

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462299

研究課題名(和文)メカニカルストレスによる軟骨細胞の miRNA発現のエピジェネティック制御

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of miRNA induced by mechanical stress in human chondrocytes

研究代表者

西田 圭一郎 (Nishida, Keiichiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80284058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト軟骨細胞に力学的負荷をかけ、発現が変化するマイクロRNAを網羅的に検討した。この中からmiR-29bに着目し、標的遺伝子の一つであるADAM12の発現解析を行った。ADAM12は軟骨細胞の分化過程でX型コラーゲンに先立って発現が上昇し、手術時に採取した変形性関節症(OA)患者の骨棘組織の増殖細胞層および肥大軟骨細胞層に高率に発現していた。OAの関節局所に生じる骨棘は生体の生理的反応である一方で、痛みや神経障害の原因になる。miR-29あるいはADAM12の発現を人為的に制御することにより、OAの新しい治療法開発に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Human chondro-osteophytes were obtained at the time of total joint arthroplasty from knee joints and hip joints of patients with osteoarthritis (OA). ADAM12, one of the target gene of miRNA29-b was observed in chondrocytes of the proliferative and hypertrophic zones in human chondro-osteophytes by immunohistochemistry. ADAM12 mRNA was up-regulated during chondrogenic differentiation in ATDC5 cells, before up-regulation of type X collagen mRNA. In patients with OA, mechanical forces acting on the sites of soft tissue attachments at the joint margins play a primary role in chondro-osteophyte formation and may cause joint pain leading to impaired activity of daily living. In addition, it has been reported that the haplotypes in the ADAM12 gene are strongly related to the risk of clinical knee OA. Modulation of signaling pathway of miRNA29b-ADAM12 axis may contribute the future development of a novel therapy against OA.

研究分野：医歯薬学(外科系臨床医学・整形外科学)

キーワード：miRNA 軟骨代謝 メカニカルストレス マイクロアレイ解析 エピジェネティクス HDAC 疾患修飾性OA治療薬

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は整形外科外来診療において最も頻度の高い疾患であり、関節軟骨の摩耗による疼痛と関節運動障害を主症状とする関節疾患である。本邦での患者数は約800万人ともいわれ、今後の高齢化社会に伴い更に増加するものと考えられる。一方、病態解明はいまだ不十分であり、関節リウマチに対する生物学的製剤のような画期的な治療法もない。

異常なメカニカルストレスは、関節の形態の先天的・後天的異常、靭帯断裂などの外傷、体重増加、職業、生活様式などの因子によって引き起こされ、OAの原因あるいは悪化因子となる。我々は、軟骨マトリックスの破壊に重要であるMMP-3, 13,あるいはADAMTS-4, -5, -9といったアグリカナーゼが軟骨細胞においてメカニカルストレスによって遺伝子発現が調節される遺伝子であること、メカニカルストレスによる基質破壊に転写因子RUNX-2が深く関与し、変形性関節症発症の治療ターゲットとなることを初めて報告した(Tetsunaga T, *Osteoarthritis Cartilage*, 2011)。microRNA(miRNA)は短鎖(21-23nt.)のRNAで、細胞質でmRNAと結合しその分解を促進あるいはタンパクへの翻訳を阻害するものである。近年、miRNAが生物発生、分化、発ガンなど種々の生命現象に重要な役割を果たすことが様々な分野で報告されているが、どのmiRNAがOA病態を形成する主なmiRNAであるか、miRNAの発現を制御する因子が何であるかは判明していない。

2. 研究の目的

変形性関節症(OA)における軟骨破壊のメカニズムを解明するために、軟骨細胞においてメカニカルストレスによる蛋白分解酵素発現を制御するmicroRNA(miRNA)の同定と、その発現を調整するエピジェネティックな修飾の関係を明らかにすることである。さらにヒストン脱アセチル化(HDAC)阻害剤やJAK阻害薬などの低分子化合物によるmiRNA発現の制御および軟骨破壊抑制効果をin vitro, in vivoで証明することで新規疾患修飾性OA治療薬の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト正常軟骨細胞(Lonza社)を購入し、細胞伸展装置用チャンバー上で培養した後、細胞伸展装置STB-140(STREX社製)を用いて伸展刺激(0.5Hz, 10%伸張, 30分、および0.166Hz, 5%伸張, 30分)を負荷した。この系にさらにHDAC阻害剤MS-275(HDACクラス阻害剤)を加えmiRNAを回収し、マイクロアレイを使用し網羅的なmiRNA発現の

解析を行った。

マイクロアレイには、EXIQON社のmiRCURY LNATM microRNA Array(miRBase ver. 18登録、annotation情報はmiRBase ver. 21対応)を用いた。

4. 研究成果

コントロールと0.166Hz, 5%伸張, 30分の伸張刺激を与えた軟骨細胞では、miRNAの発現が2倍以上差を認めたものは約60種類、また伸張刺激を与えた群にMS-275を添加したものでも約80種類のmiRNAの変動を確認した。これにより、メカニカルストレスに軟骨細胞が応答する際にmiRNAが関与していること、その制御発現にHDACiが関与していることが示唆された。

次に、メカニカルストレスで有意に発現が変動したmiRNAのうち、Web上でDIANA mirPATHを用いてOAに関連が深い成長因子であるTGFβ経路に關与する11の遺伝子(図1)に絞込みをおこなった。さらにこのうちOAの疾患感受性遺伝子として報告があり、miR-29bのtarget geneの一つであるADAM12に着目した。

16. TGF-beta signaling pathway (hsa04350)	5.528911e-14	20	see genes
hsa-miR-21-5p Tarbase	0.01953576	7	see genes
hsa-miR-16-5p Tarbase	0.0142891	8	see genes
hsa-miR-19b-3p Tarbase	0.0002942977	4	see genes
hsa-miR-29b-3p Tarbase	0.01903223	2	see genes
hsa-miR-19a-3p Tarbase	6.19973e-07	3	see genes
hsa-miR-100-5p Tarbase	0.01453451	1	see genes
hsa-miR-22-3p Tarbase	0.04725681	2	see genes
hsa-miR-374a-5p Tarbase	0.04809884	1	see genes
hsa-miR-26a-5p Tarbase	1.417183e-06	3	see genes
hsa-miR-20a-5p Tarbase	9.638668e-08	5	see genes
hsa-miR-17-5p Tarbase	2.716291e-07	5	see genes

図1. TGFβシグナル経路に關与するmiRNA

同様にヒト正常軟骨細胞に対する強刺激群(0.5Hz, 10%伸張, 30分)においてADAM12-Lの発現が亢進し、miR-29bの発現は低下した。さらに軟骨分化過程を再現できるATDC5細胞を理化学研究所より入手し、軟骨分化過程において、X型コラーゲンの発現に先立ってADAM12の発現の亢進が認められることを示した(図2)。

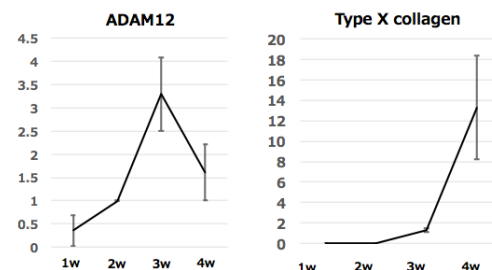


図2. ATDC5細胞の軟骨分化誘導過程におけるADAM12の発現(Real-time quantitative PCR) (n=3)

次いで本学倫理委員会の承認を得て、人工関節置換術時に採取した OA 軟骨組織および骨棘組織を使用し、ADAM12 の OA 組織における局在の検討を行なった。抗ヒト ADAM12 抗体を用いた免疫染色の結果、変性軟骨組織においてはクラスターを形成した OA 軟骨細胞に、また骨棘組織においては増殖軟骨細胞層と肥大軟骨細胞層で ADAM12 陽性細胞が有意に増加していた（図 3）。これらの結果は ADAM12 が内軟骨性骨化である骨棘形成過程において軟骨細胞の増殖と肥大化に関与していることを示唆していた。

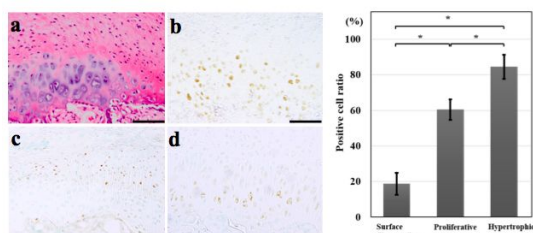


図3. ヒト骨棘におけるADAM12の発現（免疫染色）。a: H.E染色, b: ADAM12, c: PCNA, d: Type X collagen

また、JAK 阻害剤である Tofacitinib は 1000nM の濃度で MAPK および STAT3 シグナル伝達経路阻害により、メカニカルストレスによって誘導される RUNX-2 および NF- κ B の活性化を阻害し、軟骨細胞による ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-13 の発現を抑制した (Machida T, Nishida K et al, 投稿中)。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者に下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

宮澤慎一, 西田圭一郎: 変形性関節症. 骨・関節・カルシウム代謝疾患. 2. 免疫・炎症・アレルギーおよび骨・関節の病気とくすり. 病気とくすり 2016 基礎と実践 Expert 's Guide. 薬局増刊号 2016;67(4):314-323 (査読なし)

西田圭一郎. 軟骨細胞. リウマチ性疾患における骨軟骨破壊に関わる細胞たち. Keynote R.A 3(3):113-116, 2015. (査読なし)

原田遼三, 西田圭一郎: 関節リウマチ - 関節破壊の機序を中心に -. 特集 リウマチ性疾患の病因・病態に関する up-to-date. リウマチ科 53(3):227-232, 2015. (査読なし)
Ozawa M, Nishida K, Yoshida A, Saito T, Harada R, Machida T, Ozaki T. Hyaluronan suppresses mechanical stress-induced expression of catabolic enzymes by

human chondrocytes via inhibition of IL-1 production and subsequent NF- κ B activation. Inflammation Res, 2015 64(3-4):243-52. (査読あり)
Maehara A, Nishida K, Furutani M, Matsumoto E, Ohtsuka A, Ninomiya Y, Oohashi T: Light and electron microscopic detection of inflammation-targeting liposomes encapsulating high-density colloidal gold in arthritic mice. Inflamm Res 2014;63:139-47. (査読あり)

西田圭一郎: 関節リウマチと Waddington の後成的遺伝風景, 臨床リウマチ 26(1):5-8, 2014 (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

堀田昌宏, 西田圭一郎, 長谷井嬢, 古松毅之, 宮澤慎一, 那須義久, 中原龍一, 藤原智洋, 町田崇博, 竹下歩, 兼田大輔, 尾崎敏文. 変形性関節症における骨棘形成過程への miR-29b を介した ADAM12 の関与. 第 30 回日本軟骨代謝学会, 2017/3/3-4, 京都

堀田昌宏, 西田圭一郎, 古松毅之, 宮澤慎一, 那須義久, 藤原智洋, 中原龍一, 町田崇博, 竹下歩, 兼田大輔, 尾崎敏文. 変形性関節症における骨棘形成に対する ADAM12 の関与. 第 31 回日本整形外科基礎学術集会, 2016/10/13-14, 福岡

町田崇博, 西田圭一郎, 那須義久, 中原龍一, 堀田昌宏, 竹下歩, 兼田大輔, 尾崎敏文. メカニカルストレスに対する JAK 阻害薬 Tofacitinib の軟骨破壊抑制効果. 第 26 回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会, 2015.12.5, 岡山

町田崇博, 西田圭一郎, 那須義久, 中原龍一, 斎藤太一, 堀田昌宏, 竹下歩, 兼田大輔, 尾崎敏文. メカニカルストレスに対する JAK 阻害薬 Tofacitinib の軟骨破壊抑制効果. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015.10.22-23, 富山

〔図書〕(計 1 件)

西田圭一郎. 分子標的型 DMARD. 第 2 章. 知っておくべき薬物治療のエッセンス. 久保俊一, 西田圭一郎, 小田良編. 知っておくべき 整形外科医の関節リウマチ診療 ABC. 文光堂, 東京: pp116-117, 2016.

〔産業財産権〕 出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

西田圭一郎（NISHIDA KEIICHIRO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：80284058

(2)研究分担者

大橋俊孝（OOHASHI TOSHITAKA）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号：50194262

川畑智子（KAWABATA TOMOKO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教

研究者番号：90600669