

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659672

研究課題名(和文)変形性関節症における軟骨細胞の再プログラミングのmicroRNAによる制御

研究課題名(英文)Micro RNAs could modulate the reprogramming of osteoarthritic chondrocytes.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)の病態において脱分化した軟骨細胞が再分化する際の再プログラミングとmicroRNA(miRNA)の関連、その機能と治療に結びつく可能性を検討した。ヒト関節軟骨においてmiR-125bはADAMTS-4を制御する。またヒト関節軟骨細胞表面に発現するCD54/CD44は脱分化状態を表す指標と成り得る。脱分化したOA軟骨細胞は軟骨分化誘導培地でのペレット培養で再分化可能であり、骨髄由来の間葉系幹細胞(MSC)と同等の多分化能を認める。軟骨細胞に発現するmiRNAは脱分化により低下、再分化で高くなった。ラット OAモデルでVerapamilの関節内投与がOA進行を抑制した。

研究成果の概要(英文)：The pathological roles of microRNAs in reprogramming of chondrocytes were analysed. First, we demonstrated that miR-125b plays a role in regulating the expression of ADAMTS4 in human chondrocytes. The mean fluorescence intensity (MFI) ratio of CD54 to CD44 could be an adequate candidate as the index of the differentiation status of chondrocytes. Chondrogenic induction in three-dimensional pellet culture successfully rescued the expression of chondrocyte phenotype marker genes to native levels. We compared the multipotency of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) with osteoarthritic chondrocyte (OAC)s. OACs differentiated into adipogenic, osteogenic, and chondrogenic lineages same as MSCs. The expressions of microRNAs related to chondrocytes decreased in de-differentiation and recovered during re-differentiation. Finally, we found that intraarticular injection of verapamil inhibited OA progression as well as nuclear localizations of beta-catenin in a rat OA model.

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：細胞・組織 再プログラミング マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)の病態は軟骨細胞自身の代謝の変化による細胞外マトリックスの合成と破壊のバランスの破綻が主体であり、OAの病態形成に内軟骨骨化に関わる因子の変化が関与していると考えている。miRNAとは19-25塩基程度の1本鎖RNAであり、転写後のメッセンジャーRNA(mRNA)に相補的に結合して翻訳を阻害することで、ターゲットとなるタンパク質の合成を阻害する遺伝子抑制機能を持つ。ヒトにおいては300種類以上存在していることが判明しており、全ゲノムのうち1%ほどを占めている。その機能はまだ不明なものが多いが、miRNAによる遺伝子抑制は、発生や分化におけるタイミングや細胞の生死、主にアポトーシスをコントロールしていることを中心に解明されてきた。軟骨細胞が様々なmiRNAを発現しており、interleukin(IL)-1に反応して増加することや、miR-146はOAのgradeによって発現量が違い、MMP-13と相関があることなどが判明した。我々はOAの病態制御にmiRNAが関与する可能性に着目して研究を進めており(平成21年度科学研究費萌芽研究)、軟骨基質の重要な因子であるaggrecanの分解酵素であるADAMTS4がmiR125bによる制御を受ける可能性があることを発見した(2012ORS spotlight session 松川、酒井ら)。またmiR-23b,miR-27bはHIF-2aの制御に関わっていることも判明した(2012,2013 ORS 石塚、酒井ら)。軟骨細胞の代謝の変化を恒常的な制御機構の機能低下ととらえたとき、miRNAがOAの病態形成に関わっている可能性は高い。更に近年miR-200c, miR-302s, miR-369sを同時に導入することでinduced pluripotent stem cells (iPS細胞)を作成することができるとの報告がされ、miRNAが様々な生理現象に対して重要な役割を果たしている可能性が示唆された。OA軟骨において進んでいく軟骨基質や細胞の破壊に対し

て、恒常性の維持のために基質産生は増加すると言われるが、それだけでは最終的には不十分であり、明らかな再生現象については不明である。再生を促す現象の一つとして幹細胞が流入してくる可能性があるが、軟骨には血行がない。そこで軟骨細胞のReprogrammingを起こそうとする可能性があり、更にその制御にmiRNAが関与しているのではという発想に至った。

2. 研究の目的

今回の目的は(1)iPS細胞作成に関与と言われるmiRNA(miR-200c, miR-302s, miR-369s)発現に関して正常軟骨とOA軟骨での相違を検討する。(2)これらmiRNAを発現抑制、または過剰発現させることでOA軟骨細胞の肥大化を含む内軟骨骨化様シグナル、すなわちtype X collagen、matrix metalloproteinase(MMP)-13、Runx2、HIF-2a等やOct4, Sox2, Klf4, c-Myc等のiPS細胞作成に必要な遺伝子がどのように変化するかを調べ、その関連性について検討する。すなわちOAの病態において"軟骨細胞のReprogramming"が起きているのかどうか、またその制御に関わるmiRNAを同定し、それらの変化がOAの病態に与える影響を調べるのが今回の目的である。

3. 研究の方法

(1) OAマウスを作製し、発症後日数別に分けて軟骨組織を採取した後にRNAを抽出する。予備実験のデータより、発症後2、4、8週後にマウスを屠殺して軟骨組織を得る。正常マウス(Sham)の軟骨組織をコントロールとして使用する。採取した軟骨組織の一部から軟骨細胞を得て培養を行い、RNAを抽出する。OAマウスは従来の方法に則り、麻酔下にマウス膝関節を切開して内側側副靭帯、内側半月板を切除して作製する。

またX線、組織学的に関節炎や破壊の程度を評価する。軟骨組織標本はアルシアンブルー、

サフラニン染色にて評価する。

(2) 抽出したRNAを用いてライトサイクラーによる定量的RT-PCRを行い、軟骨基質であるtype II collagen, aggrecanや、matrix metalloproteinase(MMP), ADAMTS4などの基質分解酵素、IL-1 やTNF- α などの炎症性サイトカインなどの遺伝子発現量の変化を調べる。またOA軟骨細胞の肥大化を含む内軟骨骨化シグナル、すなわちtype X collagen、MMP-13、Runx2、HIF-2 α 等に関しても同様に行う。Reprogrammingの指標としてOct4, Sox2, Klf4, c-Mycの遺伝子発現の変化を、さらにmiR-200c, miR-302s, miR-369sの発現変化を調査する。軟骨組織破壊の程度と発症後日数とこれら遺伝子の発現パターンを評価して至適条件を見つけることが重要になる。

(3) 抽出したRNAを用いてmiRNA-arrayを用いてmiRNAの発現パターンを検出し、正常軟骨と、OA軟骨から得られたものの比較を行い、発現に変化が起きているmiRNAをピックアップする。候補となったmiRNAについて、PCR法にて発現量を比較検討する。また培養軟骨細胞をIL-1等の炎症性サイトカインで刺激を行ったものに関してmiRNAの発現量の変化を調査し、炎症性メディエーターとの関連を明らかにする。正常軟骨とOA軟骨での反応の違いに注目して検討する。これらの評価により、正常軟骨とOA軟骨での内軟骨骨化シグナルや炎症性メディエーターの変化、OAで再プログラミングが起きているのかどうか、またmiRNAとの関連を明らかにすることを目標とする。

得られたデータを元に培養軟骨細胞を用いて発現量の差異が認められたmiRNAの機能解析を行う。

(1) 発現抑制

標的になるmiRNAのアンチセンスRNAを数種類デザインした上で委託にて合成を行う。これらを単独、もしくは至適濃度にて混合してLipofection kitによってマウス軟骨細胞に

導入する。導入されたアンチセンスは標的miRNAに相補的に結合して、その発現を抑制する。

(2) 過剰発現

miRNAの前駆体を合成して導入する手法、または目的のmiRNAのoriginとなるDNAをゲノムより切り出し、PCR法にて増幅した後、ベクターに導入して大腸菌を用いて増殖させてベクターを抽出したものを細胞に導入することで過剰発現を起こす。アンチセンスと同様にLipofectionを用いた導入を行う。

それぞれの細胞より抽出したRNAを用いてライトサイクラーによる定量的RT-PCRを行い、type II collagen, aggrecan, type X collagen, matrix metalloproteinase(MMP)-13, Runx2, HIF-2 α などの遺伝子発現量や、再プログラミングの指標としてのOct4, Sox2, Klf4, c-Mycの遺伝子発現の変化を調べることで、これらがmiRNAによる影響を受けるかどうかを確認する。また、再プログラミングの状態に関して幹細胞マーカーの発現を確認したり、骨組織や脂肪組織、軟骨組織への分化誘導を行って確認する。

4. 研究成果

我々はTarget scanを用いて、ADAMTS-4 mRNAの3'-UTR末端にseed sequenceを持つmicroRNAである、miR-125a、-125b、-4319を発見した。miR-125bはmiR-125a、-4319と比較して、ヒト軟骨組織および細胞で強く発現しており、正常軟骨と比較して、OA軟骨でmiR-125bが著しく低下していたことから、miR-125bがOAの病態に強く関与していると考えた。更に軟骨細胞において、miR-125bを強制発現させることにより、IL-1により誘導されるADAMTS-4のmRNAと蛋白の増加を抑制したことから、ヒト関節軟骨において、miR-125bがADAMTS-4を制御することを証明した。更にLuciferase Reporter Assayにおいて、miR-125bの増加によりADAMTS-4 3'-UTR cloneを含むLuciferaseの活性が

低下していることから、miR-125b が ADAMTS-4 mRNA を直接制御していることが示された。

また単層培養したヒト関節軟骨細胞において、その分化の過程に関連した表面マーカー発現を同定し、脱分化した細胞を選り分けるための指標を定義する試みを行った。軟骨細胞を単離し、単層培養を第4継代（以下P4）まで行った。継代の各時点（P0 から P4）において、細胞外マトリックスの mRNA 発現（collagen type I, II, X および aggrecan）を real-time RT-PCR を用い測定した。また同時点での細胞表面マーカー（CD14, CD26, CD44, CD49a, CD49c, CD54, CD151）発現を FACS を用いて測定した。両者の関係を検討し、単層培養における分化の指標候補を定義した。その指標に基づいて、P2 単層培養軟骨細胞を磁気細胞分離システム（以下 MACS）を用いて選別した。選別前の細胞群と選別後の細胞群の遺伝子発現を再び real-time RT-PCR を用い測定し検討した結果、Collagen type II と collagen type I の mRNA の比は、単層培養におけるヒト関節軟骨細胞の分化状態を表していた。表面マーカー発現は、分化にしたがって変化していた。表面マーカー発現における CD54 と CD44 の比は、脱分化状態を表す指標の候補と成り得ると考えられた。

次に軟骨細胞を単層培養で継代していくと、生体内から平面への微小環境変化の影響を受けて急激に脱分化を起し細胞の形態や発現型が変わってしまうことが知られているが、脱分化した OA 軟骨細胞の再分化能について検討した。軟骨分化誘導培地を用いてペレット培養を行うことで P4 の細胞でも軟骨組織と同等のレベルまで Collagen type II や aggrecan の発現能を取り戻すことができたことが分かった。ヒアルロン酸の合成パターンも、脱分化にて低分子量の HAS3 優位の発現パターンを呈したが、これも回復することが分かった。

さらに OA 軟骨細胞に多分化能があるかどうか

かについて、骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSC) との比較研究を行った。細胞表面の MSC マーカーと言われている CD29, 44, 73, 90, 105 は OA 軟骨細胞において MSC とほぼ同等に発現していた。また血球系マーカーである CD45, HLA-DR は陰性であった。MTT アッセイでは OA 軟骨細胞の方が MSC より増殖能が高い傾向であった。軟骨、骨、脂肪に分化誘導をかけると、両者ともに分化することを確認できた。MSC より OA 軟骨細胞の方が軟骨組織への分化は良好であった。軟骨細胞に発現することが知られている miRNA-23b, 27b, 125b, 140 について調べてみると、OA 軟骨細胞を単層培養すると低値であったそれぞれの発現はペレット培養によって再分化することで発現が高くなることが分かった。

また幹細胞のマーカーである OCT4, NANOG の発現を比較したところ、OCT4 の発現は MSC, 正常軟骨細胞、OA 細胞では同等であった。NANOG については、MSC に比べて正常軟骨細胞、OA 軟骨細胞の方が数倍高い発現を示した。次に Wnt シグナル制御による OA 治療薬を同定する目的で Wnt の拮抗因子である *FRZB* の発現を亢進する薬剤の探索を行い、Verapamil を同定した。その効果を RT-PCR、Western blotting、組織観察で検討した。Verapamil はヒト OA 軟骨細胞で *FRZB*, *ACAN*, *COL2A1*, *SOX9* の発現を亢進し、Wnt3A で誘導した Wnt/ β -catenin シグナルの標的遺伝子である *AXIN2* と *MMP3* の発現を抑制した。また β -catenin の蛋白量を Verapamil が減少させた。胎生期マウスの脛骨器官培養では Verapamil は軟骨細胞の肥大分化を抑制し、ラット OA モデルでは Verapamil の関節内投与が OA 進行を抑制した。

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4件：全て査読あり)

1. Akira Takamatsu, Bisei Ohkawara, Mikako Ito, Akio Masuda, Tadahiro Sakai, Naoki

Ishiguro, Kinji Ohno
Verapamil protects against cartilage
degradation in osteoarthritis by
inhibiting Wnt/ β -catenin signaling

Plos One. 9(3), 2014, e92699

DOI: 10.1371/journal.pone.0092699

2. Ono Y, Sakai T, Hiraiwa H, Hamada T,
Omachi T, Nakashima M, Ishizuka S,
Matsukawa T, Knudson W, Knudson CB,
Ishiguro N.

Chondrogenic capacity and alterations in
hyaluronan synthesis of cultured human
osteoarthritic chondrocytes.

Biochem Biophys Res Commun., 435(4), 2013,
733-739

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.052

3. Matsukawa T, Sakai T, Yonezawa T,
Hiraiwa H, Hamada T, Nakashima M, Ono Y,
Ishizuka S, Nakahara H, Lotz MK, Asahara
H, Ishiguro N.

MicroRNA-125b regulates the expression of
aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human
osteoarthritic chondrocytes.

Arthritis Res Ther. 15(1), 2013, R28

DOI: 10.1186/ar4164

4. TAKASHI HAMADA, TADAHIRO SAKAI, HIDEKI
HIRAIWA, MOTOSHIGE NAKASHIMA, YOHEI ONO,
HIROHITO MITSUYAMA and NAOKI ISHIGURO.
SURFACE MARKERS AND GENE EXPRESSION TO
CHARACTERIZE THE DIFFERENTIATION OF
MONOLAYER EXPANDED HUMAN ARTICULAR
CHONDROCYTES,

Nagoya J. Med. Sci. 75, 2013, 101-111

DOI:none

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 小田智之、酒井忠博、平岩秀樹、濱田恭、
大野洋平、中島基成、石塚真哉、高松晃、
山下暁士、石黒直樹

変形性関節症由来軟骨細胞の再分化能に
ついての検討

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会
2013.10.17~18 幕張メッセ(千葉市)

2. 高松晃、酒井忠博、平岩秀樹、濱田恭、中
島基成、松川哲也、小田智之、山下暁士、
宮本健太郎、石黒直樹、大河原美静、大野
欽司

Wnt シグナル経路の制御を介した変形性関
節症に対する新たな治療薬の検索

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会
2013.10.17~18 幕張メッセ(千葉市)

3. Shinya Ishizuka, Tadahiro Sakai, Hideki
Hiraiwa, Takashi Hamada, Motoshige
Nakashima, Tomoyuki Oda, Satoshi
Yamashita, Akira Takamatsu, Naoki
Ishiguro

MicroRNA-23b suppress MMP-13 expression
via post-transcriptional silencing of
both hypoxia inducible factor-2 and
runt-related transcription factor 2
expression in osteoarthritic
chondrocytes

Orthopaedic Research Society
2013.1.26-29 San Antonio, USA

4. Akira Takamatsu, Bisei Ohkawara,
Tadahiro Sakai, Hideki Hiraiwa, Takashi
Hamada, Motoshige Nakashima, Shinya
Ishizuka, Tomoyuki Oda, Satoshi
Yamashita, Kinji Ohno, Naoki Ishiguro
Drug screening for inhibition of
Wnt/ β -catenin signaling in
osteoarthritis

Orthopaedic Research Society
2013.1.26-29 San Antonio, USA

5. Akira Takamatsu, Bisei Ohkawara,
Tadahiro Sakai, Kinji Ohno, Naoki
Ishiguro

Drug screening for treating
osteroarthritis through regulation of
Wnt/ β -catenin signaling

The Osteoarthritis Research Society
International 2013.4.18-21 Philadelphia,
USA

6. 高松晃、大河原美静、酒井忠博、大野欽司、
石黒直樹
Wnt シグナル経路の制御を介した変形性
関節症に対する新たな治療薬の検索
第 26 回日本軟骨代謝学会 2013.3.1~2
千里ライフサイエンスセンター(豊中市)

7. 小田智之、酒井忠博、平岩秀樹、濱田恭、
大野洋平、中島基成、石塚真哉、高松晃、
山下暁士、石黒直樹

変形性関節症由来軟骨細胞(OAC)の再分化能についての検討

8. 第 26 回日本軟骨代謝学会 2013.3.1~2
千里ライフサイエンスセンター(豊中市)
石塚真哉、酒井忠博、平岩秀樹、濱田恭、
中島基茂、小田智之、高松晃、山下暁士、
石黒直樹
microRNA-23b は HIF2-、RUNX2 の発現抑制を介して OA 軟骨細胞における MMP-13 の発現を制御する。
第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会
2012.10.5~6 名古屋国際会議場(名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

酒井 忠博 (SAKAI TADAHIRO)
名古屋大学・医学部付属病院・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・医学部付属病院・病院助教
研究者番号: 70566976

濱田 恭 (HAMADA TAKASHI)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号: 90566978

大間知 孝顕 (TAKAAKI OHMACHI)
名古屋大学・医学部付属病院・医員(2011年-2012年)
研究者番号: 90566978

(3)連携研究者

なし