

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

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, volume 19, MARCH 6, 2020 掲載予定

DOI: 10.1016/j.omtn.2019.11.011

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。そこで申請者は OA モデルラットにおける miRNA の関与を調査した。

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。ACLT 群では偽手術群に比べ2週間から少なくとも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術後14日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術後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術後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。

本研究で申請者は OA において関節中の miR-21 が TLR7 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している。

第二次審査では、von Frey test の妥当性、膝関節を支配する後根神経節細胞の特性、性ホルモンと miRNA・TLR の関係、miR-21 の細胞外放出のメカニズム、OA 以外の疾患での miR-21 の関与、miR-21 以外の miRNA の OA への関与などについて幅広い質疑が行われたが、いずれも適切な回答がなされ、申請者は本研究に関連する知識を十分に有していることが示された。本研究は OA の痛みに着目し、細胞外 miR-21 や TLR7 の阻害による新規治療薬の開発に寄与する新規性のあるものであると考えられた。

以上より本論文は学位論文として価値あるものと認定した。