

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 医 学 ）	氏名	庄 司 剛 士
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	青 山	裕 彦
審査委員	教 授	東	幸 仁
審査委員	教 授	安 永	裕 司
〔論文審査の要旨〕			
<p>膝前十字靭帯 (ACL) 損傷は、若年者でスポーツ時に損傷することが多く、現在では靭帯再建術を用いた手術療法が一般的な治療法となっている。これは ACL では自然再生能力に乏しく、損傷靭帯が自然治癒し、機能を再獲得することが極めて困難なためであり、その原因のひとつとして損傷初期における血管新生に乏しいことが挙げられている。</p> <p>近年、約 18~25 塩基の非翻訳 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、組織、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、ヒトの様々な疾患にも関与することが報告されている。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、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ている。本研究は、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。また、その際、血管新生との関連を解析した。</p> <p>研究は 12 週齢の Lewis ラット膝を用いて行った。膝関節を展開し、ACL 中央をメスで 1mm 切開し ACL 部分損傷モデルを作成後、2 つの実験を行った。まず、損傷 ACL での miR-210 の発現量を損傷直後、1, 2, 4 週でリアルタイム PCR を用いて定量した。ACL 損傷後、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。</p>			

次に、関節内投与モデルとして、合成 2 本鎖 miR-210 (15 μ g) とアテロコラーゲン(15 μ g) の関節内注射を行った (miR-210 群)。対照実験として、同量の非機能性 siRNA とアテロコラーゲンの関節内注射を行った (対照群)。

まず、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 μ g) を同量のアテロコラーゲン (15 μ g) と膝関節内投与したところ、24 時間後、標識 miR-210 が ACL、滑膜組織細胞内に認められた。

次に、関節内投与後 4 週で、損傷 ACL 矢状断面像における修復効果を組織学的評価 (H&E 染色, Masson-Trichrome 染色) を行い、金谷らの組織学的スコアに基づき定量評価した。対照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。組織学的スコアは miR-210 群で 4.8 点、対照群で 0.4 点となり両群間に有意差を認めた。

miR-210, *VEGFA*, *Col1a1* の発現量をリアルタイム PCR で定量したところ、miR-210 群で対照群と比較し有意に高値であった。免疫組織学の結果、miR-210 群で対照群と比較し修復組織、また周囲滑膜組織内部に良好な血管新生を認め、また VEGF, FGF2, I 型コラーゲンの発現の亢進を認めた。

引っ張り試験装置による力学試験では、miR-210 群において、対照群と比較し、損傷靭帯の有意な強度の回復を認めた。

MicroRNA は様々な mRNA を標的とすることが知られ、miR-210 も、その標的遺伝子として *Ephrin-A3*, *HIF-1 α* , *FGFRL1*, *NPTX1*, *RAD52* 等の血管新生、細胞増殖、アポトーシスに関与する遺伝子が報告されている。このことから 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。本研究は、靭帯損傷後、miR-210 の発現が低下した早期における miR-210 の関節内投与が、miRNA の滑膜組織内への取り込み、VEGF, FGF2, I 型コラーゲン (*Col1a1*) の転写レベルおよび翻訳レベルでの発現上昇、血管新生等様々な組織反応を惹起して、それが靭帯修復につながったことを示唆している。現在、miRNA は、慢性 C 型肝炎等の新規治療法のターゲットとして治験が実施されているが、整形外科領域においても臨床応用可能な薬剤の一つと考えられる。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。

以上の結果から、本論文は膝前十字靭帯損傷に対して microRNA-210 の治療効果を示し、臨床応用可能な新たな治療戦略となる可能性を示しており、整形外科の発展に貢献することが大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。