

論文内容の要旨

Targeting extracellular miR-21-TLR7 signaling provides
long-lasting analgesia in osteoarthritis

細胞外 miR-21 による TLR7 活性化を標的とした
変形性関節症に対する持続的鎮痛効果

日本医科大学大学院医学研究科 整形外科学分野

大学院生 星川 直哉

Molecular Therapy - Nucleic Acids, In press

【背景】

疼痛を有する症候性の変形性関節症（Osteoarthritis: OA）の頻度は高く、その有症率は7～19%と報告されているが、現在の治療薬は治療効果が小さく、重篤な有害作用を生じることがあるとされている。OAの痛みの原因はいまだ不明な点が多く、新薬の開発のために痛みの原因究明が必要である。近年種々の疼痛疾患における microRNA（miRNA）の重要性が報告されているが、OAの痛みにおける miRNA の関与はほとんど報告されていない。そこで今回我々は OA モデルラットにおける miRNA の関与を調査した。

【方法と結果】

ラットを用いて、前十字靭帯切離（Anterior cruciate ligament transection: ACLT）による膝 OA モデルを作製した。OA モデルラットの疼痛は膝の圧迫や後肢足底への機械的刺激による疼痛を指標として調査した。膝の圧迫に対する疼痛はラットの膝関節にトランスデューサを置き徐々に圧迫した際に啼泣した時の圧力を記録した。後肢足底への刺激による疼痛は von Frey test によって評価した。この検査ではラットの足底を太さの違うフィラメントで刺激し、徐々に太いフィラメントにした際に5回の刺激により3回以上逃避行動を起こした際のフィラメントによりかかる力を計測した。ACLT 群では偽手術群に比べ2週間後から少なくとも8週まで刺激に対する反応閾値が低下し、疼痛を生じた。

OAの痛みは滑膜炎と強く相関することから、ACLT 後2週後の滑膜において変化する miRNA の網羅的なスクリーニングを行った。発現変化した miRNA のうちで miR-21 の発現量が最も高かった。滑膜組織および軟骨組織を培養し、その培養液中の miR-21 の量を定量的 PCR にて検討しところ、miR-21 は滑膜からより豊富に細胞外へと放出されていた。また ACLT 後14日および42日での滑膜および関節液中の miR-21 の含有量の上昇を定量的 PCR で確認した。

細胞外 miR-21 と疼痛との関連を調査するために、miR-21 に対する阻害薬（2'-O-Methyl 化アンチセンス RNA）をリポソーム等の輸送担体を使用せずに投与した。ACLT 後2週目に関節腔内単回注射することにより、3週間に渡り疼痛を緩和することができた。一方で、正常ラットの膝関節内に miR-21 自体を注射したところ疼痛を惹起した。miR-21 が Toll-like receptor（TLR）7 タンパク質に直接結合し活性化させることから、標的 mRNA を認識するシード配列は保存され、かつ TLR7 結合配列が改変された mutant miR-21 を正常ラットに関節腔内注射したところ疼痛は惹起されなかった。さらに miR-21 投与による疼痛は TLR7-9 阻害薬を同時に関節腔内注射することにより減弱された。ACLT 術後2週目に TLR7-9 阻害薬を単回関節腔内注射することによっても、疼痛が3週間に渡り有意に抑制された。以上から miR-21 による疼痛は miRNA による翻訳抑制というよりも、TLR7-9 の活性化により生じていると考えた。

細胞外 miR-21 の標的とする細胞を同定するために TLR7 の局在についても検討を行った。蛍光免疫染色を行ったところマクロファージ様および線維芽細胞様のいずれの滑膜細

胞にも TLR7 が発現していた。また逆行性トレーサーである DiI を関節内に注射し膝関節を支配する後根神経節細胞を標識し蛍光免疫染色を行ったところ、関節を神経支配する後根神経節細胞の一部に TLR7 が発現していた。

miR-21 が一次感覚神経に直接作用するかを確認するために、単離した後根神経節細胞を miR-21 で刺激したところ TLR7 により発現が上昇すると報告されている IL-1 β や IL-6 の mRNA 発現量が増加した。

【考察】

核酸医薬は新規治療薬として注目されているが一般的にドラッグデリバリーにおいて問題がある。細胞内に核酸医薬を配送するためにリポソームやウイルスベクターのような輸送担体が必要となるが、細胞外 miRNA を標的として膝関節腔内に直接注射することでこの問題を克服することができた。

miR-21 は OA 患者の軟骨で変化しており、軟骨の変性に関与することが報告されている。最近の報告では miR-21 阻害薬の関節腔内注射により、OA モデルマウスの軟骨変性を抑制したと報告されている。miR-21 阻害薬は疼痛のみならず軟骨変性も抑える可能性がある。

今回我々は OA において関節中の miR-21 が TLR を活性化することで疼痛を引き起こすことを明らかにした。OA モデルラットに対する miR-21 阻害薬および TLR7 阻害薬の関節腔内単回注射は長期に渡り疼痛を改善することから、OA の新規治療薬となり得る可能性を示すことができた。