

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 3 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15535

研究課題名(和文)変形性関節症モデル動物における歩行の高速度3次元解析による関節痛治療評価法の開発

研究課題名(英文)Gait analyses of osteoarthritis model mice for joint pain assessment

研究代表者

齋藤 琢(SAITO, Taku)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30456107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症の中心的な症状は関節の痛みであるが、マウスモデルでの評価は組織学的なものがほとんどであり、痛みについては不明な点が多かった。本研究では動作解析により変形性関節症モデルマウスの関節痛がどのような歩行の異常をもたらすかを検討した。変形性関節症モデルマウスを用意し、十分に変形性関節症が進行するのを待った。その後、トレッドミルでマウスを歩行させ、3台の高速度カメラで記録し、マーカーの動きを計算した。それぞれのマーカーの高さ、各関節の角度がどのように推移するかを調べ、接地時の膝の踏み込む角度と、けりだす角度に変化がみられることなどが分かった。

研究成果の概要(英文)：Joint pain is the most common symptom of OA, however, molecular mechanisms of pain in OA joint have been generally unrevealed. Here, we performed the motion analysis of surgically-induced OA model mice to examine how cartilage degeneration of the knee joint alters gait and joint motions. Locomotion recording and Motion analyses were performed at six months after osteoarthritis surgery. Among all parameters, the degree of knee flexion in the stepping-in phase was significantly changed in the OA group.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科学 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症は、関節軟骨の変性・摩耗、骨棘形成のほか、軟骨下骨や半月板、靭帯、滑膜など関節の構成要素の多彩な病的変化を伴い、痛みが主訴となる。初期・進行期には非ステロイド性消炎鎮痛剤の内服、ヒアルロン酸の関節内注射を行うことが多いが、痛みのコントロールは限定的である。本学で行っている国内最大の運動器住民コホート研究 (ROAD プロジェクト) によると、膝関節の痛みで日常生活に支障を来している人は 40 歳以上だけで 780 万人存在し、レントゲンで膝関節変形がみられる人は 2,530 万人存在する。これに対して人工膝関節置換術の年間施行数は 7 万件強に過ぎず、膨大な数の人々が痛みを苦しむ現状が明らかとなっている。

申請者らのグループは 2005 年に変形性関節症のマウスモデルを開発し、これまでに Runx2, C/EBP, HIF-2 などの転写因子や、Notch シグナルが変形性関節症の病態を制御していることを明らかにしてきた (*Arthritis Rheum* 54:2462,2006, *Hum Mol Genet* 21:1111,2013, *Nat Med* 16:678,2010, *PNAS* 110:1875,2013)。さらに Notch シグナルを化合物にて阻害することで変形性関節症進行の抑制に成功、また新規軟骨誘導性化合物による関節軟骨再生にも成功した (*Ann Rheum Dis* 72:748,2013)。しかしこれらは全て組織学的評価をベースにしており、実際の痛みとの関係性については不明である。レントゲン上の変形と痛みが必ずしも相関しないことも近年指摘されており、変形性関節症の疼痛制御を目指すにあたってはモデル動物での痛みの評価系開発が課題であった。最近では疼痛過敏などの知覚異常を回避行動の解析により定量する試みもあるが、安定した結果は得られていない。申請者らは過去に市販の歩行解析装置 CatWalk によって変形性関節症モデルマウスの解析を行い、痛みによる変化を探索したが、安定した結果は得られなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では詳細な解析手法として最新のモーションキャプチャーによる歩行解析の手法を導入、各関節の詳細な位置、角度の変化を解析する。まずより詳細な解析が可能なラットを用いて変形性関節症モデルを作成し、時系列で測定を行うとともに、プラジキニン関節内注射を行ってパラメーター変化が痛み起因することを確認する。さらに除痛でパラメーターがどのように変化しうるかを測定して治療効果判定モデルとしての有用性を検討、申請者が開発した薬剤の痛みへの有効性も検証する。また同様の解析法がマウスでも有効であるか検証を行う。マウスモデルの開発から 10 年が経過し、変形性関節症の分子メカニズムの解明は飛躍

的に進歩してきた。また病態の責任分子が解明されることによって、試験的に変形性関節症の病態介入に成功した例も散見されてきた。研究代表者の齋藤らは Notch シグナルの阻害剤投与によって変形性関節症の進行抑制に成功したほか (*PNAS* 110:1875,2013)、新規軟骨細胞分化誘導性化合物 TD-198946 によって変性した関節軟骨の再生にも成功している (*Ann Rheum Dis* 72:748,2013)。しかしこれらの成果は全て関節軟骨の組織学的な評価に基づくものであり、実際に変形性関節症に伴う痛みをどの程度緩和しうるかは全く不明である。変形性関節症の主訴はあくまで痛みであり、今後有望な薬剤などを大型動物ベースの前臨床試験に推進していく上で、マウスやラットなど小動物モデルでの痛みの評価を正確に行う必要がある。研究分担者の柳原らはモーションキャプチャーを用いたマウス、ラットの行動解析によって小脳変性などの神経疾患の病態評価に多大な実績を有する。本研究では、マウスモデルをベースに変形性関節症を研究してきた齋藤らと、小動物行動解析の技法を持つ柳原らが融合することにより、小動物が感じている痛みを多くのパラメーターから定量的に評価しようとするものであり、前例のない挑戦である。

## 3. 研究の方法

変形性関節症モデル手術として片膝の内側半月板と内側側副靭帯の切除を行った野生型オスマウスを 10 匹用意し、術後半年飼育して十分に変形性関節症が進行するのを待った。その後、トレッドミル歩行に馴化させたのち、さまざまな速度でマウスを歩行させ、3 台の高速度カメラで記録し、骨盤、大転子、足関節、足部にとりつけたマーカーの動きを計算した。膝関節については皮膚の動きによるノイズを避けるため、大腿骨と脛骨の長さから計算して位置を割り出した。それぞれのマーカーの高さ、各関節の角度がどのように推移するかを調べた。測定後には鎮痛剤セレコキシブを内服させ、2 時間置いてから再び同じ条件で測定した。その後安楽死させ、関節の組織学的な変化を確認した。

## 4. 研究成果

変形性関節症マウスでは Sham 手術マウスと比べて、接地時の膝の踏み込む角度と、けりだし角度が有意に低下することが分かった。これらの変化が痛みによるものであるかを検証するため、マウスに鎮痛剤セレコキシブを内服させてから再び計測したところ、これらの角度の変化は解消された。これらの検証より、変形性関節症による痛みが、踏み込みとけりだしにおける膝関節の屈曲を低下させることが分かった。また組織学的にも変形性関節症は十分に進行していることを確認した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Makii Y, Asaka M, Setogawa S, Fujiki S, Hosaka Y, Yano F, Oka H, Tanaka S, Fukui N, Yanagihara D, and Saito T. Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically-induced knee osteoarthritis. *J Orthop Surg* (Hong Kong) in press.
2. Taniguchi Y, Kawata M, Chang SH, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S, Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, Yano F, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, and Saito T. Regulation of Chondrocyte Survival in Mouse Articular Cartilage by p63. *Arthritis Rheumatol*. 69:598-609, 2017. doi: 10.1002/art.39976.
3. Kobahashi H, Chang SH, Mori D, Itoh S, Hirata M, Hosaka Y, Taniguchi Y, Okada K, Mori Y, Yano F, Chung UI, Akiyama H, Kawaguchi K, Tanaka S, and Saito T. Biphasic regulation of chondrocytes by Rela through induction of anti-apoptotic and catabolic target genes. *Nat Commun*. 7:13336, 2016. doi: 10.1038/ncomms13336.
4. Aini H, Itaka K, Fujisawa A, Uchida H, Uchida S, Fukushima S, Kataoka K, Saito T, Chung UI, Ohba S. Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep*. 6:18743, 2016. doi: 10.1038/srep18743.
5. Chang SH, Yasui T, Taketomi S, Matsumoto T, Kim-Kaneyama J, Omiya T, Hosaka Y, Inui H, Omata Y, Yamagami R, Mori D, Yano F, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Comparison of mouse and human ankles and establishment of mouse ankle osteoarthritis models by surgically-induced instability. *Osteoarthritis Cartilage*. 24:688-97, 2016. doi: 10.1016/j.joca.2015.11.008.
6. Saito T, Yano F, Mori D, Kawata M, Hoshi K, Takato T, Masaki H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Chung UI, Tanaka S. Hyaline Cartilage Formation and Tumorigenesis of Implanted Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res*. 36:179-86, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.179.
7. Sugita S, Hosaka Y, Okada K, Mori D, Yano F, Kobahashi H, Taniguchi Y, Mori Y, Okuma T, Chang SH, Kawata M, Taketomi S, Chikuda H, Akiyama H, Kageyama R, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Ohba S, Saito T. Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:3080-5, 2015. doi:

10.1073/pnas.1419699112.

8. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Regulation of Mouse Chondrocyte Differentiation by CCAAT/Enhancer-binding Proteins. *Biomed Res*. 36:21-9, 2015. doi: 10.2220/biomedres.36.21.

全て査読あり

〔学会発表〕(計 38 件)

- 1) 齋藤琢: 変性性関節症の制御メカニズム 愛媛大学分子病態医学セミナー、愛媛大学(愛媛県松山市) 2017.2.6.
- 2) 齋藤琢: 過剰な力学的ストレス負荷による関節軟骨変性の分子メカニズム 第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016.12.2
- 3) 齋藤琢: 変性性関節症の制御メカニズム Orthopedic Research Club、かずさアカデミアパーク(千葉県木更津市) 2016.11.19
- 4) Taku Saito: Regulation of Articular Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis Development by the NF-kappaB signaling. 2016 Cold Spring Harbor Asia Conference on Bone & Cartilage, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China, 2016.10.26.
- 5) 齋藤琢: Notch・Hes1 による軟骨細胞の制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.13
- 6) 齋藤琢: 過剰な力学的ストレスによる関節軟骨異化のメカニズム 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.21
- 7) Taku Saito: Perspective of disease-modifying osteoarthritis drugs 第3回アジア太平洋骨代謝学会議、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.20
- 8) 齋藤琢: 分子生物学からみた変形性関節症の背景と病態 第35回 Kyoto Orthopaedic Seminar、京都大学(京都府京都市) 2016.4.12
- 9) 齋藤琢: 転写因子を起点とした変形性関節症のメカニズム 第29回日本軟骨代謝学会、広島大学(広島県広島市) 2016.2.19
- 10) Taku Saito: Roles of Notch signaling in skeletal development and osteoarthritis. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートピア(兵庫県神戸市) 2015.12.2
- 11) 齋藤琢: 変形性関節症の分子治療への展望 第43回日本関節病学会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2015.11.5
- 12) 齋藤琢: Roles of HIF and Notch signaling in articular cartilage 12th Meeting of the Bone Biology Forum, 幕張メッセ(千葉県千葉市), 2015.08.21

- 13) 齋藤琢: Notch/Rbpj/Hes1 経路による変形性関節症の制御機構 第33回日本骨代謝学会、京王プラザホテル(東京都新宿区) 2015.7.23
- 14) 齋藤琢: 分子生物学からみた変形性関節症の背景と病態 第47回ひむか運動器セミナー、宮崎大学(宮崎県宮崎市) 2015.7.6
- 15) 齋藤琢: 変形性関節症の分子メカニズム 第15回日本抗加齢医学会総会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015.5.30
- 16) Soma K, Saito T, et al. Roles Of R-spondin2; The Susceptibility Gene For Ossification Of Posterior Longitudinal Ligament. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. San Diego Convention Center, San Diego, CA. 2017.3.19
- 17) 河田学、齋藤琢、他: p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.14
- 18) 尾市健、齋藤琢、他: 腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第31回日本整形外科学会基礎学術総会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.14
- 19) 矢野文子、齋藤琢、他: Runx1 による軟骨分化制御機構 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.13
- 20) 相馬一仁、齋藤琢、他: 後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSPO2 の検討 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016.10.13
- 21) 牧井勇磨、齋藤琢、他: 転写因子 HIF-2 $\alpha$  は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2016.10.13
- 22) 張成虎、齋藤琢、他: 軟骨に対するメカニカルストレスの作用 第17回運動器科学研究会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.9.3
- 23) 矢野文子、齋藤琢、他: Runx1 による軟骨分化制御機構 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.22
- 24) 相馬一仁、齋藤琢、他: 後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSPO2 の検討 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.21
- 25) 尾市健、齋藤琢、他: 腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第34回日本骨代謝学会学術総会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.20-23 (ポスター)
- 26) 河田学、齋藤琢、他: p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.7.21
- 27) 牧井勇磨、齋藤琢、他: 転写因子 HIF-2 $\alpha$  は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第34回日本骨代謝学会学術集会、大阪国際会議場(大阪府大阪市) 2016.07.21
- 28) 河田学、齋藤琢、他: p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第2回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄(沖縄県恩納村) 2016.7.6
- 29) 相馬一仁、齋藤琢、他: 後縦靭帯骨化症の疾患感受性候補遺伝子 RSPO2 の検討 第2回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄(沖縄県恩納村) 2016.7.6
- 30) 牧井勇磨、齋藤琢、他: 転写因子 HIF-2 $\alpha$  は関節軟骨最表層に発現し、関節軟骨に保護的に作用する 第2回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄(沖縄県恩納村) 2016.7.8
- 31) 尾市健、齋藤琢、他: 腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立、第2回日本骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄(沖縄県恩納村) 2016.7.6 (ポスター)
- 32) 矢野文子、齋藤琢、他: Runx1 による軟骨分化制御機構 第2回骨免疫学会、ホテルモントレ沖縄(沖縄県恩納村) 2016.7.6
- 33) Kawata M, Saito T, et al. Different regulation of limb development by p63 transcript variants. Annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Disney Coronado Springs Resort, Orlando, FL 2016. 3. 8
- 34) 河田学、齋藤琢、他: p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第29回日本軟骨代謝学会、広島大学(広島県広島市) 2016.2.19
- 35) 尾市健、齋藤琢、他: 腰椎椎間関節切除によるマウス椎間板変性モデルの樹立 第29回日本軟骨代謝学会、広島大学(広島県広島市) 2016.2.19
- 36) 河田学、齋藤琢、他: p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートピア(兵庫県神戸市) 2015.12.2
- 37) 張成虎、齋藤琢、他: マウス変形性足関節症モデルの確立 第30回日本整形外科学会基礎学術集会 富山国際会議場(富山県富山市) 2015.10.22-23
- 38) 河田学、齋藤琢、他: p63 transcript variants による四肢発生の多様な制御機構 第

30 回日本整形外科学会基礎学術集会  
富山国際会議場（富山県富山市）  
2015.10.22-23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
東京大学医学部整形外科  
<http://www.u-tokyo-ortho.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 琢 (SAITO Taku)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30456107

### (2) 研究分担者

柳原 大 (YANAGIHARA Dai)  
東京大学・総合文化研究科・准教授  
研究者番号：90252725