

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09117

研究課題名(和文)変形性膝関節症における機械受容チャネルを介した疼痛メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of pain mechanisms mediated by mechanosensitive channel in knee osteoarthritis

研究代表者

西尾 尚子(Nishio, Naoko)

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：40648359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：変形性膝関節症は、歩行や階段昇降による荷重時痛といった疼痛が主訴となることが多いが、変形性膝関節症における疼痛発生メカニズムに関して分子レベルにおける詳細は未だ解明されていない。本研究はTransient receptor potential (TRP) チャネルとPiezoチャネルに着目し、機械刺激に対する疼痛発生メカニズムの解明を目的とした。ラットを用いた行動学的実験結果より、TRPV1・TRPV4チャネルの活性化や抑制化は変形性膝関節症の機械刺激による疼痛発生/抑制機序になんらかの作用をもたらしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から変形性膝関節症の機械刺激による疼痛発生抑制メカニズムにTRPV1 チャネルと TRPV4 チャネルの活性化と阻害が関与していることが示唆された。本研究から得られたデータは変形性膝関節症だけでなく関節疾患全体の機械刺激による疼痛発生抑制メカニズムの解明の一助になりえる。また本データは変形性膝関節症病態生理学に基づく治療戦略を開発する際に分子レベルでの作用点としての可能性を示せ、臨床応用への一助となったと考える。

研究成果の概要(英文)： Osteoarthritis (OA) of knee is a common disease in the elderly, and many patients have knee pain when walking or climbing stairs as chief complaints. However, the molecular mechanism of chronic pain in this disease has been unclear. The purpose of this study is to elucidate the pain mechanism by mechanical stimulation, focusing on transient receptor potential (TRP) channel and piezo channel. Behavioral experiments in knee OA model rats suggested that the activation or inhibition of TRPV1 channel and TRPV4 channel may have some effect on the pain mechanism of knee OA caused by mechanical stimulation.

研究分野：疼痛

キーワード：変形性膝関節症 疼痛 機械受容チャネル

## 1. 研究開始当初の背景

日本は2007年に超高齢化社会に突入し、WHO(世界保健機関)が発表した2016年版 World Health Statistics(世界保健統計)において男女平均寿命が83.7歳となっており最も長寿の国であった。長年トップレベルの長寿国としてその地位を確立してきた我が国であるが、近年、平均寿命と健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間と定義される健康寿命との隔たりが問題視されている。厚生労働省の平成28年国民生活基礎調査では介護が必要となった主な原因が要介護度別にまとめられており、要支援者では「関節疾患」が17.2%で最も多く、次いで「高齢による衰弱」が16.2%となっている。要介護者では「認知症」が24.8%で最も多く、次いで「脳血管疾患(脳卒中)」が18.4%となっている。そこで我々は高齢者に多い関節疾患の一つである変形性膝関節症に着目した。変形性膝関節症は、膝関節の変形や可動域制限などの症状を呈するものの、歩行や階段昇降時の荷重時痛といった疼痛が主訴となることが多い。しかしながら疼痛の程度とレントゲン分類上の変形性膝関節症の進行度は必ずしも相関していない。つまり、変形性膝関節症における疼痛は軟骨の変形摩耗の程度によって規定されるものではないと考えられるが、変形性膝関節症の痛みの発症メカニズムに関して、分子レベルにおける詳細は未だに解明されていない。そこで変形性膝関節症における荷重時の機械刺激による疼痛発症メカニズムの解明が必要不可欠であると考え本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は変形性膝関節症における機械刺激による疼痛発症メカニズムを機械受容チャネルに注目して解明することを目的としている。今回我々が注目したチャネルは Transient receptor potential (TRP)チャネルである。TRPチャネルとはショウジョウバエの視覚の光受容器異常変異体の原因遺伝子として同定された非選択的カチオンチャネルである。温度受容体としての機能が知られるほか、様々な化学的・物理的的刺激を感受するセンサーとして多様な生体機能に関与している。哺乳類では TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP, TRPA の6つのサブファミリーに分けられる。我々は以前、非荷重の環境下であるラット in vivo 標本を用いて電気生理学的実験により正常ラットと Knee OA モデルラットの脊髄後角ニューロンから自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic currents: sEPSC)の記録を行った。正常ラットと Knee OA モデルラットにおける sEPSC を比較したところ、sEPSC の発生頻度が OA モデルラット群において有意に増加していた。次に正常ラット群、knee OA モデルラット群のそれぞれの右膝関節に TRPV1 チャネル作動薬を注入し記録を行った。結果、正常ラット群では TRPV1 チャネル作動薬の影響をほとんど受けなかったが、モデルラット群で sEPSC の増強効果が強く示され長時間これが持続した (Taniguchi, Pain Reserch 2014)。以上の結果から OA モデルラットの脊髄後角内において興奮性神経伝達物質の放出が増加しており安静痛が生じている可能性、興奮性神経伝達物質の放出が増加している状況下での TRPV1 活性化はより痛み情報を増幅しうることを示され TRPV1 がメカノセンサーの一部を担っている可能性があると考えた。そこで本研究は TRPチャネルの中の TRPV1チャネルと2000年に swell-activated channel として発表された TRPV4チャネルに着目し検討を行った。TRPV4チャネルは機械刺激による痛覚過敏への関与や TRPV4チャネルノックアウトマウスに関節変性が起こる (Clark AL, Arthritis Rheum 2010)といった報告がある。

## 3. 研究の方法

本研究は和歌山県立医科大学動物実験委員会にて承認された。

### ・変形性膝関節症(Knee osteoarthritis : Knee OA)モデルラット

Knee OA モデルには monosodium iodoacetate(MIA) モデルを用いた。Sprague-Dawley系雄性ラットを吸入麻酔下(イソフルラン)に膝蓋腱を介して右膝関節に27G針で monosodium iodoacetate (3mg/50 $\mu$ l)の関節内注入を行った。自然飼育後、Knee OAに至った時点で CatWalk での行動学的実験に使用した。

### ・行動学的評価

荷重時痛を評価するため自然歩行下での自動歩行解析システムである CatWalk XT (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands)を用いた。計測ポイントごと1匹あたり3 trial(歩行)を記録し、歩行当たりの健側比(%) (右後肢/左後肢 $\times$ 100)の平均を算出した。

#### (1)TRPV1 関連試薬関節内注による歩行に与える影響の比較

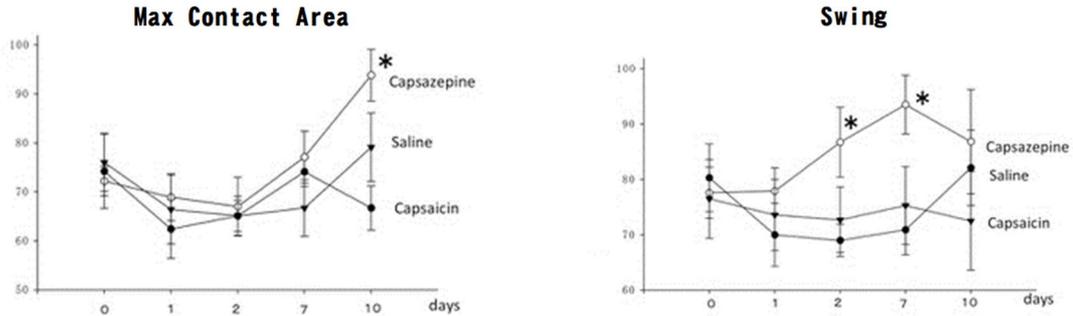
Knee OA モデルラットの右膝関節内に TRPV1チャネル作動薬、TRPV1チャネル阻害薬、コントロールとしての生理食塩水を注入する3グループをつくり、注入後1/2/7/10日で各関節内試薬注入群間での比較を行った。3群比較には one-way ANOVA test 後、Tukey-Kramer 法を使用した。危険率5%( $p<0.05$ )をもって有意と判定した。

(2)TRPV4 関連試薬関節内注による歩行に与える影響の比較

正常ラットの右膝関節内に生理食塩水投与群と TRPV 4 チャネル作動薬投与群、Knee OA モデルラットの右膝関節内に生理食塩水投与群と TRPV 4 チャネル阻害薬投与群をつくりそれぞれ 2 群間比較をした。注入前、注入後 0.5/3/ 6 /12 時間、1/2/3/4/5 日においてデータを取得した。解析には t-test を用いて危険率 5 % (p<0.05) をもって有意と判定した。

4 . 研究成果

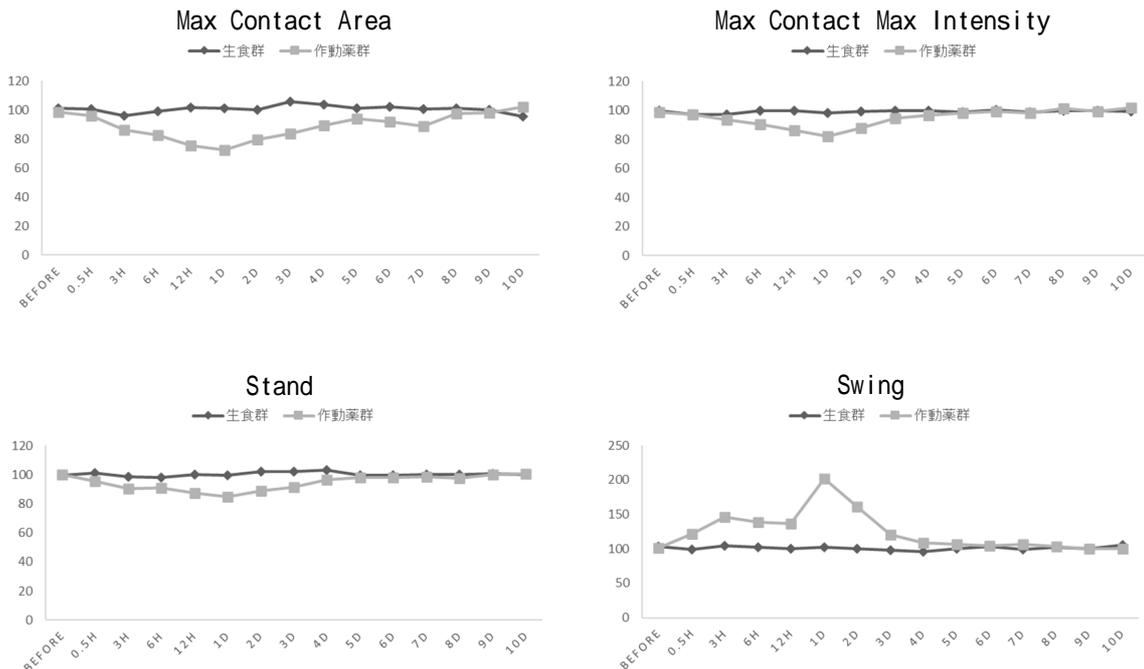
(1)TRPV1 関連試薬関節内注による歩行に与える影響の比較



各種パラメーターのうち、Max Contact Area は7日目まで各群間に有意差は生じなかったが 10 日目に TRPV1 チャネル阻害薬注入群が TRPV1 チャネル作動薬注入群より有意に高い結果となった。Swing Speed は TRPV1 チャネル阻害薬注入群が処置 2 日目から TRPV1 チャネル作動薬注入群より高い結果となり、7 日目まで続いたが、10 日目には TRPV1 チャネル阻害薬注入群が TRPV1 チャネル作動薬注入群より高い結果となった。以上のことより TRPV1 チャネルの活性化や抑制化は変形性膝関節症の機械刺激による疼痛発生機序になんらかの遅発性の作用をもたらしている可能性がある。

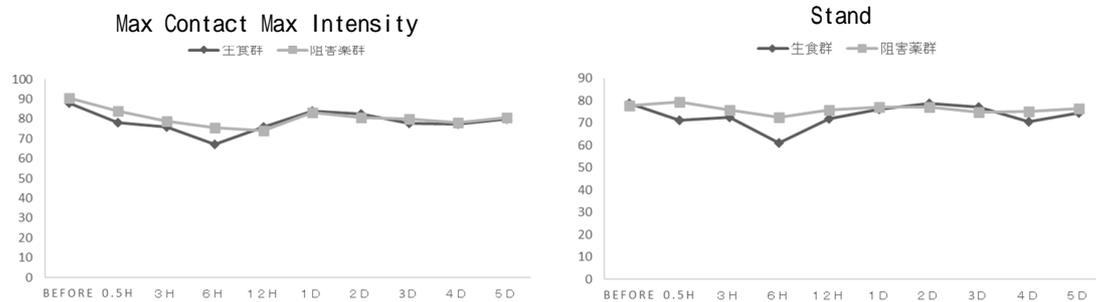
(2) TRPV4 関連試薬関節内注による歩行に与える影響の比較

・正常ラットにおける生理食塩水投与群と TRPV 4 チャネル作動薬投与群の比較



TRPV4 選択的作動薬注入群において上記 4 パラメータとも、注入 1 日後にデータのピークが観察された。注入 1 日後の MaxContactArea、MaxContactMaxIntensity、Stand、Swing の平均値は、生理食塩水群がそれぞれ 101.5%、98.2%、99.8%、102.6% に対し TRPV4 選択的作動薬注入群では、72.6%、82.2%、84.9%、201.7% であった。注入 1 日後の 4 項目すべての群間で有意な差が生じた。TRPV4 選択的作動薬注入群におけるピーク後の経過は 4 項目とも徐々に患側値が健側値に近づいていった。注入 5 日後では 2 群において Swing 以外の項目で有意差が消失していた。以上の結果から TRPV4 の活性化は膝関節痛の発生機序に何らかの作用を有する可能性が示唆された。

・モデルラットにおける生理食塩水投与群と TRPV 4 チャンネル阻害薬投与群の比較



MaxContactMaxIntensity 値は両群とも経時的に減少し、生理食塩水群で 6 時間後、アンタゴニスト群で 12 時間後にピークを迎えた。注入後 6 時間目に 2 群間に最大の差が生じ、アンタゴニスト群で 75.7%、生理食塩水群で 67%となった。Stand 値は経時的減少ではないものの両群とも注入後 6 時間目にピークを迎えた。Stand 値においても 2 群間の最大の差が生じたのは 6 時間目であり、アンタゴニスト群で 72.5%、生理食塩水群で 61.1%となった。

以上の結果から、TRPV1 チャンネル、TRPV4 チャンネルの活性化や抑制化は変形性膝関節症の機械刺激による疼痛発生機序になんらかの作用をもたらしている可能性が示唆された。このことは変形性膝関節症病態生理学に基づく治療戦略を開発する際に分子レベルでの作用点としての可能性を示せたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Taniguchi W, Nishio N, Yamanaka M, Taiji R, Tsutsui S, Nakatsuka T, Yamada H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Analysis of the relationship between knee osteoarthritis weight-bearing pain and transient receptor potential vanilloid 1 using the CatWalk system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PAIN RESEARCH	6. 最初と最後の頁 247-253
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉井英伸, 山中学, 谷口亘, 太地良, 西尾尚子, 中塚映政, 山田宏
2. 発表標題 変形性膝関節症モデルラットにおけるTRPA1発現の電気生理学的検討
3. 学会等名 第13回日本運動器疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taniguchi W, Fukui D, Taniguchi T, Nishio N, Nakatsuka T, Yamada H
2. 発表標題 TRPV1 activation involved in the pain of knee osteoarthritis -in vivo patch-clamp analysis-
3. 学会等名 AOA & APKASS 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 太地良, 中塚映政, 山田宏.
2. 発表標題 変形性膝関節症モデルラットにおけるTRPV1関連痛の行動解析.
3. 学会等名 第11回日本運動器疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 谷口隆哉, 福井大輔, 中塚映政, 山田宏.
2. 発表標題 変形性膝関節症モデルラットにおけるTRPV1関連痛のCat Walkを用いた解析.
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 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 谷口隆哉, 福井大輔, 中塚映政, 山田宏
2. 発表標題 CatWalkを用いた変形性膝関節症における荷重時痛とTRPV1の関係性の解析.
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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 分担者	谷口 亘  (Taniguchi Wataru)  (20453194)	和歌山県立医科大学・医学部・客員研究員   (24701)	
研究 分担者	山中学  (Yamanaka Manabu)  (30597084)	和歌山県立医科大学・医学部・助教   (24701)	

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
---------	---------