

論文内容要旨

miR-23a/b clusters are not essential for the pathogenesis of osteoarthritis in mouse aging and a post-traumatic models

(miR-23a/b クラスタはマウスの加齢および外傷後モデルにおける

変形性関節症の発症に必須ではない)

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022, in press.

主指導教員：安達 伸生 教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹 教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：味八木 茂 講師

(広島大学病院 未来医療センター)

藤原 祐輔

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【はじめに】

変形性関節症（OA）は、加齢や外傷などによる軟骨恒常性の破綻に伴い、最終的には関節の破壊へと至る最も代表的な運動器疾患であるが、その治療法の確立には至っていない。我々は、OA 発症における分子機構の一部を明らかにするために、発生や様々な疾患に関与していることが明らかになってきているノンコード RNA である microRNA (miRNA) に着目した。これまで主に軟骨細胞を用いた *in vitro* 実験により、多くの miRNA が OA の病態に関連していることが報告されている。しかし、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 実験による骨格形成や OA 発症における miRNA の役割は未だ不十分である。本研究では、軟骨細胞で高発現していた miR-23a/b クラスターに注目した。miR-23a/b クラスターは、miR-23a-27a-24 (miR-23a クラスター) および miR-23b-27b-24 (miR-23b クラスター) の 2 つからなるが、miR-23a/b クラスターとして OA 発症における役割は未だ不明である。本研究は、軟骨特異的 (Cart-miR-23clus KO マウス) および全身-miR-23a/b クラスター欠損マウス (Glob-miR-23clus KO マウス) を用いて、自然加齢および外傷モデルの 2 つの異なる OA モデルにおいて、OA 発症における miR-23a/b クラスターの役割を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

Cart-miR-23clus KO マウスおよび Glob-miR-23clus KO マウスは、軟骨特異的に miR-23a/b クラスターを欠失させるために Col2Cre マウス、全身で欠失させるために CAGCre マウスを用いて miR-23a/b クラスター-floxed マウスと交配することで各々作製した。miR-23a/b クラスター-flox/flox マウスを対象群マウス (Control) として使用した。加齢モデルでは、12 ヶ月齢および 18 ヶ月齢の膝関節を採取し、加齢性の自然発症 OA を観察し、軟骨、半月板、滑膜、軟骨下骨といった関節組織の評価を行なった。外傷モデルでは、12 週齢の Control および Cart-miR-23clus KO マウスに、右膝の内側半月板切除および内側側副靭帯切断を行うことにより OA を誘導し、術後 8 週と 12 週の膝関節を評価した。サフラニン O 染色による組織学的評価は、関節軟骨の変性・損傷、軟骨下骨の変化、半月板の変性、滑膜炎の重症度についてスコアリングによる評価を行なった。また、膝関節の切片を用いて OA 関連因子である肥大軟骨マーカー 10 型コラーゲン、軟骨基質分解酵素 ADAMTS5 および MMP13、老化細胞マーカー p16^{INK4a} について免疫染色を行なった。アポトーシス細胞を検出するために TUNEL 染色を行なった。さらに、Cart-miR-23clus KO マウスと Control マウスの軟骨細胞を用いてマルチオミクス解析を行なった。

【結果】

関節軟骨における miR-23a/b クラスターの発現パターンでは、4 週齢の C57BL/6J マウスの様々な組織で miR-23a/b クラスターの発現が観察され、肺と関節軟骨でより高発現していた。さらに、ヒト正常軟骨とヒト OA 軟骨細胞における miR-23a/b クラスターの発現を検討したところ、miR-23a、miR-24、miR-27a の発現は、正常軟骨細胞に比べて OA 軟骨細胞で有意に低下していた。軟骨特異的に miR-23a/b クラスターを欠失させた Cart-miR-23clus KO マウスの骨格発達や成熟は、ほぼ正常であった。加齢モデルでは、12 ヶ月齢および 18 ヶ月齢において

Cart-miR-23clus KO マウスと Control の体重や体長に有意な差はなかった。組織学的評価では、両マウスとも 12 ヶ月齢よりも 18 ヶ月齢の方がより OA 様変化が進行していたが、12 ヶ月齢および 18 ヶ月齢で Cart-miR-23clus KO マウスと Control の各スコア間に有意な差はなかった。外傷モデルの組織学的評価においても、Cart-miR-23clus KO マウスと Control で OA の重症度に有意な違いはなかった。そして、ADAMTS5 と MMP13 の発現は、加齢モデルおよび外傷モデルにおいても関節軟骨におけるその陽性細胞数に有意な差はなかった。次に全身で miR-23a/b クラスターを欠失させたマウスを調べた。Glob-miR-23clus KO マウスは、12 ヶ月齢まで Control や Cart-miR-23clus KO マウスより体長、脂肪組織量、骨密度の有意な低下を示し、老化様の表現系を認めた。しかし、MMP13 や p16^{INK4a} 陽性細胞は、Glob-miR-23clus KO マウスの関節軟骨で有意に増加していたにもかかわらず、重度の OA 様変化は認めず、組織学的評価においても Control と比較し各スコアに有意差はなかった。それゆえ、Glob-miR-23clus KO マウスも早期に OA を発症しなかった。

【考察】

miR-23a/b クラスターのうち、miR-23a、miR-23b、miR-27b は、*in vitro* の研究により関節軟骨の恒常性維持や抗炎症に関与することが報告されている。一方、miR-23a および miR-23b が OA の進行に関与するという報告もあり議論の余地が残されたままであった。本研究では、miR-23 a/b クラスターの欠失は、加齢や外傷後の OA の発症や重症化には重要な役割を持たないことが示された。では何故軟骨で高発現している miR-23 a/b クラスター の KO マウスは OA 様の変化を示さなかったのか？その理由の一つとして OA 関連遺伝子の発現レベルは、軟骨で高発現している複数の miRNAs によって協調的に制御されている可能性がある。実際、軟骨 miRNAs は、共通の標的遺伝子の発現レベルを協調的に制御している可能性がある。本研究では、miR-23a/b クラスターの全身 KO では短寿命や骨減少症などの老化様表現型を早期に示すことから、軟骨以外の他の組織や体液中のエクソソーム miR-23 a/b クラスターの欠損が、加齢に伴う骨格を含む成長障害や老化の促進を引き起こしている可能性が示唆された。

【結論】

軟骨高発現 miR-23a/b クラスターは、OA 発症には大きく寄与しない。