

# 論 文 内 容 要 旨

The effect of intra-articular injection of microRNA-210  
on ligament healing in a rat model

(MicroRNA-210 の関節内投与によるラット靭帯修復への影響)

The American Journal of Sports medicine,  
Nov;40(11):2470-8,2012.

主指導教員：越智 光夫 教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：下瀬 省二 准教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹 教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

庄司 剛士

(医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻)

## 【背景および目的】

前十字靭帯(ACL)は、膝関節の中央部に位置し、大腿骨外顆内面後方から脛骨中央全面に付着し、大腿骨に対する脛骨の前方移動、前内方への回旋を防止し関節を安定化させる支持組織である。ACL損傷の発生数は年間約3~4万件と報告されており、特に若年者でスポーツに伴い損傷することが多い。ACL損傷に対する最大の治療目的は膝関節の安定性を再獲得することであるが、ACLは自然再生能力に乏しいことが知られており、その原因として損傷初期における血管新生に乏しいことが一因と考えられている。過去の報告から保存療法では、再亜脱臼を繰り返し高率に変形性関節症へ進行することが報告されており、現在は自家腱(半腱様筋、薄筋、また骨付き膝蓋腱)を用いた再建手術が一般的である。

一方、近年、約22塩基のnon coding RNAであるmicroRNA(miRNA)が新しい遺伝子カテゴリーとして注目されている。miRNAは、細胞の発生、分化、増殖、およびアポトーシスなどの細胞機能の根幹に関わることが知られ、組織特異的または発生段階特異的に発現し、標的mRNAに結合、翻訳を抑制することで遺伝子発現を調節し、ヒトの様々な疾患へ関与することが数多く報告されている。その中でmiRNA-210(miR-210)は血管内皮細胞の分化、誘導の促進、また血管新生に関与することが知られており、正常酸素下で過剰発現させると、血管形成、VEGF誘導性の細胞分化を促すことが報告され、循環器の分野でmiR-210の心筋内局所投与により、心機能の改善を認めた報告もされている。そこで本研究は、miR-210の血管新生作用に着目し、損傷ACLにおけるmiRNA-210の発現解析を行い、合成miR-210の関節内投与による損傷ACLに対する修復効果について評価した。

## 【方法】

研究は12週齢のLewisラットを用いて2つの実験を行った。ACL部分損傷モデルとして、これまでの報告に準じmedial parapatellar approachで膝関節を展開しACLを露出後、メスでACL中央を約1mm切断し作成した。

### 1) 損傷ACLでのmiR-210の発現解析

ACL部分損傷モデルでの受傷前、受傷後1, 2, 4週におけるmiR-210の発現をreal time PCRを用いて評価した。

### 2) miR-210の膝関節内投与モデル

miR-210関節内投与モデルにおいて、miR-210の靭帯、周囲組織への取り込みを調べるため、FAM蛍光標識したmiR-210(15 $\mu$ g)を同量のatelocollagen(15 $\mu$ g)と膝関節内投与し、24時間後の分布を評価した。

次にB-Bridge Internationalより購入した合成二本鎖miR-210(15 $\mu$ g)とatelocollagen(15 $\mu$ g)の関節内注射群(miR-210群)と、同量のnon-functional siRNAとatelocollagenの関節内注射を行ったcontrol群との比較を行った。評価法として、関節内投与後4週で組織学的評価(H&E染色、Masson-Trichrome染色)を行い、損傷ACL矢状断面像における修復効果を金谷らの評価法に基づき定量評価した。またreal time PCRを用いてmiR-210、VEGF、

collagen type I の発現定量評価, 免疫組織学的染色(VEGF, FGF2, isolectinB4, collagen type I), また tensile tester を用いて力学評価を行った.

#### 【結果】

##### 1) ACL 損傷後の miR-210 の発現解析

Real time PCR による ACL 損傷後の miR-210 の発現解析では, 損傷 ACL では miR-210 の発現は受傷前と比較し損傷後 1 週で低下し, その後漸次増加していた.

##### 2) 関節内投与モデル

FAM 標識した miR-210 関節内投与後 24 時間の組織から, miR-210 の ACL 滑膜組織細胞内への取り込みを認めた。関節内投与後 4 週の評価では, control 群では修復組織は認めなかったが, miR-210 群では損傷部位に修復組織を認め, masson-trichrome 染色から損傷部が繊維性の修復組織により被覆されていることが確認された。Histological score では miR-210 群は 4.8 点, control 群 0.4 点で両群間に有意差を認めた。Real time PCR で miR-210, VEGFA, collagen type I の発現は miR-210 群では control 群と比較し有意に高値であり, 免疫組織学的染色から miR-210 群では control 群と比較し修復組織, また周囲靭帯内に良好な血管新生, また VEGF, FGF2, type1 collagen の発現の亢進を認めた。力学試験より miR-210 群では損傷靭帯の有意な強度の回復を認めた。(Figure.5)

#### 【考察】

miR-210 は, 様々な mRNA を標的とすることが知られ, その target 遺伝子として Ephrin-A3, FGFRL1, NPTX1, RAD52 等の血管新生, 細胞増殖, apoptosis に関与する遺伝子が報告されており, miR-210 は分子, 組織レベルで, 様々な反応を介し, 組織修復に複合的に関与していることが考えられる。本研究から, 損傷後 miR-210 の発現が低下した早期に miR-210 を関節内投与することで, miRNA が滑膜組織内に取り込まれ, VEGF, FGF2, type1 collagen の発現を惹起し, 血管新生, 様々な組織反応を介して靭帯修復につながったと考えられる。miRNA は, 新規治療法のターゲットとして RNA 医薬として既に治験が実施されており, 再生医療分野でも臨床応用可能な薬剤の一つと考えられる。

#### 【結語】

Ds miR-210/atellocollagen の関節内投与は, ACL 部分損傷の修復に効果があることが示され, 今後 miR-210 関節内投与による靭帯修復への応用が期待されると考えた。