その中で、miRNA-23a、miRNA-20b、miRNA-106a に着目した。これらを線維芽細胞に強制導入すると、細胞増殖が促進された (図 2)。また、低酸素状態にした培地から超遠心後に得られたペレットを線維芽細胞に添加したところ、同様に細胞増殖が促進された (図 3)。これらの結果から低酸素状態にした細胞から分泌される miRNA は、組織修復に有効である可能性が示唆された。

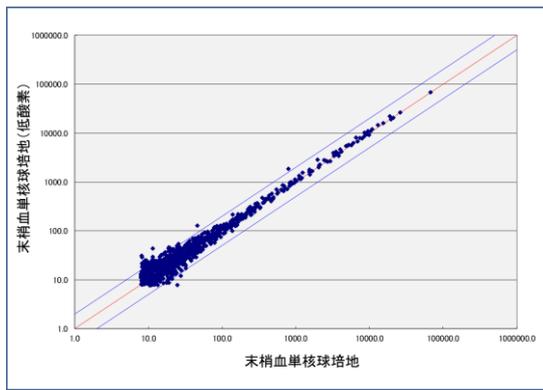


図 1. 低酸素培養と通常条件で培養した末梢血単核球の培地による miRNA マイクロアレイ結果

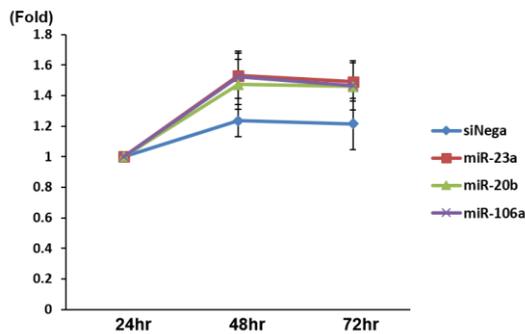


図 2. miRNA-23a、miRNA-20b、miRNA-106a による細胞増殖促進硬化

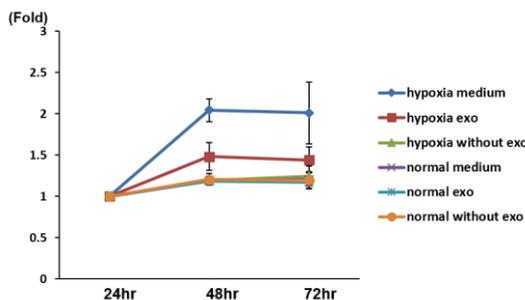


図 3. 低酸素培養後の培地による線維芽細胞増殖促進効果。

(2) 動物モデルにおける血管新生を介した miRNA による治療効果の検討

①アキレス腱損傷モデル・・・血管新生促進作用を有する miRNA-210 を投与した。2 週では、miRNA を投与すると有意にアキレス腱の破断強度が増強していた (図 4)。組織学的評価では、2 週で良好な血管形成を認め、6、12 週では良好なアキレス腱修復像を呈していた (図 5)。

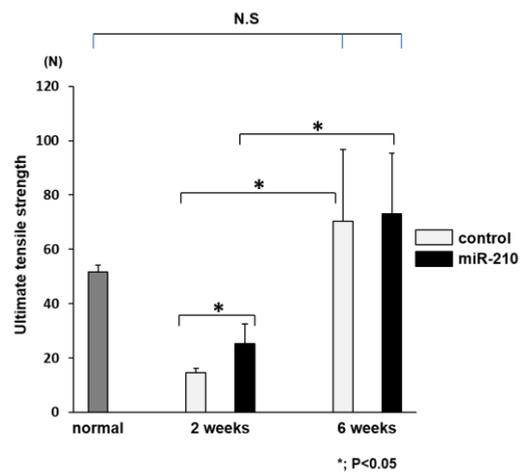


図 4. 力学的試験

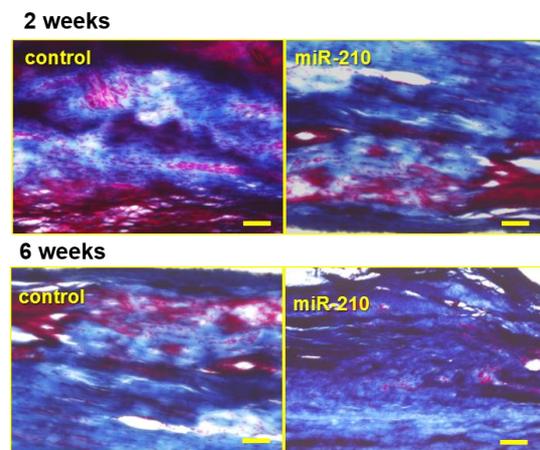


図 5. 2 週、6 週におけるアキレス腱組織像。マッソントリクローム染色。

②半月板損傷モデル・・・血管新生促進作用を有する miRNA-210 を投与した。4 週では、miRNA を投与した群では、半月板修復を認め、real time PCR では、FGF2、VEGF、Col2a1 の発現が上昇していた (図 6)。12 週では、miRNA を投与した群では、半月板が修復されたことから、大腿骨・脛骨内側顆の軟骨変性が軽度であった。

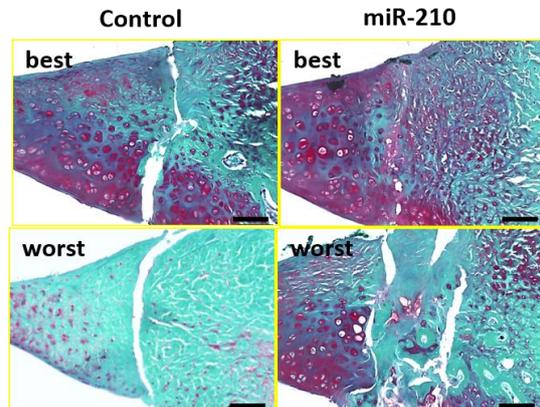


図 6. 4 週での組織像。サフラニン O 染色

③難治性骨折モデル・・・血管新生能と骨分化促進作用を有する miRNA を探索するため、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を骨分化誘導を行い、分化前後で RNA を抽出し、miRNA アレイカードで、どのような miRNA の発現が変動するか解析した。この中で、血管新生阻害・骨分化阻害作用を有する miRNA-222 に注目した。ラット難治性骨折モデルに、miRNA-222 のアンチセンスをアテロコラーゲンに混合して投与した。経時的にレントゲンを見ると、良好な骨形成が進行し、8 週でレントゲン、CT にて骨癒合を確認した (図 7)。一方非機能性 DNA を投与した対照群では、骨癒合は確認できなかった。組織学的評価では、良好な骨形成とともに血管新生も促進されていた (図 8)。

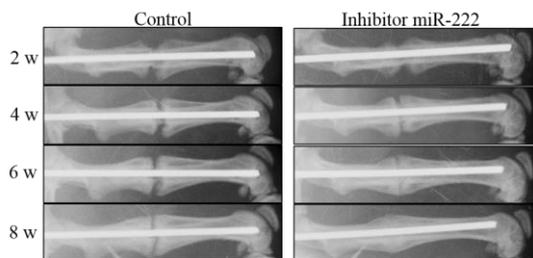


図 7 単純レントゲン写真

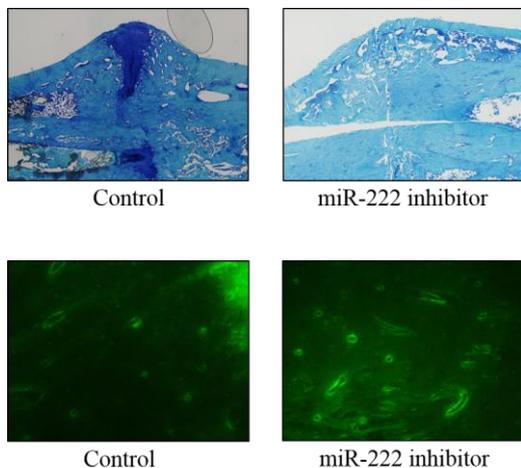


図 8.8 週での組織像。上段；トルイジンブルー染色、下段；Isolectin B4 染色 (血管新生)

これらの結果から、血管新生能を有する miRNA は、運動器における組織修復に有効であることが確認でき、さらに末梢血単核球を低酸素状態にして得られる分泌 miRNA も組織修復に応用できるものと考えられた。

## 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 2 件)

- 1) Usman MA, Nakasa T, Shoji T, Kato T, Kawanishi Y, Hamanishi M, Kamei N, Ochi M. The effect of administration of double stranded MicroRNA-210 on acceleration of Achilles tendon healing in a rat model. Journal of Orthopaedic Science. 査読有り 2015 Mar 11. [Epub ahead of print]
- 2) Kawanishi Y, Nakasa T, Shoji T, Hamanishi M, Shimizu R, Kamei N, Usman MA, Ochi M. Intra-articular injection of synthetic microRNA-210 accelerates avascular meniscal healing in rat medial meniscal injured model. Arthritis research & therapy. Arthritis Res Ther. 2014 Nov 28;16(6):488. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Kawanishi Y, Nakasa T, Shoji T, Hamanishi M, Shimizu R, Kamei N, Usman MA, Ochi M. Intra-articular Injection Of Synthetic MicroRNA-210 Accelerates Avascular Meniscal Healing In Rat Medial Meniscal Injured Model. Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting. 28-31 Mar 2015. the MGM Grand Hotel, Las Vegas, USA.
- 2) Yoshizuka M, Nakasa T, Kawanishi Y, Ochi M. Inhibition of microRNA-222 expression accelerates bone fracture healing with enhancement of angiogenesis and osteogenesis in atrophic non-union model in rat. Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting . 28-31 Mar 2015. the MGM Grand Hotel, Las Vegas, USA.
- 3) 川西啓生、中佐智幸、亀井直輔、庄司剛士、清水 良、越智光夫. MicroRNA-210 の関節内投与による半月板損傷に対する治癒促進効果. 第 14 回日本再生医療学会総会. 2015 年 3 月 19 日-21 日. パシフィコ横浜, 横浜市
- 4) 吉塚将昭、中佐智幸、川西隆生、蜂須賀晋、古田太輔、越智光夫. microRNA-222 の発現抑制による骨形成促進の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014 年 10 月 9 日

-10 日. 城山観光ホテル, 鹿児島市.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 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: 6 0 4 6 7 7 6 9

### (2) 研究分担者

越智 光夫 (Ochi Mitsuo)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
教授

研究者番号: 7 0 1 7 7 2 4 4

味八木 茂 (Miyaki Shigeru)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 1 0 3 9 2 4 9 0

亀井 直輔 (Kamei Naosuke)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号: 7 0 4 4 4 6 8 5