

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293324

研究課題名(和文) 運動器損傷に対する血管新生および組織特異的マイクロRNAによる新規治療開発

研究課題名(英文) Development of new treatments using pro-angiogenic and tissue-specific microRNAs for the injury of musculoskeletal and nerve tissue

研究代表者

亀井 直輔 (KAMEI, NAOSUKE)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：70444685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷モデルに対するmiR-210の投与では、損傷後早期の損傷部での血管新生が促進され、それに引き続いておこるグリオシスも促進されて、運動機能の回復が改善した。また同モデルに対するmiR-145の投与では、運動機能が改善し、ターゲット遺伝子候補の一つであるセマフォリン3Aの発現が抑制されていた。半月板損傷モデルに対するmiR-210投与では損傷半月板にmiR-210が取り込まれ、半月板の修復が促進されていた。ラットアキレス腱損傷モデルに対するmiR-210の投与では、最終の腱の修復にコントロール群との差はなかったが、miR-210投与群では早期にアキレス腱が修復されていた。

研究成果の概要(英文)：The administration of miR-210 to the mouse spinal cord injury model promoted angiogenesis and astrogliosis, and improved functional recovery after spinal cord injury compared with the non-injected controls. Additionally, the administration of miR-145 to the same model improved functional recovery and inhibited the expression of semaphorin 3A. An intra-articular injection of ds miR-210 was effective in the healing of the damaged white zone meniscus through promotion of the collagen type 2 production from meniscus cells and through upregulated of VEGF and FGF2 from synovial cells. The administration of miR-210 to the rat calcaneal tendon injury model promoted the repair of a calcaneal tendon at early phase follow injury.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：脊椎脊髄病学 筋・神経病学 運動器外傷学 関節病学 再生医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 運動器における再生医療の重要性

世界有数の長寿国で超高齢化社会を迎える我が国においては、単なる長寿ではなく、介護を必要とせず自立した生活を送れる健康寿命の延伸が求められている。そのためには、運動に関与する骨・軟骨・骨格筋・腱・靭帯・神経などの「運動器」のケアが重要になる。なかでも、軟骨や脊髄などの組織は自己修復能が非常に乏しく、いったん損傷されると元に戻すことは困難である。また、骨・骨格筋・腱などの比較的自己修復能が高い組織であっても、損傷が著しい場合や高齢者などでは難治化することも少なくない。その解決には既存の手術や薬物治療だけでは十分な効果が期待できないことから、再生医療による新規治療法の開発が期待されている。

(2) これまでの血管再生を介した運動器再生研究

血管は角膜・水晶体や軟骨などの例外を除き、あらゆる臓器・組織を栄養しているため、血管再生は様々な組織の再生において必須の因子となる (Kamei N, Asahara T. *Surgery Frontier* 2009)。そこで我々は、これまでに骨髄間葉系幹細胞や血管内皮前駆細胞を用いて、血管再生を介した運動器再生の研究を行い、動物実験レベルでの良好な成績を報告してきた。

例えば、ラット大腿骨の難治性骨折モデルを用いて、骨髄間葉系幹細胞の磁気ターゲティングによる骨修復能の促進を示し (Kodama A, Kamei N, Ochi M et al. *J Bone Joint Surg Br* 2012)、マウスの脊髄損傷モデルやラットの骨格筋損傷あるいは末梢神経欠損モデルに対して血管内皮前駆細胞移植を行い、血管新生や組織修復の促進効果について報告した (Shi M, Kamei N, Nakasa T, Ochi M et al. *Stem Cells* 2009; Kijima Y, Kamei N, Ochi M et al. *J Neurosurg* 2009; Kamei N, Ochi M et al. *Stem Cells* 2010; Kamei N, Ochi M et al. *J Neurotrauma* 2012; Ohtsubo S, Kamei N, Ochi M et al. *J Neurosurg* 2012; Kamei N, Ochi M et al. *J Neurosci Res* 2012)。

(3) マイクロ RNA

マイクロ RNA は 18~25 塩基長の小さな一本鎖 RNA で、ノンコーディング RNA と呼ばれるタンパク質をコードしない RNA である。マイクロ RNA はタンパク質に翻訳されないが、タンパク質をコードする特定の遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) の発現や、mRNA からタンパク質への翻訳を制御することで機能している。マイクロ RNA は小さいが故に化学合成が容易であり、創薬としての有益性が高い生体分子として注目されている。

血管新生に関与するマイクロ RNA についてはいくつかの報告があり、特に癌治療への応用研究は盛んになっている。一方、運動器におけるマイクロ RNA 研究の報告はまだ数少なく、

さらに治療応用研究の報告はほとんどないのが現状である。その中でも、我々は運動器におけるマイクロ RNA の研究にいち早く取り組み、関節滑膜、関節軟骨、脊髄におけるマイクロ RNA について報告した (Nakasa T, Miyaki S et al. *Arthritis Rheum* 2008; Miyaki S, Nakasa T et al. *Genes Dev* 2010; Nakanishi K, Nakasa T, Kamei N, Ochi M et al. *Spinal Cord* 2010)。また、マイクロ RNA の治療応用研究を世界に先駆けて行い、筋特異的マイクロ RNA (miR-1, miR-133, miR-206) による骨格筋再生や血管新生マイクロ RNA (miR-210) による膝前十字靭帯再生の報告を行った (Nakasa T, Miyaki S, Ochi M et al. *J Cell Mol Med* 2010; Shoji T, Nakasa T, Miyaki S, Kamei N, Ochi M et al. *Am J Sports Med* 2012)。

2. 研究の目的

本研究では様々な運動器損傷モデルで研究を行ってきた経験を生かし、これまでのマイクロ RNA による運動器再生研究をさらに発展させる形で、骨、半月板、骨格筋、腱、神経などの運動器損傷に対する血管新生マイクロ RNA の組織修復効果と作用機序を解明し、さらに組織修復促進効果を持つ組織特異的マイクロ RNA を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脊髄再生

マウス脊髄損傷モデル: C57BL/6 マウスの第 10 胸椎高位で椎弓切除を行った後に IH インパクターを用いて脊髄損傷モデルを作製した。

miR-210

血管新生促進能を持つ miR-210 の投与による脊髄損傷後の修復促進効果について検討した。

損傷 1 日後に損傷部に直接マイクロ RNA を注入した。注入するマイクロ RNA の種類によって以下の 3 群を作製した。

i) siRNA 群: コントロールとして無機能 siRNA を注入

ii) miR-140 群: 別のコントロールとして、軟骨組織に特異的に発現する miR-140 を注入

iii) miR-210 群: miR-210 を注入

損傷後 1, 3, 5, 7, 14, 28, 35, 42 日で Basso mouse scale を用いた運動機能評価を行った。

また、損傷後 1, 7, 14, 21, 42 日で経頭蓋電気刺激による後肢筋電位を測定し、振幅を評価した。

損傷 3 日後に in situ hybridization によって miR210 の発現分布を評価し、また損傷後 2, 3, 5, 7, 14 日で miR-210 の発現レベルを real-time PCR で評価した。

損傷 3 日後の脊髄損傷部組織切片で CD31 免疫染色によって血管新生を評価した。また、損傷 7, 14 日後に F4/80, GFAP の免疫染色によってグリオーシスとマクロファージの分

布を評価した。さらに、損傷 42 日後に 5HT の免疫染色や FluoroMyelin 染色によって軸索再生の評価を行った。

脊髄損傷部での miR-210 の target gene を明らかにするために損傷 2 日後の損傷部組織でマイクロ RNA のアレイを行った後、候補遺伝子について real-time PCR や Western blotting による発現レベルの評価を行った。

miR-145

Target gene 候補に Semaphorin や Ephrin など軸索伸長抑制因子を複数含む miR-145 の投与が脊髄損傷後の修復促進効果について検討した。

マウス脊髄損傷モデルに対して、適正な miR-145 の投与時期を検討するために、損傷後 1, 3, 7, 14 日で損傷部に miR-145 を注入し、その翌日における損傷部での miR-145 の発現量を real-time PCR で評価した。

損傷後 3, 7, 14 日で miR-145 を投与したモデルについて、それぞれ Basso mouse scale を用いた運動機能評価を行った。また、損傷後 42 日において経頭蓋電気刺激による後肢筋電位を測定し、振幅を評価し、さらに Dynamic Plantar Aesthesiometer を用いた感覚機能の評価も行った。

脊髄損傷部での miR-145 の target gene を明らかにするために miR-145 投与翌日の損傷部組織で候補遺伝子について real-time PCR や Western blotting による発現レベルの評価を行った。

(2)半月板再生

SD ラットの膝半月板の切離モデルを作製し、以下の群を作製した。

i) siRNA 群： コントロールとして無機能 siRNA を注入

ii) miR-210 群： miR-210 を注入
組織学的評価として、損傷 4 週後に半月板損傷部の組織切片を作製し、HE 染色、サフラニン O 染色を行った。また、蛍光標識した miR-210 を投与し、半月板への取り込みを蛍光顕微鏡で確認した。さらに real-time PCR で半月板における miR-210, コラーゲン type I, コラーゲン type II, VEGF, FGF2 の発現レベルを評価した。

(3)腱再生

SD ラットのアキレス腱をいったん切離し、縫合するモデルを作製し、以下の群を作製した。

i) siRNA 群： コントロールとして無機能 siRNA を注入

ii) miR-210 群： miR-210 を注入
力学的評価として、損傷後 2 週および 6 週で引っ張り試験機によってアキレス腱の破断強度を測定した。また組織学的評価として、損傷後 2 週および 6 週でアキレス腱損傷部の組織切片を作製し、マッソントリクローム染色、Isolectin B4 による血管内皮の染色および VEGF, FGF2, コラーゲン type I の免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1)脊髄再生

miR-210

Basso mouse scale では、miR-210 投与群において他の群よりも有意に運動機能が改善していた。

運動誘発電位測定においても、miR-210 投与群での筋電位の振幅がほかの群よりも有意に大きかった。

免疫染色の評価では、miR-210 の投与によって CD31 陽性の血管内皮と GFAP 陽性のアストロサイトの増生が多くみられ、F4/80 陽性のマクロファージの分布領域が小さくなっていった。また、5HT および FluoroMyelin を用いた染色による軸索の評価では、miR-210 の投与によって、損傷部より尾側の有髄軸索数が有意に多くなっていた。

Target gene の検索では、miR-210 の投与によって Beta-catenin の発現が上昇し、PTP1B, ephrin-A3 の発現レベルが低下していた。

以上の結果から、miR-210 の投与は脊髄損傷における血管新生とグリオシスを促進することで機能回復に寄与し、これらに対して、PTP1B, ephrin-A3 の発現抑制や Wnt シグナルの促進が関与していることが示唆された。

miR-145

損傷後 3 日以降に miR-145 を投与すると、損傷部における miR-145 の発現が有意に上昇することが明らかとなった。Basso mouse scale では、損傷後 3 日および 7 日で miR-145 を投与した群で有意な運動機能の改善を認めた。運動誘発電位測定による評価では、損傷後 7 日に miR-145 を投与した群で有意な筋電位の振幅増大を認めた。Dynamic Plantar Aesthesiometer による感覚機能評価では明らかな群間の有意差を認めなかった。Target gene の探索では、miR-145 の投与によって Semaphorin-3A の発現が低下していた。以上の結果から損傷後 7 日における miR-145 の投与は Semaphorin-3A の発現抑制を介して機能改善に寄与していると考えられた。

(2)半月板再生

HE 染色およびサフラニン O 染色では、miR-210 投与群において半月板切離部における連続性を認めた。組織学的な修復をスコア化して評価すると、miR-210 の投与により有意に半月板の修復が促進されていた。投与した miR-210 は半月板損傷部周囲の細胞へ取り込まれていた。Real-time PCR での評価では、miR-210 の投与によって、半月板損傷部における miR-210 の発現が有意に上昇し、コラーゲン type II, VEGF, FGF2 の発現も上昇していた。

これらのことから投与した miR-210 は半月板損傷部周囲に取り込まれ、コラーゲン type II, VEGF, FGF2 の発現上昇を介して損傷部の修復促進に寄与していると考えられた。

(3) 腱再生

引っ張り試験機を用いた力学的評価では、損傷後 2 週において miR210 投与群で有意にアキレス腱の強度が高かった。マッソントリクローム染色による評価では miR-210 投与群において有意に太いコラーゲン線維を認めた。その他の組織染色において、miR-210 投与群では損傷後 2 週での血管新生を促進し、VEGF, FGF2 およびコラーゲン type I の発現を上昇させていた。

これらの結果からアキレス腱損傷に対する miR-210 の投与は VEGF, FGF2 の発現上昇を介して血管新生を促進させ、腱組織の修復を早めていることが示唆された。

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 6 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., J Orthop Sci. 査読有, 20: 2015, 538-546
2. Ujigo S, **Kamei N**, Hadoush H, Fujioka Y, Miyaki S, Nakasa T, Tanaka N, Nakanishi K, Eguchi A, Sunagawa T, Ochi M., Administration of microRNA-210 promotes spinal cord regeneration in mice., Spine. 査読有, 39: 2014, 1099-1107
3. 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 Res Ther. 査読有, 16: 2014, 488
4. **亀井直輔**, 石川正和, 中佐智幸, 大川新吾, 森亮, 味八木茂, 越智光夫, 骨格筋損傷に対する新たな治療開発, 日本整形外科学会雑誌, 査読無, 88 巻, 2014, 230-235.
5. **亀井直輔**, 大坪晋, 宇治郷諭, 蜂須賀晋, 越智光夫, 血管再生による神経再生, 末梢神経, 査読無, 25 巻, 2014, 226-228
6. **亀井直輔**, 中佐智幸, 越智光夫, 骨格筋・腱・靭帯再生 骨格筋損傷に対する新規治療開発, Pharma Medica, 査読無, 31: 2013, 51-55

[学会発表](計 13 件)

1. **Naosuke Kamei**, MicroRNAs for the Diagnosis and Treatment of Spinal Cord Injury, The 19th Seminar of the Study Group for Nerve and Spine, 2016.3.12-3.13, Hotel Chinzanso Tokyo (Tokyo, Japan)
2. Norifumi Suga, **Naosuke Kamei**, Satoshi Ujigo, Atsushi Takazawa, Mitsuo Ochi, Administration of MicroRNA-145 Promotes

Spinal Cord Regeneration in Mice, 2016 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2016.3.5-3.8, Disney's Coronado Springs Resort (Orlando, FL, USA)

3. 須賀紀文, **亀井直輔**, 宇治郷諭, 越智光夫, micro RNA-145 による脊髄再生, 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015.10.22-10.23, 富山国際会議場ほか(富山市)

4. Yoshitaka Kawanishi, Tomoyuki Nakasa, Takeshi Shoji, Michio Hamanishi, Ryo Shimizu, **Naosuke Kamei**, Muhammad Andry Usman, Mitsuo Ochi, Intra-articular Injection of Synthetic MicroRNA-210 Accelerates Avascular Meniscal Healing in Rat Medial Meniscal Injured Model, 2015 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2015.3.28-3.31, MGM Grand Hotel (Las Vegas, NV, USA)

5. 川西啓生, 中佐智幸, 庄司剛士, **亀井直輔**, 石飛博之, 味八木茂, 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 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014.10.9.-2014.10.11, 城山観光ホテル(鹿児島市)

6. **亀井直輔**, 越智光夫, 血管再生による神経再生, 第 25 回日本末梢神経学会学術集会, 2014.8.29-8.31, ホテルルビノ京都堀川(京都市)

7. Satoshi Ujigo, **Naosuke Kamei**, Hadoush Hikmat1, Yuki Fujioka, Shigeru Miyaki, Tomoyuki Nakasa, Nobuhiro Tanaka, Kazuyoshi Nakanishi, Toru Sunagawa, Mitsuo Ochi, Administration of MicroRNA-210 Promotes Spinal Cord Regeneration, 2014 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2014.3.15-3.18, Hyatt Regency New Orleans (New Orleans, LA, USA)

8. 川西啓生, 中佐智幸, **亀井直輔**, 庄司剛士, 石飛博之, 味八木茂, 越智光夫, MicroRNA-210 の関節内投与による半月板修復に対する促進効果, 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014.3.4-3.6, 国立京都国際会館(京都市)

9. 宇治郷諭, **亀井直輔**, Hikmat Hadoush, 藤岡悠樹, 中佐智幸, 味八木茂, 田中信弘, 中西一義, 砂川融, 越智光夫, microRNA-210 による脊髄再生, 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013.10.17-10.18, 幕張メッセ(千葉市)

10. 川西啓生, 中佐智幸, **亀井直輔**, 庄司剛士, 石飛博之, 味八木茂, 越智光夫, MicroRNA-210 の関節内投与による半月板修復に対する促進効果, 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013.10.17-10.18, 幕張メッセ(千葉市)

11. **亀井直輔**, 骨格筋の再生, 第 3 回武庫川女子大学健康運動科学研究所シンポジウム, 2013.6.29, 武庫川女子大学 日下記念マルチメディア館 (西宮市)

12. **亀井直輔**, 石川正和, 中佐智幸, 大川新吾, 森亮, 味八木茂, **越智光夫**, 骨格筋損傷に対する新たな治療開発, 第 86 回日本整形外科学会学術総会, 2013.5.23-5.26, 広島グリーンアリーナ他 (広島市)

13. 宇治郷諭, 田中信弘, 中西一義, **亀井直輔**, 藤岡悠樹, 大田亮, 平松武, **越智光夫**, 血管新生マイクロ RNA による脊髄再生, 第 42 回日本脊椎脊髄病学会, 2013.4.25-4.27, 沖縄コンベンションセンター (宜野湾市)

〔図書〕(計 1 件)

1. **Naosuke Kamei**, Springer, Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord, 2014, 419 (295-310)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 急性期脊髄損傷の予後予測マーカー

発明者: **亀井直輔**, **越智光夫**, 蜂須賀晋

権利者: 広島大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-019146

出願年月日: 2014 年 2 月 4 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院・講師

研究者番号: 7 0 4 4 4 6 8 5

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長

研究者番号: 7 0 1 7 7 2 4 4

(平成 25 年度 ~ 平成 26 年度)

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

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

(平成 25 年度 ~ 平成 26 年度)

石川 正和 (ISHIKAWA MASAKAZU)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 6 0 3 7 2 1 5 8

(平成 27 年度のみ)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: