

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893163

研究課題名(和文) 骨壊死に対するmicroRNA導入骨髄単核球細胞を用いた血管・骨再生に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of angiogenesis and bone regeneration in osteonecrosis using bone marrow mononuclear cells transfected by microRNAs.

研究代表者

庄司 剛士 (SHOJI, TAKESHI)

広島大学・病院(医)・病院助教

研究者番号：50736569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド性大腿骨頭壊死症手術患者の大腿骨頭を標本とし、miRNA、mRNAの網羅的発現解析を行い、発現プロファイルを解析した。得られたmiRNAの候補を用いてin vitro実験系において、骨形成促進、血管新生能を評価し、これら骨・血管新生に有用であると思われる4つのmiRNAの候補の選別を行った。間葉系幹細胞(MSC)ヘリポフェクション法により過剰導入した合成miRNAのエクソソームを、培養筋芽細胞等の他の培養細胞に添加することでmiRNAを細胞内へ導入させ、また濃度依存的に増加させることができることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The comprehensive analysis of miRNA and mRNA expression were performed using the femoral head that was obtained from the patient with osteonecrosis of femoral head. I evaluated the ability of osteogenic proliferation and vascularization using miRNA candidates, and lined up four candidates that were considered to be useful for angiogenesis and bone regeneration. I also revealed that microRNA can be transfected into cells in other cultured cells such as myoblasts with exosomes that contained synthetic miRNA that was obtained from microRNA transfected mesenchymal stem cells, and microRNA increased density-dependently.

研究分野：関節病学

キーワード：大腿骨頭壊死症 microRNA エクソソーム 骨髄単核球 血管再生

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性骨壊死症は膠原病や各種臓器移植後などにおける、ステロイドの大量投与に関連して起こる疾患で、その多くは大腿骨頭に発生し、骨頭圧潰に続発して二次性股関節症へ進展する厚生労働省指定の難治性特定疾患である。本症の多くは青壮年期に発症するが、その治療に難渋することが多く、また骨壊死自体に対する骨修復を目的とした治療法は未だ確立されていない。

(2) これまで我々は、大腿骨頭壊死症の患者に対し自家骨髄単核球移植を行ってきたが、その臨床成績は不安定である。そこで、質、効果を高めた骨髄単核球を移植することで早期骨修復を促し、骨頭の圧潰を予防することが可能となれば、骨頭壊死症に対する新たな治療法の確立に繋がる。

(3) 近年、約 22 塩基対の短鎖 RNA 分子である microRNA (miRNA) が新しい遺伝子制御因子として注目されており、我々は動物モデルへの miRNA の局所投与による治療効果および再生促進効果、また大腿骨頭壊死症において、大腿骨頭の壊死骨における血管形成に関連した miR-210 が壊死部周辺に発現していることについて報告している。これらの miRNA を用いることにより壊死骨の修復効果を得ることができれば、従来の治療法らと組み合わせることで大腿骨頭の圧潰ならびに関節症の進行を抑制する、より効果的な治療法の確立に繋がる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、これまで我々が大腿骨頭壊死症の患者に対して行ってきた自家骨髄単核球移植で使用する骨髄単核球に対し、骨再生に促進的に働く miRNA を導入することにより、骨壊死症に対するより効果的な治療法を開発することである。本研究では、miRNA 導入骨髄単核球は、移植細胞としての質(骨形成能、血管形成能)が高められ、また新し

い概念として効果的な miRNA を分泌するキャリアとして周辺組織の再生環境を整える効果があると仮説を立て、以下の 3 課題を明らかにする。

①ステロイド性骨壊死患者由来の骨髄単核球の性質

②単核球への miRNA 導入による遊走能およびサイトカインと miRNA の分泌変化

③骨壊死モデルにおける miRNA 導入骨髄単核球による壊死骨の再生効果

## 3. 研究の方法

(1)①ステロイド性骨壊死患者由来骨髄単核球の miRNA 発現の網羅的解析

ステロイド性大腿骨頭壊死患者、また非大腿骨頭壊死症患者(変形性股関節症)から採取した単核球より RNA を精製し、マイクロアレイ法を用いた miRNA の網羅的発現解析を行う。次に real time PCR 法を用いて候補として挙げられた miRNA の定量化を行い、ステロイド性骨壊死症と関連の強い miRNA の同定を行う。

②miRNA 導入による単核球の応答(サイトカインの分泌)と分泌 miRNA による血管形成能と細胞分化促進能の評価。

①のアレイデータより着目した miRNA の培養単核球への導入によるサイトカインの分泌を解析する。また、血管形成促進することが知られている miR-210 や骨分化制御の報告のある miRNA-222 等の導入により、VEGF や BMP などの血管誘導因子および骨形成因子の分泌が誘導されるか検討する。

③ステロイド性骨壊死モデルへ miRNA 導入単核球移植し骨再生効果を検討する。

先に報告されたラットステロイド性骨壊死症モデルに準じ、Lipopolysaccharide(LPS)(2 mg/kg)を経静脈的に day0, 1 に投与後、day2, 3, 4 に methylprednisolone(20 mg/kg)の筋注しモデルを作成する。ラットステロイド性大腿骨頭壊死モデルを用いて、透視下に骨壊死

部まで骨孔を作成した後、骨髄単核球単独と miRNA 導入骨髄単核球の局所投与を行い、骨修復、血管形成、細胞の apoptosis への影響につき、移植後 4 週の大腿骨頭を用いて組織学的、分子生物学的、免疫組織化学的の評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1)①ステロイド性大腿骨頭壊死症手術患者、また非大腿骨頭壊死症手術患者(変形性股関節症)の症例より、手術時に摘出した大腿骨頭を標本とし、大腿骨頭より採取した骨髄より RNA を精製し、マイクロアレー法を用いた miRNA, メッセンジャーRNA の網羅的発現解析を行い、発現プロファイルを解析した。得られた miRNA の候補を用いて *in vitro* 実験系において、骨形成促進、血管新生能を評価し、これら骨・血管新生に有用であると思われる 4 つの miRNA の候補の選別を行った。(図.1.2)

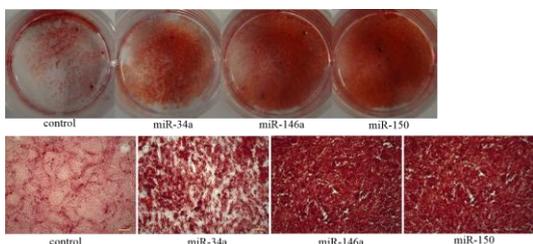


図.1 マイクロアレーにより候補として挙げられた各 microRNA の骨形成効果アリザリンレッド染色による評価

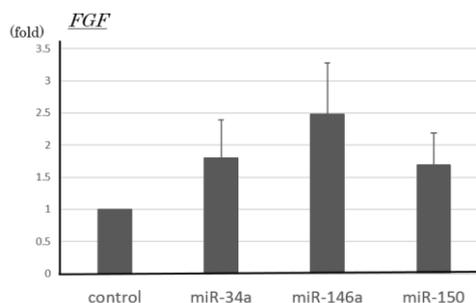
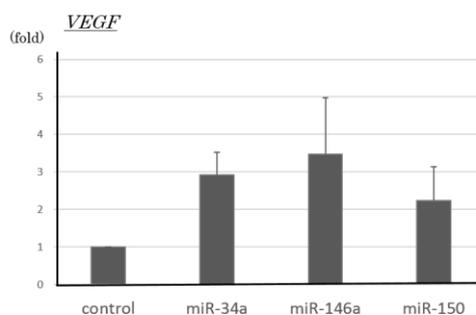
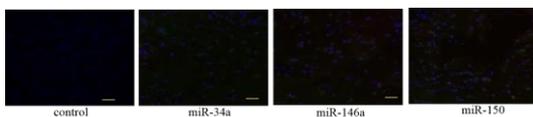


図.2 (上段) 各 microRNA の免疫染色評価 (VEGF), (下段) qPCR による定量評価 (VEGF, FGF)

②血管形成促進することが知られている miRNA-210 や骨分化制御の報告のある miRNA-222 を用いて、間葉系幹細胞 (MSC) へリポフェクション法により過剰導入した合成 miRNA のエクソソームを、培養筋芽細胞等の他の培養細胞に添加することで miRNA を細胞内へ導入させ、また濃度依存的に増加させることができることを確認した。また得られた miRNA は *in vitro* 実験系において、血管新生能を促進させ、ポイデンチャンバー法による解析から細胞遊走能など細胞機能を制御できることを確認した。

(図.3)

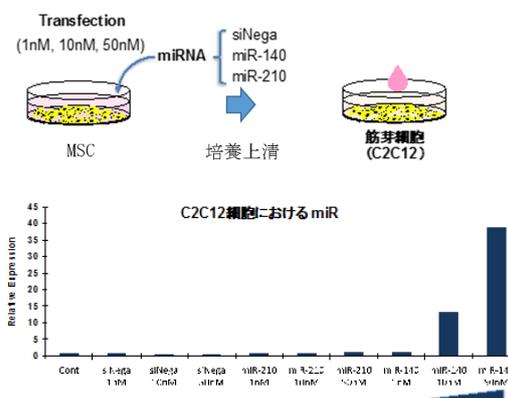


図.3 MSC に合成 miR-140 をリポフェクション法により導入後、培養 24 時間後の血性上清を C2C12 に添加. 容量依存的な transfection を確認できた。

③ラットステロイド性骨壊死症モデルの作成方法確立のため、先に報告されたモデルに準じ、リポポリサッカライド、メチルプレドニゾロンを用いたステロイド性骨壊死モデルを作成後、2 週、4 週で骨壊死発生率の評価を行った。現在のところ明らかな壊死領域を認めるモデルを作成できるまでには至っていない。(図.4)

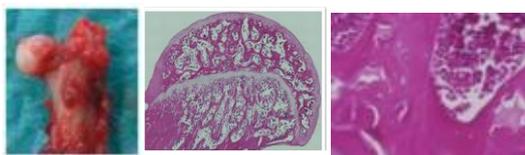


図.4 移植後 4 週の大腿骨頭の肉眼像, 組織評価

## 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 11 件)

1. Shoji T, Yamasaki T, Izumi S, Hachisuka S, Ochi M: The influence of stem offset and neck shaft angles on the range of motion in total hip arthroplasty. International Orthopaedics,30 Jul 2015. 2016 Feb;40(2):245-53. 査読あり

2. 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. 2015 May;20(3):538-46. doi: 10.1007/s00776-015-0709-5. Epub 2015

Mar 11. 査読あり

3. Muhammad Sakti , Tomoyuki Nakasa, Shoji T, Muhammad Andry Usman, Yoshitaka Kawanishi, Michio Hamanishi, Irawan Yusuf, Mitsuo Ochi: Acceleration of healing of the medial collateral ligament of the knee by local administration of synthetic microRNA-210 in a rat model. Asia-Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology, Volume 2, Issue 4, October 2015, Pages 129–136. 査読あり

4. Shoji T, Yasunaga Y, Yamasaki T, Nakamae A, Mori R, Hamanishi M, Ochi M: Transtrochanteric rotational osteotomy combined with intra-articular procedures for pigmented villonodular synovitis of the hip. J Orthop Sci,20(5):943-50, Sep 2015. 査読あり

5. Shoji T, Yasunaga Y, Yamasaki T, Izumi S, Hachisuka S, Ochi M: Low femoral antetorsion as a risk factor for bony impingement after bipolar hemiarthroplasty. J Orthop Surg Res, 7;10:105, Jul 2015. 査読あり

6. Yamasaki T, Yasunaga Y, Shoji T, Izumi S, Hachisuka S, Ochi M. Inclusion and Exclusion Criteria in the Diagnosis of Femoroacetabular Impingement. Arthroscopy,31(7):1403-10.doi:10.1016/j.arthro.2014.12.022,Jul 2015. 査読あり

7. Shoji T, Yasunaga Y, Yamasaki T, Izumi S, Hachisuka S, Ochi M: Low femoral antetorsion and total hip arthroplasty: a risk factor. International Orthopaedics,39(1):7-12. doi: 10.1007/s00264-014-2452-5, Jan 2015. 査読あり

8. 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*,16(6):488, 28 Nov 2014. 査読あり

9. Hamanishi M, Yasunaga Y, Yamasaki T, Mori R, Shoji T, Ochi M. The clinical and radiographic results of intertrochanteric curved varus osteotomy for idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Arch Orthop Trauma Surg*,134(3):305-10, Mar 2014. 査読あり

10. Yamasaki T, Yasunaga Y, Mori R, Hamanishi M, Shoji T, Ochi M. The Cementless Spotorno stem in THA: 10 year results. *Hip Int*,24(1):98-102, 12 Mar 2014. 査読あり

11. Shoji T, Yasunaga Y, Yamasaki T, Mori R, Hamanishi M, Shimose S, Ochi M: T2 mapping MRI encourages an arthroscopic approach for osteoid osteoma in the acetabulum. *Arthroscopy technique*, 3(2):e251-4, 3 Apr 2014. 査読あり

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 庄司 剛士 大腿骨頭壊死症に対する骨頭回転骨切り術の成績 第 42 回日本股関節学会学術総会 グランフロント大阪（大阪市北区）2015 年 10 月 30 日～31 日
2. 庄司 剛士 大腿骨頭壊死症に対する骨髄移植術 第 88 回日本整形外科学会学術総会 神戸ポートピアホテル他（神戸市中央区） 2015 年 5 月 21 日～24 日

〔図書〕（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

庄司 剛士 (SHOJI TAKESHI)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号：50736569

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：