Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-06-13

Profiling microRNA expression in fracture nonunions: Potential role of microRNAs in nonunion formation studied in a rat model

Waki, T.

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2016-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6531号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006531

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Profiling microRNA expression in fracture nonunions: Potential role of microRNAs in nonunion formation studied in a rat model

偽関節部における microRNA 発現の網羅的解析：ラット偽関節部における microRNA の潜在的な役割

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒坂昌弘教授）
脇　貴洋

【背景】

骨折治療の基本は整復と固定であり、手術方法や固定材料の開発など、近年の整形外科学および材料工学の進歩によって、多くは満足のいく結果を得ることが可能となってきている。しかしながら今なお、全骨折症例の 5~10%に骨癒合不全や偽関節に至る成績不良例が存在しているという現状がある。偽関節に対して外科的治療が行われても、完全には治癒に至らないケースも少なくなく、頻回の手術を要する場合などがある。治療期間が長期にわたれば、患者は後遺症に苦しむこととなる。また、英国での研究では偽関節症例の治療に患者一人当たり約 600 万円もの医療費を要すると報告されている。偽関節の発生は、患者自身に精神的・肉体的苦痛をもたらすのみならず、社会的にも非常に重要な問題といえる。しかし、近年の整形外科研究領域の進歩にもかかわらず、偽関節における分子生物学的な病態生理の知見は限定的であり、とりわけ、偽関節の発生過程における分子生物学的な病態は未だ明らかにされていない。

microRNA（以下 miRNA）は約 22 塩基長の small RNA の一種であり、標的とする遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在する相補的配列に結合し、翻訳阻害あるいは messenger RNA の直接的破壊により遺伝子発現を制御している。タンパク質をコードしない non-coding RNA である miRNA がヒトの様々な疾患に関与していることが近年報告されており、整形外科分野では変形性関節症や関節リウマチ、骨粗鬆症における miRNA の関与が明らかにされている。しかしながら、偽関節の発生と miRNA の関与を調べた研究は未だなされていない。

我々は偽関節形成過程における miRNA の役割を解明するため、マイクロアレイ解析を用いてラット大腿骨偽関節における miRNA の発現を網羅的に解析し、さらに real-time PCR を用いて偽関節群と正常骨折群でその発現量を比較検討した。

【対象と方法】

Sprague-Dawley ラット（12 週齢；雄）、94 匹を用いた。正常骨折モデルは、直径 1.2mm のキルシュナー鋼線を膝関節から逆行性に大腿骨骨髄腔に挿入し、三点支持器上で重錘を落下させて、大腿骨骨幹部に閉鎖性横骨折を作成した。また、偽関節モデルは、正常骨折モデルと同様に骨折を作成し、次いで同部を露出し、骨折部周囲の骨膜を 2mm ずつ電気メスで全周性に焼灼することにより作成した。骨折後 14 日目に骨折部および偽関節部の組織から抽出した miRNA に対し

マイクロアレイ解析を用いて網羅的な解析を行った。その解析結果において、正常骨折群に比べて偽関節群で発現量が多かった miRNA を選択し、骨折後 3・7・10・14・21・28 日目に骨折部の組織から抽出した miRNA を用いて real-time PCR にて、両群における発現量を比較検討した。

【結果】

1) マイクロアレイ解析

骨折後 14 日目に骨折部および偽関節部の組織から miRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を用いて 680 種類の miRNA の発現量を網羅的に解析したところ、正常骨折群に比べて偽関節群で発現量の多い miRNA は 363 種類認めた。これらのうち、偽関節群で著しく増加している miRNA を同定するために、発現量が 2.0 倍より大・CV 値が 50%より小・Hy3 signal が 10 より大という基準を用い、miR-21-5p・miR-31a-3p・miR-31a-5p・miR-142-3p・miR-142-5p・miR-143-3p・miR-146a-5p・miR-146b-5p・miR-223-3p の 9 種類の miRNA を選定した。

2) Real-time PCR

マイクロアレイ解析結果から選定した 9 種類の miRNA のうち、ラットのみでなくヒトにも存在する miR-31a-3p・miR-31a-5p・miR-146a-5p・miR-146b-5p・miR-223-3p の 5 つ miRNA に対して、骨折後 14 日目に骨折部および偽関節部の組織から抽出した miRNA を用いて real-time PCR を行ったところ、すべての miRNA の発現量が正常骨折群に比べて偽関節群で有意に増加しており、マイクロアレイ解析の結果が裏付けられた。以下に骨折後 3 日目から 28 日目における、これら 5 つの miRNA の発現の経時的変化について述べる。

i) miR-31a-3p

正常骨折群に比べて偽関節群では、骨折後 14・28 日目において有意に高い発現量を認めた。偽関節群における経時的変化では、発現量は 14 日目まで増加し、その後、漸減した。

ii) miR-31a-5p

正常骨折群に比べて偽関節群では、骨折後 14・28 日目において有意に高い発現量を認めた。一方、骨折後 21 日目においては有意に低い発現量を認めた。偽関節群における経時的変化では、発現量は 14 日目まで増加し、21 日目に減少し、28 日目には再度増加した。

iii) miR-146a-5p

正常骨折群に比べて偽関節群では、骨折後 14 日目において有意に高い発現量を認めた。一方、骨折後 21 日目においては有意に低い発現量を認めた。偽関節群における経時的変化では、発現量は 14 日目まで増加し、21 日目に減少し、28 日目には再度増加した。

iv) miR-146b-5p

正常骨折群に比べて偽関節群では、骨折後 14 日目において有意に高い発現量を認めた。一方、骨折後 7・21・28 日目においては有意に低い発現量を認めた。偽関節群における経時的変化では、発現量は 14 日目まで増加し、その後漸減した。

v) miR-223-3p

正常骨折群に比べて偽関節群では、骨折後 3・14 日目において有意に高い発現量を認めた。一方、骨折後 21・28 日目においては有意に低い発現量を認めた。偽関節群における比較では、発現量は 7 日目に減少し、その後 14 日目まで増加し、21 日目に再度減少に転じた。

【考察】

今回、我々はラットの正常骨折モデルおよび偽関節モデルを作成し、マイクロアレイ解析および real-time PCR を用いて、正常骨折部に比べて偽関節部において著明に増加がみられた 5 つの miRNA をはじめて同定し、両群間の発現量の差異および、偽関節群における発現量の経時的な変化を明らかにした。

炎症は骨折治癒において極めて重要な因子であると報告されており、その阻害は偽関節形成にも関与していることが示唆されている。例えば、IL-6 や TNFα といったある種の遺伝子を欠損させた動物モデルにおいては、骨癒合が遅延することが報告されている。今回の我々の研究で同定された miR-31a-5p・miR-146a-5p・miR-146b-5p・miR-223-3p は炎症反応を制御することが報告されており、これら 4 つの miRNA は骨折部において炎症を制御することで、偽関節形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

miR-31a-5p は骨髄間葉系幹細胞の骨分化を負に制御することが報告されている。また、miR-31a-3p は胎生期の軟骨発育において重要な制御因子である fibroblast growth factor 3 を負に制御することが報告されている。したがって、これら 2 つの miRNA が、骨折治癒過程において重要な役割を果たす骨形成および軟骨形成を負に制御することで、骨折の癒合を阻害し、偽関節形成に

至らしめる可能性がある。

近年、miRNA が癌や白血病、心疾患を始めとした様々な疾患に関与することが明らかとなってきており、miRNA を標的とした治療戦略が急速に注目を集めつつある。過剰な miRNA を抑制すること、あるいは不足する miRNA を補充することで、miRNA の発現を制御し疾患を治療しようとする「miRNA 創薬」の試みが始まっている。我々が明らかにした 5 つの miRNA を治療標的とした薬剤が開発され、これらを局所投与すれば、偽関節の予防や治療に結び付く臨床応用が将来的に可能となるであろう。

以上より、マイクロアレイ解析および real-time PCR において正常骨折モデルに比べて、偽関節モデルで著明な発現増加がみられた miR-31-3p・miR-31-5p・miR-146a・miR-146b-5p・miR-223 の 5 つの miRNA は偽関節形成過程に重要な役割を果たすことが示唆された。これらの miRNA を応用し、偽関節の予防および治療を目標とする miRNA 創薬への展開が期待される。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2556 号	氏 名	脇 貴洋
論文題目 Title of Dissertation	Profiling microRNA expression in fracture nonunions: Potential role of microRNAs in nonunion formation studied in a rat model 偽関節部における microRNA 発現の網羅的解析：ラット偽関節部における microRNA の潜在的な役割		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner	寺師 浩人 眞庭 謙昌 荒川 創一	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

microRNA（以下 miRNA）は約 22 塩基長の small RNA の一種であり、標的とする遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する相補的配列に結合し、翻訳阻害あるいは messenger RNA の直接的破壊により遺伝子発現を制御している。miRNA がヒトの様々な疾患に関与していることが近年報告されているが、偽関節の発生と miRNA の関与を調べた研究は未だなされていない。

研究者らは偽関節形成過程における miRNA の役割を解明するため、マイクロアレイ解析を用いてラット大腿骨偽関節における miRNA の発現を網羅的に解析し、さらに real-time PCR を用いて偽関節群と正常骨折群でその発現量を比較検討した。

対象と方法

SD ラット（12 週齢；雄）、94 匹を用いた。正常骨折モデルは、鋼線を膝関節から逆行性に大腿骨骨髄腔に挿入し、重錘を落下させて、大腿骨骨幹部に閉鎖性横骨折を作成した。また、偽関節モデルは、正常骨折モデルと同様に骨折を作成し、次いで同部を露出し、骨折部周囲の骨膜を電気メスで全周性に焼灼することにより作成した。骨折後 14 日目に骨折部および偽関節部の組織から抽出した miRNA に対しマイクロアレイ解析を用いて網羅的な解析を行った。その解析結果において、正常骨折群に比べて偽関節群で発現量が多かった miRNA を選択し、骨折後 3・7・10・14・21・28 日目に骨折部の組織から抽出した miRNA を用いて real-time PCR にて、両群における発現量を比較検討した。

結果

1) マイクロアレイ解析

骨折後 14 日目に骨折部および偽関節部の組織から miRNA を抽出し、マイクロアレイ解析を用いて 680 種類の miRNA の発現量を網羅的に解析したところ、正常骨折群に比べて偽関節群で発現量の多い miRNA は 363 種類認めた。これらのうち、miR-21-5p・miR-31a-3p・miR-31a-5p・miR-142-3p・miR-142-5p・

miR-143-3p・miR-146a-5p・miR-146b-5p・miR-223-3p の 9 種類の miRNA を選定した。

2) Real-time PCR

マイクロアレイ解析結果から選定した 9 種類の miRNA のうち、ラットのみでなくヒトにも存在する miR-31a-3p・miR-31a-5p・miR-146a-5p・miR-146b-5p・miR-223-3p の 5 つ miRNA に対して、骨折後 14 日目に骨折部および偽関節部の組織から抽出した miRNA を用いて real-time PCR を行ったところ、すべての miRNA の発現量が正常骨折群に比べて偽関節群で有意に増加しており、マイクロアレイ解析の結果が裏付けられた。

考察ならびに結論

炎症は骨折治癒において極めて重要な因子であると報告されており、その阻害は偽関節形成にも関与していることが示唆されている。今回の研究で同定された miR-31a-5p・miR-146a-5p・miR-146b-5p・miR-223-3p は炎症反応を制御することが報告されており、これら 4 つの miRNA は骨折部において炎症を制御することで、偽関節形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

miR-31a-5p は骨髄間葉系幹細胞の骨分化を負に制御することが報告されている。また、miR-31a-3p は胎生期の軟骨発育において重要な制御因子である fibroblast growth factor 3 を負に制御することが報告されている。したがって、これら 2 つの miRNA が、骨折治癒過程において重要な役割を果たす骨形成および軟骨形成を負に制御することで、骨折の癒合を阻害し、偽関節形成に至らしめる可能性がある。

以上より、これら 5 つの miRNA は偽関節形成過程に重要な役割を果たすことが示唆された。これらの miRNA を応用し、偽関節の予防および治療を目標とする miRNA 創薬への展開が期待される。本研究は、ラットの正常骨折モデルおよび偽関節モデルを作成し、マイクロアレイ解析および real-time PCR を用いて、正常骨折部に比べて偽関節部において著明に増加がみられた 5 つの miRNA をはじめて同定した。従来行われていない、偽関節部における miRNA を解析した研究であり、偽関節の予防および治療を目標とする miRNA 創薬への展開が期待される点で価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。