

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19715

研究課題名(和文)筋由来の関節痛制御分子の探索

研究課題名(英文) Screening for anti-arthralgic molecules derived from muscle

研究代表者

齋藤 琢 (Saito, Taku)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30456107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス膝周囲筋に定量的な負荷をかけるためのトレッドミルによる強制走行を行い、条件検討を行った。実験には骨格や筋の成長が落ち着く生後12週齢のC57BL/6Jマウス雄を用いた。数日の練習によってマウスをトレッドミル走行に馴化させたのち、実験を開始した。実験条件として、走行速度は5, 15, 25 m/分、走行時間は15, 60分/日、期間は2週間で検討を行った。経時的にマウスをサクリファイスし、25 m/分、60分/日で最も筋量の有意な増加がみられることを確認した。0, 2週での大腿四頭筋の筋組織における発現解析を行い、炎症に深く関係するシグナルに関連するサイトカインを複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は、関節軟骨の変性に始まり、周辺の骨の硬化性変化、滑膜の炎症性変化を伴って進行し、関節痛を引き起こして運動機能を著しく低下させる疾患である。変形性関節症の患者は膝だけで国内に2,530万人も存在し、高齢化に伴ってその数は増え続けている。要支援、要介護の原因として社会的にも大きな損失をもたらしているが、保存治療にはいまだ有効な手段はない。変形性関節症患者に対して大腿四頭筋訓練を開始すると、筋力や筋量に変化が出る前に痛みが緩和されることは知られていたが、本研究ではその本態を見出した可能性があり、今後の創薬に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We performed forced running by treadmill to load mechanical stress on muscles around mouse knee joints, and optimized conditions. We used 12-week-old C57BL/6 male mice. We started the experiment after acclimatization for several days. We tested 5, 15, 25 m/min, for 15, 60 min/day, during 2 weeks, and adapted 25 m/min for 60 min/day because muscle volume was increased at maximum. We expression analyses using muscle samples from 0 and 2 weeks, and identified several molecules which were associated with inflammation.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 関節痛 筋肉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、関節軟骨の変性に始まり、周辺の骨の硬化性変化、滑膜の炎症性変化を伴って進行し、関節痛を引き起こして運動機能を著しく低下させる疾患である。東京大学が行っている疫学調査 ROAD スタディによって、変形性関節症の患者は膝だけで国内に 2,530 万人もいることが分かっており (*J Bone Miner Metab* 27:620-8, 2009)、高齢化に伴ってその数は増え続けている。要支援、要介護の原因として社会的にも大きな損失をもたらしているが、その治療法には目立った進歩はなく、末期患者には人工関節置換術などの手術療法が選択されるものの、保存治療にはいまだ有効な手段はない。

申請者らはこのような現状を打破すべく、長年にわたって軟骨の基礎研究を行ってきた。2005 年にマウス変形性関節症モデルを開発して以降、変形性関節症の制御に関わる数多くのシグナル分子を解明するとともに、それらに干渉することで変形性関節症の進行を抑制できることを報告してきた。申請者のグループ以外からも類似の結果がいくつか報告されており、変形性関節症の新規治療法や予防法に繋がることを期待されている。一方で、関節軟骨の微細な変化を捉えられる鋭敏な評価法が存在しないことから、変形性関節症に対して治験を行うことは難しく、次々と新薬が登場する骨粗鬆症治療薬とは対照的に、その治療法は旧態依然のままである。対症療法として NSAIDs やヒアルロン酸関節注射などが行われるが、疼痛制御も不十分なことが多い。このような状況を受け、申請者らのグループでは変形性関節症への新しいアプローチを模索してきた。その一つとして、平成 27-28 年度の挑戦的萌芽研究 (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、研究代表者: 齋藤琢) の中で、最新のモーションキャプチャーシステムを用いて変形性関節症モデルマウスの歩行を 3 次元解析することに取り組み、関節痛の定量的な評価法の開発に成功した。

2. 研究の目的

申請者らは、この高速度 3 次元解析による関節痛評価法を用いた次なる研究として、筋組織と関節痛との関連に注目した。軟骨組織の変性の程度と関節痛が必ずしも一致しないことは古くから知られてきたが、最近の研究から、膝関節を取り巻く筋力と筋量に比例して関節痛が生じにくいことが分かってきた。そのメカニズムとして、膝関節の安定性が膝周囲筋に依存しているからではないかと推測されているが、それが実際に痛みとどの程度関連するかは科学的には証明されていない。また変形性関節症患者に対して大腿四頭筋訓練を開始すると、筋力や筋量に変化が出る前に痛みが緩和されるという報告もあり、多くの整形外科医の臨床現場での実感にも一致している。このことから、膝周囲筋から何らかの液性因子が放出され、関節に作用する可能性が考えられる。そこで申請者らは、マウスに様々な程度の運動負荷をかけた後、膝周辺の筋組織を回収してスクリーニング解析を行い、関節痛の制御に寄与しうる分泌タンパクの同定を計画した。

3. 研究の方法

以下のステップに分けて研究を遂行した。

(1) トレッドミルを用いたマウスの運動負荷の条件検討

マウス膝周囲筋に定量的な負荷をかけるため、トレッドミルによる強制走行を行う。実験には骨格や筋の成長が落ち着く生後 12 週齢の C57BL/6J マウス雄を用いる。トレッドミルは 8 レーン同時にマウスを走行させられ、末端で電気刺激を加えるタイプのものを選ぶ。数日の練習によってマウスをトレッドミル走行に馴化させたのち、実験を開始する。実験条件として、走行速度は 5-25 m/分、走行時間は 15-60 分/日、期間は 3 日-3 週間を目安とし、条件を振って検討を行う。経時的にマウスをサクリフェイスし、腓腹筋を摘出して湿重量を測定するとともに、組織切片を作成して筋線維の状態を観察する。

(2) 筋由来タンパクのスクリーニング

次に筋由来タンパクのスクリーニングを行う。運動負荷をかけて筋量が増加し始める時期、筋量が増加し続ける時期、筋量変化が落ち着く時期の 3 つのタイムポイントで解析を行うほか、運動負荷をかけない群をコントロールとする。これら 4 群、各 2 匹ずつ検体を採取し、合計 8 サンプルを RNA シーケンスにかける。運動負荷による発現量の変動が大きいものからソートするとともに、筋での発現量が豊富なもの、過去の解析から分泌タンパクであることが知られているものもピックアップする。

(3) マウス変形性膝関節症モデルを用いた、候補分子の関節痛制御効果の検証

得られた候補分子について、マウス変形性膝関節症モデルを用いて関節痛に対する作用を検証する。生後 12 週齢の C57BL/6J マウス雄に対して、麻酔下に変形性膝関節症モデルの手術 (内側側副靭帯と内側半月板の切除) を行う。モーションキャプチャーシステムによる関節痛の評価系では、術後 8-10 週あたりで関節角、高位などに有意な変化がとらえられることから、その前段階として術後 7 週から候補分子のリコンビナントタンパクの膝関節内注射を週に 3 回のペースで開始する。関節痛の評価は術後 8 週から開始し、週に 1 回、注射の 1 時間後に行うこととする。

4 . 研究成果

まずマウス膝周囲筋に定量的な負荷をかけるためのトレッドミルによる強制走行を行い、条件検討を行った。実験には骨格や筋の成長が落ち着く生後12週齢のC57BL/6Jマウス雄を用いた。数日の練習によってマウスをトレッドミル走行に馴化させたのち、実験を開始した。実験条件として、走行速度は5, 15, 25 m/分、走行時間は15, 60分/日、期間は2週間で検討を行った。経時的にマウスをサクリファイスし、25 m/分、60分/日で最も筋量の有意な増加がみられることを確認した。運動負荷をかけて筋量が増加し始める時期、筋量が増加し続ける時期、筋量変化が落ち着く時期の3つのタイムポイントに分けて解析を行う予定であったが、変曲点のはっきりしなかったため、サクリファイス直前の2週間の時点で大腿四頭筋の筋組織における発現解析を行うこととした。上記条件での負荷ののちマウスをサクリファイスして筋を回収、負荷をかけないマウスの筋との間でRNAシーケンスを行い、比較を行った。いくつかの変動遺伝子、タンパクを検討した中で、炎症に深く関係するシグナルに関連するサイトカインを複数同定した。これらはいくつかの種類の細胞において抗炎症作用が報告されていることから、関節においても有望な分子と考え、IL-1 β で刺激した培養軟骨細胞にリコンビナントタンパクとして添加したところ、有意に異化作用を抑制した。今後はこれらのリコンビナントタンパクをマウス膝関節内に投与し、痛み関連動作に与える影響を検証する予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12件)

1. Chang SH, Mori D, Kobayashi H, Mori Y, Nakamoto H, Okada K, Taniguchi Y, Sugita S, Yano F, Chung UI, Kanayama JK, Yanagita M, Economides A, Canalis E, Chen D, Tanaka S, and **Saito T***. Excessive mechanical loading promotes osteoarthritis through the gremlin-1–NF- κ B pathway. *Nat Commun* 10:1442,2019. doi: 10.1038/s41467-019-09491-5.
2. Izawa N, Kurotaki D, Nomura S, Fujita T, Omata Y, Yasui T, Hirose J, Matsumoto T, **Saito T**, Kadono Y, Okada H, Miyamoto T, Tamura T, Aburatani H, Tanaka S*. Cooperation of PU.1 with IRF8 and NFATc1 defines chromatin landscapes during RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* e3689, 2019. doi: 10.1002/jbmr.3689.
3. Chijimatsu R, Yano F, **Saito T**, Kobayashi M, Hamamoto S, Kaito T, Kushioka J, Hart DA, Chung UI, Tanaka S, Yoshikawa H, Nakamura N*. Effect of the small compound TD-198946 on glycosaminoglycan synthesis and chondrogenesis of human synovial derived stem cell in vitro. *J Tissue Eng Regen Med* 2019. doi: 10.1002/term.2795.
4. Murahashi Y, Yano F, Nakamoto H, Maenohara Y, Iba K, Yamashita T, Tanaka S, Ishihara K, Okamura Y*, Moro T*, and **Saito T***. Multi-layered PLLA-nanosheets loaded with FGF-2 induce robust bone regeneration with controlled release in critical-sized mouse femoral defects. *Acta Biomaterialia* 85:172-179, 2019. doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.031.
5. Murahashi Y, Yano F, Kobayashi H, Makii Y, Iba K, Yamashita T, Tanaka S, and **Saito T***. Intra-articular administration of I κ B α kinase inhibitor suppresses mouse knee osteoarthritis via downregulation of the NF- κ B/HIF-2 α axis. *Sci Rep* 8:16475, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-34830-9.
6. Saitou K, Tokunaga M, Yoshino D, Sakitani N, Maekawa T, Ryu Y, Nagao M, Nakamoto H, Saito T, Kawanishi N, Suzuki K, Ogata T, Makuuchi M, Takashima A, Sawada K, Kawamura S, Nakazato K, Kouzaki K, Harada I, Ichihara Y, and Sawada Y. Local Cyclical Compression Modulates Macrophage Function In Situ and Alleviates Immobilization-Induced Muscle Atrophy. *Clinical Science* (in press).
7. 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) May-Aug;26:2309499018768017, 2018. doi: 10.1177/2309499018768017.
8. Goto H, Nishio M, To Y, Oishi T, Miyachi Y, Maehama T, Nishina H, Akiyama H, Mak TW, Makii Y, **Saito T**, Yasoda A, Tsumaki N, and Suzuki A. Loss of Mob1a/b in mice results in chondrodysplasia due to YAP1/TAZ-TEADs-dependent repression of SOX9. *Development*. 145(6), 2018. (in press) doi: 10.1242/dev.159244.
9. Oichi T, Taniguchi Y, Soma K, Chang SH, Yano F, Tanaka S, and **Saito T***. A Mouse Intervertebral Disc Degeneration Model by Surgically-Induced Instability. *Spine (Phila Pa 1976)*. 43:E557-564, 2018. doi: 10.1097/BRS.0000000000002427.
10. Huang KC, Yano F, Murahashi Y, Takano S, Kitaura Y, Chang SH, Soma K, Ueng S, Tanaka

S, Ishihara K, Okamura Y*, Moro T*, and **Saito T***. Sandwich-type PLLA-nanosheets loaded with BMP-2 induce bone regeneration in critical-sized mouse calvarial defects. *Acta Biomaterialia* 59:12-20, 2017. doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.041.

11. **Saito T***, Tanaka S. Molecular mechanisms underlying osteoarthritis development: Notch and NF-kappaB. *Arthritis Res Ther.* 19;94, 2017. doi: 10.1186/s13075-017-1296-y.
12. Kawata M, Taniguchi Y, Mori D, Yano F, Ohba S, Chung UI, Shimogori T, Mills SS, Tanaka S, and **Saito T***. Different Regulation of Limb Development by p63 Transcript Variants. *PLOS One* 12:e0174122, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0174122.

〔学会発表〕(計 20件)

1. 齋藤琢：変形性関節症の分子病態と治療法の研究 第26回埼玉骨・関節疾患研究会、さいたま(大宮コミュニケーションオフィス) 2019.2.21.
2. 齋藤琢：変形性関節症の分子病態と治療法の研究 第33回日本整形外科学会基礎学術集会、奈良(春日野国際フォーラム) 2018.10.12.
3. 永田向生、齋藤琢、他：Runx3は関節軟骨に保護的に作用する 第33回日本整形外科学会基礎学術集会、奈良、2018.10.11
4. 永田向生、齋藤琢、他：Runx3は関節軟骨に保護的に作用する 第19回運動器科学研究会、岐阜、2018.9.8
5. 永田向生、齋藤琢、他：Runx3は関節軟骨に保護的に作用する 第15回 Bone Biology Forum、千葉、2018.8.17
6. 永田向生、齋藤琢、他：Runx3は関節軟骨に保護的に作用する 第36回日本骨代謝学会、長崎、2018.7.26
7. 村橋靖崇、齋藤琢、他：I B キナーゼ阻害剤の関節内投与はNF- Bの制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する 第18回東京骨関節フォーラム、東京、2018.7.21
8. 永田向生、齋藤琢、他：Runx3は関節軟骨に保護的に作用する 第4回日本骨免疫学会、名護、2018.6.24
9. 村橋靖崇、齋藤琢、他：I kappa B alpha キナーゼ阻害剤の関節内投与はNF-kappa Bの制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する 第91回日本整形外科学会学術総会、神戸、2018.5.26
10. 牧井勇磨、齋藤琢、他：転写因子 HIF-2 α 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回日本軟骨代謝学会、名古屋、2018.3.2
11. 玄峰俊、齋藤琢、他：-catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第31回日本軟骨代謝学会、名古屋、2018.3.2
12. 村橋靖崇、齋藤琢、他：I kappa B alpha キナーゼ阻害剤の関節内投与はNF-kappa Bの制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する 第31回日本軟骨代謝学会、名古屋、2018.3.2
13. 前之原悠司、齋藤琢、他：ルブリシンによる関節軟骨再表層細胞の分化抑制の解析 第2回 Skeletal Science Retreat、倉敷、2017.11.26
14. 牧井勇磨、齋藤琢、他：転写因子 HIF-2 α 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32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.27
15. 玄峰俊、齋藤琢、他：-catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.27
16. 村橋靖崇、齋藤琢、他：I kappa B alpha キナーゼ阻害剤の関節内投与はNF-kappa Bの制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する 第32回日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017.10.26
17. 村橋靖崇、齋藤琢、他：I kappa B alpha キナーゼ阻害剤の関節内投与はNF-kappa Bの制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する 第35回日本骨代謝学会、大阪、2017.7.29
18. 玄峰俊、齋藤琢、他：-catenin シグナルは関節軟骨最表層の維持に必須である 第35回日本骨代謝学会、大阪、2017.7.28
19. 牧井勇磨、齋藤琢、他：転写因子 HIF-2 α 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35回日本骨代謝学会、大阪、2017.7.28
20. 村橋靖崇、齋藤琢、他：I kappa B alpha キナーゼ阻害剤の関節内投与はNF-kappa Bの制御を介して変形性関節症モデルマウスの病態進行を抑制する 第3回日本骨免疫学会、石垣、2017.6.29

〔図書〕(計 1件)

1. 齋藤琢：先端治療技術の実用化と開発戦略（核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品） 情報技術協会編 第8章1節 変形性関節症を引き起こす遺伝子の解明と治療の展望 p453-458, 2017年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤井 朋子

ローマ字氏名： Fujii Tomoko

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任助教

研究者番号(8桁)：40793089

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。