

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：田中 信帆

専攻分野：疾患プロテオーム・分子病態治療学

指導教授：加藤 智啓

主論文の題目：

変形性膝関節症において関節滑膜でのマトリックスメタロプロテアーゼの発現に関与する miRNA の探索

共著者：

津野 宏隆、加藤 智啓、福井 尚志

緒言

変形性関節症（OA）は関節軟骨の変性消失を本態とする疾患である。軟骨の変性消失には滑膜で産生されたマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-1、-2、および-3 が関与するとされる。本研究では、OA 膝関節から採取した関節液を用いて MMP-1 の濃度と関連する miRNA を同定し、次に、末期 OA 膝関節の滑膜組織を用いて、同定した miRNA が滑膜における MMP-1 発現とどのように関与するかを検討した。また、同定した miRNA と MMP-2 および-3 との関連も解析した。

方法・対象

関節液は早期または進行期の内側型の膝 OA 26 例 26 膝（平均年齢 68 歳）から採取した。滑膜組織は、人工関節置換術が行われた末期の内側型膝 OA 30 例 30 膝（平均年齢 74 歳）から採取した。

関節液中の MMP-1、-2、-3 の濃度は Luminex により測定した。また、関節液中のエクソソームより抽出した miRNA を用い、miScript miRNA PCR Array により 65 種の miRNA について定量的解析を行った。

滑膜組織より抽出した miRNA を用い、miR-21-5p および miR-195-5p の量を、RNU48 を内部標準として qPCR により定量した。同じく滑膜組織より抽出した total RNA を用い、*MMP1*、*MMP2*、および *MMP3* の mRNA 量を、*GAPDH* を内部標準として qPCR により定量した。

統計解析はエクセル統計 2015 を用い、検定は Student' s unpaired *t*-test によって行った。有意水準は $p = 0.05$ とした。

本研究は（独）国立病院機構相模原病院の倫理委員会の承認を得て行われ（承認番号 2007102310）、検体採取は対象者から文書で同意を得た上で行われた。

結果

関節液において MMP-1 の濃度との相関が強い上位 5 位 6 種の miRNA は、相関が強い順に miR-21-5p、miR-125a-5p、miR-26a-5p、miR-30b-5p、miR-125b-5p および miR-195-5p であった。関節液検体を MMP-1 濃度の高値群（13 例）と低値群（13 例）にわけた時、高値群と低値群の間に miRNA 量比の大きい上位 5 位 5 種の miRNA は、量比の大きい順に miR-150-5p、miR-195-5p、miR-223-3p、miR-21-5p および miR-126-3p であった。両結果においてともに上位 5 位に入っていた miRNA は miR-21-5p および miR-195-5p の 2 種であり、この 2 種の miRNA は MMP-1 の産生に強く関連すると考え、次に滑膜組織において MMP-1 との関連を調べた。

滑膜組織中の miR-21-5p の量と *MMP1* の mRNA 量を qPCR により測定したところ、両者の間に有意の負の相関が認められた ($r = -0.50$ 、 $p < 0.001$)。一方、miR-195-5p の量と *MMP1* の mRNA 量の間には有意の相関関係は認められなかった ($r = -0.01$ 、 $p = 0.927$)。この結果から、miR-21-5p が滑膜組織における MMP-1 の発現に関与すると考えられた。

上記の結果から miR-21-5p が MMP-2 および-3 の発現にも関与する可能性を考え、関節液検体において MMP-2 および-3 の濃度及び miR-21-5p 量を測定したところ、MMP-2 および-3 共に miR-21-5p 量との間に有意の負の相関が見出された (MMP-2 : $r = -0.69$ 、 $p < 0.01$ 、MMP-3 : $r = -0.56$ 、 $p < 0.05$)。ついで滑膜組織中の *MMP2* および *MMP3* の mRNA 量と miR-21-5p 量を調べたところ、*MMP2* および *MMP3* 共に miR-21-5p 量との間に有意の負の相関が認められた (*MMP2* : $r = -0.65$ 、 $p < 0.001$ 、*MMP3* : $r = -0.59$ 、 $p < 0.001$)。これらの結果から miR-21-5p は滑膜組織における MMP-2 および-3 の発現にも関与すると考えられた。

考察

本研究から、miR-21-5p の量は、関節液において MMP-1、-2、および-3 の濃度と負に相関し、また滑膜組織においても、*MMP1*、*MMP2*、および *MMP3* の mRNA 量と負の相関があることが判明した。両者の因果関係は現時点では不明であるが、OA 滑膜では miR-21-5p がこれら 3 種の MMP の産生を負に制御しており、miR-21-5p の発現低下に伴ってその負

の制御が弱まり、3種の MMP の発現が増加する可能性が考えられた。今後、その実証を行っていく必要がある。

結論

本研究により、OA 滑膜では miR-21-5p が減少することにより、MMP-1、-2、および-3 の発現が増加し、これら MMP が関節液を介して軟骨に作用することで軟骨の変性消失が進む可能性が示された。