

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09041

研究課題名(和文)変形性膝関節症の運動時痛に関連する機械刺激応答分子機構の意義の解明

研究課題名(英文)Biological significance of the mechanically activated channel associated with mechanical pain in knee osteoarthritis

研究代表者

池田 亮 (Ikeda, Ryo)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20439772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症(膝OA)は、関節運動や荷重などの機械刺激によって痛みが増強するのが特徴であり、その長期暴露は、痛覚伝達経路の可塑性を導いて患者のQOLを低下させる。この機械性痛覚過敏や異痛症の発生機序を解明できれば、疼痛緩和のための新たな治療標的を模索できる可能性がある。そこで、膝OAの発症が機械作動性チャネルPiezoへ与える影響に注目し、チャネル発現量を評価した。その結果、膝OAはPiezo mRNA合成に影響を与えず、これまで報告されてきたチャネルの機能的修飾によって機械受容を増強している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2010年に同定された機械作動性チャネルPiezoは、病態解明が急務とされている神経障害性疼痛などの難治性慢性痛成立に深く関わる事が報告されている。近年、膝関節軟骨損傷の情報伝達を担い、炎症性物質によって機能修飾されることも明らかになったため、罹患率の高い膝OAの機械性疼痛成立においても、その関与が推察されていた。本研究結果ではチャネル発現量に変化を認めなかったが、既存のPiezoチャネルの機能亢進が機械性疼痛成立にどのように関連するか問題提起できたと考える。膝OAの機械性疼痛におけるPiezoチャネルの生物学的意義を深く証明するためには、さらなる研究継続が必須と考える。

研究成果の概要(英文)：Knee osteoarthritis (OA) increase mechanical pain sensitivity under sustained weight bearing and joint movements due to its irreversible degenerative changes to the knee joint. This unpleasant arthralgia induces functional disturbance and reduces QOL of those affected. Understanding the mechanisms of the mechanical hyperalgesia and allodynia might provide a target for relief pain in patients with such symptoms. Piezo channel is mechanically activated ion channel and transduces information regarding injury to the articular cartilage. However, whether expression levels are influenced by knee OA has remained unknown. We measured Piezo mRNA in knee joints and dorsal root ganglia after establishing a model of knee osteoarthritis in rodents using monosodium iodoacetate and found that Piezo mRNA synthesis is not upregulated. Further studies will need to be performed to proof biological significance of Piezo channel for mechanical pain in knee OA.

研究分野：整形外科 疼痛

キーワード：変形性膝関節症 機械性痛覚過敏 異痛症 Piezo

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会にある本邦において、40歳以上の変形性膝関節症(膝OA)の有病率は、男性で40%以上、女性で60%以上にのぼる<sup>1)</sup>。関節軟骨の退行性変化を基軸に、生活様式などの環境因子が加わって発症することや、アスロリンやDVWAといった遺伝子の関与が報告されている<sup>2)3)</sup>。主たる症状は運動時痛や荷重時痛であり、軟骨下骨の脆弱性骨折、半月板の逸脱、膝関節を支配するDRGニューロン内疼痛関連蛋白(CGRP, TrkA, ASIC)の発現量増加によって生じることがわかってきた<sup>4)5)6)</sup>。初期の炎症性疼痛に対しては、NSAIDsを基本にヒアルロン酸の関節内注射や理学療法を組み合わせた保存的治療が行われるが、関節症の進行とともに神経障害性疼痛が加わった混合性疼痛へ発展するためその効果は減弱する。

保存的治療に抵抗する頑固な疼痛では、関節鏡視下デブリドマン、高位脛骨骨切り術、人工膝関節置換術などの外科的治療が選択される。傷んだ関節面を骨切りして機械刺激情報を軽減する人工膝関節置換術は優れた除痛効果と、15 - 20年生存率90%以上の良好な長期成績が確立されているが、その満足度は80%程度にとどまっており、より効果的な治療法の開発が望まれていた<sup>7)</sup>。

これを解決するためには、膝OAの運動時痛成立に関与し混合性疼痛を助長するこれまでの報告では説明できない疼痛成立機序を明らかにする必要がある。この成立機序において不可欠な機構の一つが、外界からの機械刺激を電気シグナルへ変換して円滑な関節運動を担うメカノトランスダクションである。申請者はこのメカノトランスダクションチャネルの一つであるPiezo2が、これまで未解明であった触覚検出を担う主要蛋白である事実を、生体内触覚受容器のMerkel触盤に注目した研究において世界で初めて見出した<sup>8)</sup>。2010年にCosteらによって同定されたPiezo蛋白はPiezo1とPiezo2の2種類のファミリーからなり<sup>9)</sup>、膝関節軟骨や軟骨下骨にも発現することが明らかにされている<sup>10)11)</sup>。また、触覚と疼痛に関連する機械受容に注目した研究が加速的に進んでおり、Piezo2が神経障害性疼痛で生じるアロディニアの発症や固有受容に関与することも報告されている<sup>12)13)</sup>。この特異分子と膝OAで生じる運動時痛の関連機序が明らかになれば、より低侵襲な新規痛み緩和療法の開発に臨むことが可能になる。これにより高齢者のADL維持が期待できれば、罹患率の高さからも医療費削減に大きく寄与することが推測される。

- 1) 吉村典子. *Clinical Calcium* 2011;21:25-9
- 2) Blagojevic M, et al. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:24-33
- 4) Miyamoto Y, et al. *Nat Genet*. 2008;40:994-8
- 5) Hawin SF, et al. *Arthroscopy* 1999;15:142-6.
- 6) Ikeuchi M, et al. *Eur J Pain* 2015;19:334-40
- 7) 村尾浩樹, 他. *中部整災誌* 2013;56:1359-60
- 8) Ikeda R, et al. *Cell* 2014;157:664-75
- 9) Coste B, et al. *Science*. 2010;330:55-60
- 10) Lee W, et al. *PNAS* 2014;111:E5114-22
- 11) Zhu S, et al. *J Clin Invest* 2019; 129: 1076-1093.
- 12) Eijkelkamp N, et al., *Nat Commun*. 2013;4:1682.
- 13) Woo SH, et al., *Nat Neurosci*. 2015;18:1756-62

## 2. 研究の目的

膝OAは関節運動や荷重などの機械刺激によって痛みが亢進する複雑な侵害性疼痛が特徴である。痛み刺激の長期暴露は、末梢から中枢にいたる痛覚伝達経路に可塑性を導くだけでなく、疼痛回避のための安易な不動化によって、筋力低下や関節拘縮が導かれ、不安や不快といった負の情動体験が固定化して難治性の慢性痛へ発展する<sup>1)</sup>。膝OA発症時の膝関節構成組織や後根神経節(DRG)における機械受容関連分子の発現変化と、より高位中枢である脳機構の関与を評価することは、痛み慢性化を適切に把握して治療を行うために重要と考える。

そこで、メカノトランスダクションの研究でこれまでに培った遺伝子学的手法と<sup>2)</sup>、神経障害性疼痛成立時に脳内疼痛関連情動神経機構の可塑性が生じることを明らかにした脳神経核への生理学的アプローチによって<sup>3)4)</sup>、膝OA発症時の機械作動性チャネルPiezoの意義を明らかにし、既存とは異なる新たな治療標的を探索することが本研究の目的である。

- 1) Cottam WJ, et al. *Neuroimage Clin*. 2016;269-76
- 2) Ikeda R, et al. *Cell* 2014;157:664-75
- 3) Ikeda R, et al. *Pain* 2007;127:161-72
- 4) Arimura D, et al. *Front Neural Circuits* 2019;13:58.

### 3. 研究の方法

#### 実験 1: 膝 OA モデルの作製と行動評価

1. 成熟 SD ラット (生後 6 週齢前後、雄) あるいは C57BL/6 マウス (生後 8 週前後、雄) を利用した。前内側冠状靭帯切除で生じる半月板不安定性の外傷性膝 OA モデル (destabilization of the medial meniscus: DMM)<sup>1)</sup> および monosodium iodoacetate (MIA) 3 mg/50  $\mu$ l 濃度の関節内注入で生じる炎症性膝 OA モデル<sup>2)</sup> の 2 種類を作製した。各々、関節包のみを切開する群、MIA と同量の生理食塩水を投与する群をコントロール群として設定した。どの動物モデルも、左膝関節を処置側、右膝関節を非処置側とした。
2. 作製した動物モデルの経時的な関節炎成立評価は、ノギスを用いた膝関節の前後および内外側径の計測で行った。疼痛応答評価は、von Frey フィラメントを用いた足底機械刺激による間接的疼痛閾値で行った<sup>3)</sup>。さらに、ヒトの日常生活に類似した荷重時痛の歩行解析を、行動パラメーターの自動計測可能なトレッドミル機器や CatWalk<sup>4)</sup>で行った。

#### 実験 2: 脳機能画像計測

MIA モデルマウスの最終行動評価後に、麻酔下に特殊器具で頭位を固定し、9.4 テスラの小動物用高磁場 MRI 装置を用いて脳画像を撮像した。獲得したデータを画像解析ソフトに取り込み、OA に関連する上位神経核を探索した。

#### 実験 3: 膝 OA モデル関節内組織と膝関節支配 DRG の Piezo mRNA の発現量評価

1. 膝 OA モデル作製後 1-2 ヶ月の最終行動評価後に麻酔下に断頭し、膝関節内組織 (前十字靭帯、軟骨下骨、軟骨) と膝関節を支配する L3-5 DRG を摘出した。
2. 摘出した組織内の機械作動性チャネル Piezo1 と Piezo2 の mRNA を quantitative RT-PCR で計測した。内在性コントロールとしてハウスキーピング遺伝子の GAPDH を使用し、各群間で比較検討を行った。

- 1) Glasson SS et al. Osteoarthritis Cartilage. 2007;15:1061-9
- 2) Bove SE, et al. Osteoarthritis Cartilage. 2003;11:821-30
- 3) Rahman W, Dickenson AH. Neuroscience 2015;295:103-16.
- 4) Ferland CE, et al. Pharmacol Biochem Behav. 2011;97:603-10

### 4. 研究成果

外傷性と炎症性いずれの動物モデルでも関節炎は経時的に成立し、足底の機械刺激に対する疼痛閾値は対象と比較して有意に低下していた。SD ラットモデル群に行った CatWalk による歩行解析では、MIA 群で患側接地面積の有意な減少と跛行の出現を認めた。しかしながら、DMM 群に行った膝関節に対する直接機械刺激では対象群との間で疼痛回避様行動に明らかな差を認めなかった。これらの結果から、膝 OA モデルの種類によって、関節炎は確かに発現するものの疼痛発現の強度や期間に差があることが明らかになった。そこで、モデル動物作製後早期に関節炎が成立し、OA に伴う疼痛が 1 ヶ月間安定した MIA 群を主モデルとして継続使用した。

9.4 テスラ小動物用高磁場 MRI 装置で脳画像を撮像するにあたり、より安定したデータ獲得のために SD ラットから C57BL/6 マウスに変更し、同様の行動実験を行った。動物種に関わらず、MIA 注入後 3 日目には関節炎が成立し、足底機械刺激に対する疼痛閾値とトレッドミルによる下り坂での運動能力が、コントロール群と比較して有意に低下した。この MIA モデルマウスは最終評価時に、麻酔下に頭位を固定し OA で生じる自発性の脳活動を MRI で記録した。得られた脳画像データは画像解析ソフトに取り込み、膝 OA に関連する上位神経核を引き続き探索中である。

SD ラットの MIA モデルは最終行動評価後、C57BL/6 マウスの MIA モデルは MRI 撮像後、前十字靭帯、軟骨下骨、軟骨の膝関節構成組織と支配神経の DRG (L3,4,5) を摘出し、機械作動性チャネル Piezo1 と Piezo2 の mRNA を RT-PCR で計測した。その結果、OA はその発現量に影響を与えなかったため、チャネルの機能的修飾によって機械受容を増強することが示唆された。

行動実験と Piezo チャネル発現量に関して得られた本研究結果から、膝 OA の痛みに関連する機械受容のメカニズムを生物学的意義とともに考察し、関連する整形外科学、疼痛学の分野で発表、論文執筆を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 池田亮	4. 巻 70
2. 論文標題 Vocabulary Piezo2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 池田亮	4. 巻 37
2. 論文標題 【感覚受容 最前線】皮膚感覚 Piezo2を介したMerkel触盤の触覚検出	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1498-1501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 池田亮 丸毛啓史	4. 巻 11
2. 論文標題 【関節痛の基礎と臨床】変形性膝関節症の関節痛とメカノレセプター	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Musculoskeletal Pain Research	6. 最初と最後の頁 4-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 鈴木 秀典, 坂井 孝司, 柴田 政彦, 牛田 享宏, 福井 聖, 池田 亮, 田口 敏彦	4. 巻 11
2. 論文標題 慢性疼痛の診療に関わる医療者育成の展望 慢性の痛みに関する教育プログラムの構築 課題解決型高度医療人材養成プログラム 慢性の痛みに関する領域	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Musculoskeletal Pain Research	6. 最初と最後の頁 264-268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chang W, Kanda H, Ikeda R, Ling J, Gu JG.	4. 巻 141
2. 論文標題 Serotonergic transmission at Merkel discs: modulation by exogenously applied chemical messengers and involvement of Ih currents.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 565-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Teruyuki Miyasaka, Mitsuru Saito, Daisaburo Kurosaka, Ryo Ikeda, Shoki Yamanaka, Keishi Marumo	4. 巻 21
2. 論文標題 Impact of posterior femoral condylar cartilage and posterior intercondylar distance on rotation of femoral component in total knee arthroplasty.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-020-03537-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eiji Kijima, Tomohiro Kayama, Mitsuru Saito, Daisaburo Kurosaka, Ryo Ikeda, Hiroteru Hayashi, Daisuke Kubota, Takashi Hyakutake and Keishi Marumo	4. 巻 21
2. 論文標題 Pre-operative hemoglobin level and use of sedative-hypnotics are independent risk factors for post-operative delirium following total knee arthroplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	6. 最初と最後の頁 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12891-020-03206-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Ikeda, Daigo Arimura, Mitsuru Saito 17	4. 巻 17
2. 論文標題 Expression of Piezo mRNA is unaffected in a rat model of knee osteoarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/17448069211014059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田亮
2. 発表標題 運動器疼痛の生物学的理解 - 慢性化の予防と治療効果向上のために -
3. 学会等名 第68回東日本整形災害外科学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田亮
2. 発表標題 Red flagsの評価
3. 学会等名 慢性疼痛診療研修
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田亮
2. 発表標題 メルケル触盤の触覚検出
3. 学会等名 第28回国際痒みシンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田亮, 奥津裕也, 篠原恵, 有村大吾, Zhanfeng Jia, Jianguo Gu, 丸毛啓史
2. 発表標題 後根神経節ニューロンの形質膜圧によるPiezo2チャネル機能制御
3. 学会等名 第33回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田亮
2. 発表標題 Red flagsの評価
3. 学会等名 慢性疼痛診療研修会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田亮
2. 発表標題 Merkel 触盤の触覚受容メカニズム
3. 学会等名 第1回感覚器研究 イニシアチブ・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池田亮
2. 発表標題 体性感覚の分子機構
3. 学会等名 第37回オピオイドペプチド研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池田亮, 奥津裕也, 篠原恵, 有村大吾, Zhanfeng Jia, Jianguo Gu, 丸毛啓史
2. 発表標題 浸透圧膨張による後根神経節ニューロンのPiezo2チャネル機能亢進
3. 学会等名 第32回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池田 亮
2. 発表標題 運動器疼痛の成り立ちを考える -治療効果向上のために-
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 百武剛志 黒坂大三郎 池田亮 斎藤充 林大輝 窪田大輔 荒川翔太郎 嘉山智大 丸毛啓史
2. 発表標題 光切断方式による3Dスキャナを用いた新たな手術ナビゲーションの開発
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池田亮 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 国立研究開発法人科学技術振興機構 研究開発戦略センター	5. 総ページ数 632
3. 書名 研究開発の俯瞰報告書 ライフサイエンス・臨床医学分野	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	加藤 総夫  (Kato Fusao)  (20169519)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授   (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------