

主論文の要旨

**MicroRNA-125b regulates the expression of
aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human
osteoarthritic chondrocytes**

〔 ヒト OA 軟骨細胞において microRNA-125b は
ADAMTS-4 の発現を制御する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

松川 哲也

【はじめに】

変形性関節症 (OA) は軟骨の細胞外基質であるプロテオグリカンやコラーゲンの分解により軟骨変性が生じる疾患である。関節症軟骨組織では IL-1 β などの炎症性サイトカインが産生され、刺激を受けた軟骨細胞では蛋白分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP)、アグリカナゼの分泌が促進される。コラーゲン分解には MMP-13 が高い酵素活性を持つのに対して、プロテオグリカン分解には a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) が大きく関わることに注目を集め、この中でも aggrecanase-1, -2 (ADAMTS4, 5) が関節破壊に重要な役割を果たすことが報告されている。

MicroRNA は 19 から 23 塩基で形成される non-coding RNA の一群であり、標的 messenger RNA (mRNA) の 3'-UTR 末端に結合し、標的 mRNA の分解あるいは蛋白への翻訳を抑制する。

近年、変形性関節症に対する microRNA の関与が注目されており、ヒト軟骨細胞において、ADAMTS5、MMP-13 を標的とした microRNA の存在が相次いで明らかとなったが、ADAMTS4 の発現を制御する microRNA の存在は明らかにされていなかった。

本研究では bioinformatics を用いて ADAMTS4 を制御する microRNA を同定し、ヒト関節軟骨における機能を検討した。

【対象及び方法】

ヒト膝関節軟骨組織および培養軟骨細胞から RNA を抽出し、microRNA および標的遺伝子である ADAMT4 を real time PCR にて解析した。補正にはそれぞれの house-keeping 遺伝子とされている U6 small nuclear RNA (RNU6B) 及び glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

培養軟骨細胞に microRNA precursor (pre-miR)、microRNA inhibitor (anti-miR) を Lipofection 法にて導入し、microRNA の強制発現あるいは発現抑制を行った後、IL-1 β を添加して RNA および蛋白を抽出し、microRNA と標的遺伝子の mRNA 発現を real-time PCR、標的遺伝子の蛋白産生を Western blotting 法を用いて測定した。

更に、Luciferase reporter assay にて microRNA-125b (miR-125b) が ADAMTS4 を直接制御していることを検討した。

統計学的有意差は、Student's *t* test にて解析し、*P* 値が 0.05 以下を有意差あり、0.001 以下をより大きな有意差があるとした。

【結果】

Target scan 6.2 を用いて ADAMTS4-mRNA を標的とする microRNA として miR-125a、-125b、-4319 の 3 つの microRNA を検出した。(図 1A) ヒト正常軟骨細胞においては、miR-125a、-4319 と比較して miR-125b が強く発現していた。(図 1B) ヒト軟骨組織において、miR-125b の発現は加齢によりわずかな低下が認められたが、ヒト軟骨組織および軟骨細胞において OA 変化により明らかな低下が認められた。(図

1C)

ヒト正常および OA 軟骨細胞を IL-1 β で刺激すると miR-125b の発現は経時的に低下する一方で、ADAMTS4, 5 の mRNA の発現は増加した。ADAMTS5 と比較して ADAMTS4 mRNA の IL-1 β 刺激に対する発現増加は顕著であった。(図 2)

次にヒト軟骨細胞において、miR-125b の強制発現あるいは発現抑制を誘導するために、pre-miR、anti-miR を Lipofectamine 2000 を用いて遺伝子導入した。(図 3A) Pre-miR、anti-miR の遺伝子導入 24 時間後に IL-1 β で刺激した軟骨細胞より RNA、蛋白を抽出した。

MiR-125b の強制発現により、IL-1 β 刺激に対する ADAMTS4 mRNA および蛋白の発現は抑制されたのに対して、miR-125b の発現抑制により、IL-1 β 刺激に対する ADAMTS4 mRNA の発現は増加した。(図 3B、図 4)

MiR-125b が ADAMTS4 の mRNA から蛋白への翻訳を直接制御しているかを確認するため、Luciferase reporter assay を用いた実験を行った。MiR-125b は 11 番染色体(miR-125b-1)と 21 番染色体 (miR-125b-2) 上に code されており、それぞれの miR-125b precursor の clone を発現 vector に組み込み、さらにそれぞれの mutation vector を作成した。これらの precursor を組み込んだ vector の遺伝子導入により、miR-125b が強制発現されることを確認した。(図 5A) ADAMTS4 3'-UTR の clone を作成し、Luciferase vector に組み込み、これに対する mutation vector も作成した。これらを軟骨細胞と比較して miR-125b の発現がほとんどない HEK293T 細胞に、Renilla luciferase control vector と一緒に遺伝子導入し、Dual Luciferase Assay 法により測定した。(図 5B) MiR-125b の強制発現により、ADAMTS4 3'-UTR の clone を組み込んだ Luciferase vector による Luciferase 活性の低下が認められた。(図 5C)

以上より、miR-125b は ADAMTS4 mRNA の蛋白への翻訳を直接阻害することにより、ヒト軟骨細胞において ADAMTS4 mRNA および蛋白の増加を抑制することが示唆された。

【考察】

我々は Target scan を用いて、ADAMTS4 mRNA の 3'-UTR 末端に seed sequence を持つ microRNA である、miR-125a、-125b、-4319 を発見した。MiR-125b は miR-125a、-4319 と比較して、ヒト軟骨組織および細胞で強く発現しており、正常軟骨と比較して、OA 軟骨で miR-125b が著しく低下していたことから、miR-125b が OA の病態に強く関与していると考えた。ヒト軟骨細胞において、miR-125b を強制発現させることにより、IL-1 β により誘導される ADAMTS4 の mRNA と蛋白の増加を抑制したことから、ヒト関節軟骨において、miR-125b が ADAMTS4 を制御することを証明した。更に Luciferase Reporter Assay において、miR-125b の増加により ADAMTS4 3'-UTR clone を含む Luciferase の活性が低下したことから、miR-125b が ADAMTS4 mRNA を直接制御していることを示した。

【結語】

ヒト関節軟骨において、miR-125b が ADAMTS4 を制御していることを示した。MiR-125b をコントロールすることが、OA の予防や治療の新たな手法となりうることを提唱する。