

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0018

研究課題名(和文) Systems Bone Biology～骨・軟骨疾患の発症予測から疾患予防へ

研究課題名(英文) Systems Bone Biology

研究代表者

篠原 正浩 (Shinohara, Masahiro)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究室長

研究者番号：60345733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨・軟骨組織は身体支持組織として重要な役割を果たすため、骨粗鬆症や変形性関節症といった骨・軟骨組織の疾患は要介護に陥る大きな要因となっている。本研究では骨・軟骨研究者と数理学研究者からなる異分野融合型チームを編成し、疾患発症過程における血中の骨・軟骨代謝マーカーや骨微細構造の変動に着目した数理科学的解析や画像解析を実施し、骨粗鬆症や変形性関節症の発症予測や早期診断を可能にするシステムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究をさらに発展させることにより、血液検査や骨密度測定、CT画像といった低侵襲・非侵襲の簡易的な検査から疾患の予防や早期治療が実現する。例えば、骨・軟骨代謝マーカーを利用するシステムからは、定期健康診断による定期的なマーカー測定を行うことによりマーカー変動値から将来の骨・軟骨破壊の進行具合が予測することが可能となるため、疾患発症前にアラートを出すことで予防や早期治療が可能となる。本研究は将来的な要介護者数を減少させ、喫緊の社会的な要請に答えるシステムの構築・提供が可能になる。

研究成果の概要(英文)：Bone and cartilage tissues have central roles in daily activities, and diseases associated with a destruction of these tissues such as osteoporosis or osteoarthritis lead to deterioration of daily activity or quality of life. In this study, we established a multidisciplinary research team of bone and cartilage researchers with researchers in mathematical science, and developed a basis of epoch-making systems that make prediction of disease onset and early diagnosis possible by analyzing changes over time of serum markers or tissue microstructures.

研究分野：骨代謝学、細胞生物学

キーワード：骨粗鬆症 変形性関節症 血中マーカー 数理モデル 画像解析

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症や変形性関節症といった骨・軟骨破壊性疾患は要介護となる要因の約20%強を占めており、これら疾患の克服は高齢化社会における要介護者数抑制のために必須である。骨・軟骨組織では骨・軟骨代謝細胞の正常な働きにより組織恒常性が維持されているが、加齢のほか生活習慣の悪化、遺伝的要因など複合的な要因により骨・軟骨代謝細胞に異常をきたすと骨・軟骨破壊性疾患を発症する。ひとたび高齢者の骨・軟骨組織が破壊されると完全な回復は期待できず、多くの罹患者の生活の質が低下し、要介護となることから、これらの骨・軟骨破壊性疾患では疾患発症の予測による予防もしくは早期診断による早期治療が非常に重要である。しかし、疾患の発症予測や早期診断を可能にするストラテジーは存在せず、実験的エビデンスに基づいた骨・軟骨破壊性疾患の発症予測法、早期診断法の開発に資する基礎研究が期待されている。

## 2. 研究の目的

骨・軟骨代謝マーカーは現時点で起こっている骨・軟骨形成や骨・軟骨破壊をリアルタイムで観察することが可能であり、骨・軟骨代謝状態を鋭敏に反映するので、骨・軟骨代謝マーカーの時間的変化を捉えることによって、今後起こる骨・軟骨破壊の進行具合を予測することが可能になる。また、臨床の現場では骨・関節組織のX線画像やCT/MRI画像といった画像解析による疾患の診断が行われているが、骨・関節組織の変形や変性は疾患の発症に先立って起こることから、これらの画像情報から疾患の早期診断が可能となる。

骨・軟骨破壊性疾患の発症は、年齢や性別、生活習慣や遺伝など様々な要因が複雑に関連して起こるが、このような病因にかかわらず骨・軟骨代謝マーカーや骨・関節組織のX線画像やCT/MRI画像の変化が疾患の予兆として現れてくる。したがって、骨・軟骨破壊性疾患モデルマウスから得られる疾患発症時の骨・軟骨代謝マーカーや画像情報の変化を疾患発症の予兆として捉え、骨・軟骨破壊のシミュレーションや画像解析を通じて骨・軟骨破壊性疾患の発症予測や早期診断に結びつくシステムの基盤構築が可能になれば発症予測や早期発見・早期治療が実現することになる。つまり、疾患発症の予兆である骨・軟骨代謝マーカーの変化や骨・軟骨組織の変形・変性を捉え、数理モデルを用いたコンピューターシミュレーションや画像解析を利用することで、将来の発症予測や早期診断が可能になると考えた。本研究では実験によって得られた骨・軟骨代謝マーカーや骨・軟骨組織の画像データを活用して構築した数理科学的解析手法が、実際に疾患発症予測や早期診断に有効であることを実証する proof of concept 研究を展開し、将来的な骨・軟骨破壊性疾患の発症予測法、早期診断法の実用化に向けた確固たる基盤を築くことを目的とした。

## 3. 研究の方法

疾患モデルマウスを活用し、血液サンプルを用いた実験データの拡充や本研究で得られる実験的データから、A) 骨・軟骨代謝マーカー測定から疾患発症予測や早期診断を可能にするシステム構築およびB) 骨・軟骨組織画像から疾患発症予測や早期診断を可能にするシステム構築を目指す研究を実施した。

A) 骨・軟骨代謝マーカー測定から疾患発症予測や早期診断を可能にするシステム構築では下記の5項目について研究を実施した。

加齢による血液マーカーの経時的変化動態の解明

骨量推移動態を予測する数理モデルの開発とシミュレータの開発

疾患モデルマウスを用いたマーカーを用いた疾患発症予測システムの検証

シミュレーションとAIの融合による疾患発症予測・早期診断を可能にするシステムの完成

また、B) 骨・軟骨組織画像から疾患発症予測や早期診断を可能にするシステム構築については下記の3項目について実施した。

骨・軟骨破壊性疾患発症過程における骨微細構造の経時的変化動態の解明

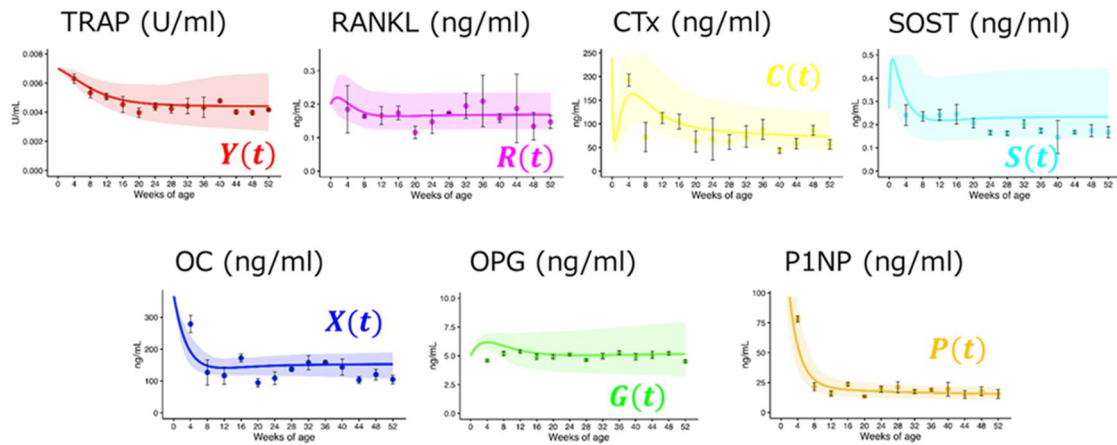
組織の状態を特徴づける統計量の構築とシミュレーションの開発

疾患モデルマウスを用いた画像解析ベースの発症予測システムの検証

## 4. 研究成果

A) 骨・軟骨代謝マーカー測定から疾患発症予測や早期診断を可能にするシステム構築

生後4週齢から5週齢まで4週齢ごとのマウス血清サンプルにおける計7種類の骨代謝関連マーカーの測定を行い、マーカーの経時的データを取得し(図)、このデータをもとに各骨代謝関連マーカーの変動を予測する数理モデルを作成した。さらに、破骨細胞と骨芽細胞による骨の形成と吸収のバランスを記述した“骨量方程式”を開発し、積分方程式による骨量の力学型の記述に成功し、骨量変化を定量的に予測するための基盤構築に成功した。これら骨代謝関連マ-



カー変化の数理モデルと骨量変化の数理モデルをマルチスケールに統合し、骨量変化の定量的な予測を実現するシミュレーションの開発を行った。並行して、CTによる骨量測定を実施し、経時的な骨量の変化に関するデータを得た。この実測した骨量に対して数理シミュレーションのフィッティングを行い、骨代謝関連マーカーの動的変化より骨量を推定するシステムを構築した。

構築したシミュレーションがマウス介入時の骨量変化を予測可能であることを実証するため、運動による骨量増加モデルおよび骨粗鬆症による骨量低下モデルを用いて検証を行った。ヒトにおいて適度な走行運動は骨量の低下抑制や増加効果を示すことから、トレッドミルを使用した運動モデルを実施した。速度を10m/min(低強度)、15m/min(中強度)、20m/min(高強度)の3段階、1日30分、週5回、2週間にわたって運動を行ったマウスの解析から運動による骨量増加のシミュレーション予測を行った。2週間の運動実施後に血中骨代謝関連マーカーを解析したところ、運動強度と比例して骨形成関連マーカーの増加が認められた。一方、実際の骨量はいずれの群においても運動していないコントロール群との比較で骨量増加は認められなかった。この時の血中骨代謝関連マーカーの値を元にさらに運動を継続した時の骨量増加予測を行ったところ、1ヶ月以降継続すると骨量が増加するという結果が得られた。この解析から、2週間程度の運動では骨組織において骨量が増加する方向に向かっているものの、実際の骨量増加にはさらに時間がかかることが示唆された。運動による骨量増加効果に関してはさらに検証を進めている。

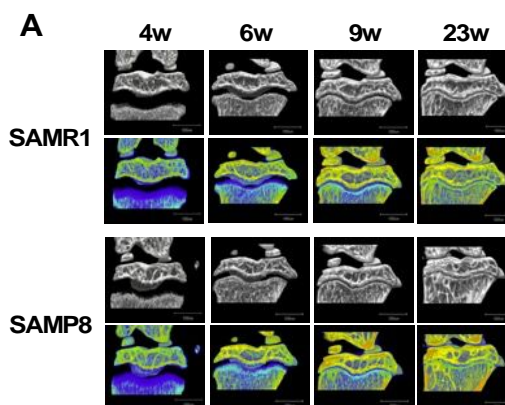
一方、骨粗鬆症モデルを活用した骨量低下予測に関する検証も実施した。まず、モデルとして卵巣切除による閉経後骨粗鬆症モデルの検討を行った。卵巣摘出手術後の骨量低下の動態を明らかにするため、術後2週、4週、8週の雌マウスの解析を行ったところ、術後2週で有意な骨量低下が認められ、その後さらに骨量が低下していくことが判明した。疾患発症の早期における変動を捉えることにより予測が可能になることから、さらに早期(術後1週以内)における詳細な解析を行なった。その結果、手術翌日から骨吸収関連マーカーの一過的な上昇が見られるとともに、炎症性サイトカインの急激な上昇も認められた。これは手術による炎症反応と考えられ、一般的に炎症により骨吸収が促進されるため、必ずしもヒトの病態を反映しているとは考えられないため、今回の検証には適さないモデルであると考えられた。従って、別の骨粗鬆症モデルである不動性骨粗鬆症モデルの解析を行った。不動性骨粗鬆症は身体不活動に伴って骨量が低下するモデルであり、実験的にはマウスの後肢をワイヤーで固定し、地面への足の接地と身体活動量の抑制を行うモデルである。またこのモデルでは卵巣摘出実験と異なり、外科的手術が不要であることから、炎症などの副反応を考慮する必要がない点がメリットである。このモデルで2週間の不動化を行ったところ、劇的な骨量低下が認められたことから、さらに詳細な時系列データの取得を行った。その結果、不動化2日後には骨形成関連マーカーの劇的な減少が起こっていることを見出した。不動化後14日までの経時的な骨代謝関連マーカーの測定結果を元に骨量変化予測を行ったところ、骨量は不動化後4日目以降で起こるというシミュレーション結果を得た。実際に骨量を解析したところ、不動化後4日目以降で有意に骨量が低下していたことから、不動性骨粗鬆症における発症予測に対して一定の予測が可能であることが判明した。今後は、さらに予測精度の上昇やヒトへの応用を見据えた研究が必要であろう。

## B) 骨・軟骨組織画像から疾患発症予測や早期診断を可能にするシステム構築

骨粗鬆症における骨折では骨量と骨質のほか、骨構造は骨のリモデリングにより力学的に最適化な構造を形成されることが知られており、骨強度の維持・向上に寄与する重要な因子である。骨構造を記述するための特徴量は多数提案・活用されているが、これらは互いに独立ではなく、また骨構造のすべてを記述するには不十分である。本研究では、骨構造の全ての構造的特徴を記述するための統計量の開発に向け、microCTデータからの解析対象部位のアノテーションと位相的データ解析を利用したマルチスケール骨量パタンの包括的な記述により取り組み、骨CTデータの領域分割により抽出された構造、特に空隙構造に注目し、構造の特徴量抽出に成功した。並行して、トポロジカルデータ解析により空隙構造を解析したところ、空隙構造の等方性-異方性

の判別は比較的容易であるが現状のデータ、手法では異方性のトレンドを判別することは難しいことも判明した。

一方、変形性関節症の早期発見に資する画像解析を基盤とした診断法の確立も行った。変形性関節症(OA)は運動器において最も罹患者数の多い加齢性変性疾患であるが、加齢によるOA発症メカニズムについては十分に明らかにされておらず早期診断法もないのが現状である。そこで、老化促進マウス(SAMP8)が、OAを早期に発症するのかを明らかにするために、SAMP8マウスにおける膝関節の病理組織学的解析を行い、14週齢よりSAMP8マウスでは軟骨変性が認められ、23週齢においては、全てのマウスで軟骨の部分欠損、また軟骨下骨に至る全層欠損が観察され、早期にOAを発症するマウスであることを明らかにした。このSAMP8マウスは、軟骨変性に先んじて顕著に軟骨下骨の硬化が進行していることも判明した(図)。この軟骨下骨における病理組織学的変化の評価法は確立されていないことから、加齢性OAモデルとしてSAMP8マウスと外傷性OAモデルマウスを用いてmicroCTなどのデータと比較・検証を行い組織切片のみによる軟骨下骨の変化を早期に検出することが可能な新たなスコアリングシステムを開発した。今後、ヒトへの応用や構造変化をとらえるマーカー探索などの研究につながることを期待される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagira K, Ikuta Y, Shinohara M, Sanada Y, Omoto T, Kanaya H, Nakasa T, Ishikawa M, Adachi N, Miyaki S, Lotz MK	4. 巻 10
2. 論文標題 Histological scoring system for subchondral bone changes in murine models of joint aging and osteoarthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10077
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66979-7	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 Ryu Y, Maekawa T, Yoshino D, Sakitani N, Takashima A, Inoue T, Suzurikawa J, Toyohara J, Tago T, Fujita N, Sawada K, Murase S, Watanave M, Sakai T, Yoshikawa Y, Ogata T, Shinohara M, Nagao M, Sawada Y	4. 巻 23
2. 論文標題 Mechanical regulation underlies effects of exercise on serotonin-induced signaling in the prefrontal cortex neurons.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.100874	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 Miyazaki T, Zhao Z, Ichihara Y, Yoshino D, Imamura T, Sawada K, Hayano S, Kamioka H, Mori S, Hirata H, Araki K, Kawauchi K, Shigemoto K, Tanaka S, Bonewald LF, Honda H, Shinohara M, Nagao M, Ogata T, Harada I, Sawada Y	4. 巻 5
2. 論文標題 Mechanical regulation of bone homeostasis through p130Cas-mediated alleviation of NF- B activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eaau7802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aau7802	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠原正浩
2. 発表標題 障害者の骨をどう守る？
3. 学会等名 第4回理論免疫学ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 綱川祐貴
2. 発表標題 モデルマウスを用いた骨融解症の病態理解 -遺伝子欠損から疾患変異へ-
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綱川祐貴、篠原正浩、濱田理人、全孝静、水野聖哉、Andreas Zankl、臼井俊明、布施谷清香、金井真帆、森戸直記、高橋智
2. 発表標題 多中心性手根骨足根骨融解症の病態理解のための分子的基盤-遺伝子欠損から疾患変異へ-
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳樂慶太、真田洋平、篠原正浩、萩野浩、味八木茂
2. 発表標題 変形性膝関節症マウスモデルを用いた軟骨下骨の組織学的スコアリングシステムの確立
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳樂慶太、味八木茂、生田祥也、真田洋平、篠原正浩、安達伸生、永島英樹、Lotz Martin
2. 発表標題 変形性膝関節症マウスモデルを用いた軟骨下骨の組織学的スコアリングシステムの確立
3. 学会等名 第34回日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綱川祐貴、篠原正浩、濱田理人、松永友里菜、布施谷清香、全考静、脇本悠史、白井俊明、金井真帆、水野聖哉、森戸直記、高橋智
2. 発表標題 MCTOモデルマウスは患者と同様の腎症を示す
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳楽慶太、生田祥也、篠原正浩、中佐智幸、眞田洋平、大本武児、安達伸生、味八木茂、Martin Lotz
2. 発表標題 変形性関節症マウスモデルを用いたひざ関節周囲骨の組織学的スコアリングシステムの確立
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 篠原正浩	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 実験医学	

〔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	味八木 茂  (Miyaki Shigeru)  (10392490)	広島大学・病院(医)・講師   (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	岩見 真吾  (Iwami Shingo)  (90518119)	九州大学・理学研究院・准教授    (17102)	
研究分担者	野下 浩司  (Noshita Koji)  (10758494)	九州大学・理学研究院・助教    (17102)	

	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	山崎 咲麗  (Yamazaki Sakura)		
研究協力者	郷地 慶  (Gochi Kei)		
研究協力者	大塚 佳輝  (Otsuka Yoshiki)		
研究協力者	鈴木 碧  (Suzuki Aoi)		

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