

## 論文審査の結果の要旨

氏名：山崎 敦史

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題目：犬または猫の変形性関節症における新規診断法の開発

審査委員：（主査） 教授 浅野 和之

（副査） 教授 森友 忠昭

教授 北川 勝人

准教授 枝村 一弥

変形性関節症（OA）は、関節軟骨の変性と破壊、関節包付着部や関節軟骨下における骨の増生、二次性滑膜炎を伴う進行性かつ非感染性の関節疾患と定義されている。OAの病態の進行は一方向性であるため、早期の診断および治療介入が重要な疾患である。獣医療の発展と動物の高齢化に伴い、現在では犬や猫におけるOAの罹患率は増加傾向にある。犬や猫のOAは、X線検査にて診断を行うのが一般的だが、診断時には既に末期であることが多く、より早期に診断が可能な手法の確立が望まれる。ヒトでは、OAの慢性痛によって生じる行動の変化やバイオマーカーに関する研究が数多く行われており、一部は実用化されOAの早期診断に役立っている。一方、犬や猫では慢性痛による行動の変化を飼い主が認識しなければならず、早期に発見することが困難な場合が多い。そこで、OAによって生じる微細な行動の変化を客観的に評価できる診断法の開発が望まれている。また、獣医学領域においては、軟骨分解マーカーを検出する検査系が確立しておらず、ヒトのOAの診断に比べ大きな遅れをとっている。近年では、OAの早期診断に有用なバイオマーカーとしてmicro RNA（miRNA）が注目されているが、犬では十分な研究が行われておらず不明な点が多い。そこで、本研究では、犬と猫の行動の変化を客観的に把握する目的で動物用ウェアラブルデバイスの測定精度を検証し、OAの診断への有用性を検討した。次いで、軟骨分解マーカーとして2型コラーゲン架橋C-テロペプチド（CTX-II）に着目し、犬のOAにおける診断への有用性を検討した。さらに、OA罹患犬の滑膜で発現するmiRNAを網羅的に解析し、OAのバイオマーカーとしての可能性を検討した。

### 第一章 動物用ウェアラブルデバイスの測定精度およびOAの診断への有用性の検証

犬や猫においても、OAによって生じる慢性痛は、活動性や睡眠の質に影響を与えることが知られている。そのような徴候を捉える目的で、犬や猫の行動の変化を主観的に評価する手法が行われてきたが、評価基準が曖昧で、一貫した結果を得ることは簡単ではない。そのため、慢性痛の徴候を客観的に評価できる手法の確立が望まれている。そこで、本章では、犬と猫の活動量および休息・睡眠時間における動物用ウェアラブルデバイスの測定精度を検証し、OAの診断への有用性を検討した。

まずは、ボランティアで参加した健康な犬（n=3）と猫（n=6）を用い、Plus Cycle<sup>®</sup>活動量計（日本動物高度医療センター）にて、運動量、振動数、昇回数、休息・睡眠時の活動量を計測し、実際の動きと比較することで測定精度を評価した。次いで、一般家庭で飼育されている犬（n=75）と猫（n=71）を対象に、日常生活での活動量と休息・睡眠時間の基礎データを収集した。得られた3週間分のデータをもとに1日の平均を算出し、性別、年齢、時間帯の3項目において比較を行った。さらに、OAの実症例でも活動量と休息・睡眠時間を測定し、一般家庭で飼育されている犬と猫で収集した基礎データと比較した。

Plus Cycle<sup>®</sup>活動量計にて測定した活動量は、犬と猫の実際の行動と合致しており、高い精度で測定できていることが明らかとなった。さらに、休息・睡眠状態の判別精度もきわめて高いことが示された。次いで、

一般家庭で飼育されている犬と猫の1日の平均活動量を性別で比較したところ、全項目で差は認められなかった。また、年齢との相関関係を調査したところ、犬の活動量は高齢になるにつれて減少していく傾向が認められた。猫にも同様の傾向があり、犬よりも顕著に全項目が加齢に伴って減少していた。その逆に、犬と猫の休息・睡眠時間は、高齢になるにつれて増加する傾向が認められたが、夜間の休息・睡眠時間は変化の幅が小さかった。OAに罹患した犬と猫の活動量と休息・睡眠時間を、本検討で得られた基礎データと比較したところ、OA罹患症例では1日の活動量が低下し、休息・睡眠時間が増加する傾向が認められた。

本章の結果から、Plus Cycle<sup>®</sup>活動量計は犬や猫の活動量と休息・睡眠時間を客観的かつ正確に評価することができ、OAによる慢性痛の初期徴候を検出するためのツールとして利用できる可能性が示された。

## 第二章 犬のOAの診断マーカーとしてのCTX-IIの有用性

ヒトにおいては、関節軟骨を構成する2型コラーゲンの分解を検出するバイオマーカーがOAの補助診断に用いられている。それらの中で、CTX-IIがOAの診断に有用な軟骨分解マーカーとして注目されている。犬のOAモデルを用いた基礎研究においても、CTX-IIがバイオマーカーの候補として挙げられているが、自然発症のOAの症例を用いた検証は行われていない。そこで、本章では、OA罹患犬からサンプルを採取し、OAの診断マーカーとしてのCTX-IIの有用性について検討を行った。

本検討は、日本大学動物病院に来院し、X線検査にて膝関節にOAが認められた症例(OA群：n=11)を対象に行った。本検討では、対照として臨床健康と認められた犬(正常群：n=10)を用いた。両群ともに、血清、尿、関節液を同日に採取し、Canine CTX-II ELISA kit (MyBioSource)を使用してCTX-II濃度を測定した。まずは、各検体において、OAの有無によるCTX-II濃度の差異を比較した。さらに、性別、年齢、経過日数、跛行スコア、X線検査での重症度と、CTX-IIの測定値との関係についても検討を行った。

血清、尿、関節液のCTX-II濃度を両群間で比較したところ、関節液のみにOA群で有意な上昇が認められた。そのため、以下の検討は関節液のみで行った。OA罹患犬では、CTX-II濃度に性差は認められなかった。CTX-II濃度をOAが発症した年齢で比較したところ、若齢ほど高い傾向が認められた。CTX-II濃度は、OA発症からの経過日数が少ない症例においても有意な高値を認めたが、慢性化するほど低くなる傾向が認められた。また、跛行スコアが重度な症例だけでなく、軽度な症例であってもCTX-II濃度の有意な上昇が検出された。X線検査では、OAによる変化が初期の段階においてCTX-II濃度の有意な上昇が認められた。

本章では、犬のOAのバイオマーカーとしてCTX-IIを測定したところ、関節液が検体として最も適していた。また、OA罹患犬では関節液中のCTX-II濃度が有意に上昇することが明らかになった。CTX-IIは、臨床徴候やX線検査による異常所見が軽度で、発症からの期間が短い症例で高値が認められたことから、OAの早期診断に有用なバイオマーカーであることが示された。

## 第三章 OA罹患犬の滑膜におけるmiRNAの網羅的解析とバイオマーカーとしての可能性

近年、ヒトのOAの病態には、miRNAが深く関与していることが明らかとなり、血液や尿などの体液中でも安定して存在するためバイオマーカーとしても注目されている。一方、犬のOAにおけるmiRNAの発現については、全く検討されていないのが現状である。そこで、本章では、OA罹患犬の滑膜において発現するmiRNAを網羅的に解析し、バイオマーカーとしての可能性について検証した。

本検討は、日本大学動物病院に来院し、X線検査にて膝関節にOAが認められた症例(OA群)を対象に行った。正常群には、臨床健康と認められた犬を使用した。両群ともに、滑膜炎の有無を評価した部位から滑膜を採取した。次にtotal RNAを抽出し、ライブラリーの作製を行った後に、シーケンス解析を実施した。そして、miRBaseを参照配列としてマッピングを行ってから、miRNAの発現量を測定した。さらに、ヒートマップを用いて両群間の発現量の差が明確なmiRNAを選出し、RT-qPCRによって滑膜におけるmiRNAの発現量を測定した。最後に、同個体から関節液と血清を採取し、両群間でのmiRNAの発現量を比較した。

RNA-seqの結果から、OA群で有意に増加したmiRNAは57種類であり、有意に減少したmiRNAは42

種類であった。次いで、ヒートマップを用いて両群間の発現量の差が明確であった 12 種類の miRNA を選出し、RT-qPCR を用いて発現量を測定した。OA 群の滑膜では、miR-543 と miR-127 の発現量が有意に増加し、miR-146a と miR-381 の発現量にも増加傾向が認められた。一方、OA 群の滑膜では、miR-145 の発現量が減少していた。これらの中で、OA 罹患犬の関節液と血清ともに発現量が増加していたのは、miR-543 のみであった。

本章の結果から、OA 罹患犬の滑膜組織における miRNA の発現パターンが明らかとなった。さらに、miR-543 は OA 罹患犬の滑膜組織、関節液、血清で一貫して発現量が増加していたことから、OA のバイオマーカーとして利用できる可能性が示された。

## 総括

本研究では、犬と猫の活動量および睡眠の質の評価に動物用ウェアラブルデバイスである Plus Cycle<sup>®</sup>活動量計が有用であることを立証し、OA の診断ツールとして利用できる可能性を示した。また、CTX-II は、犬の OA の診断のための軟骨分解マーカーとして活用することができ、早期診断に有用であることを示した。さらに、OA 罹患犬の滑膜における miRNA 発現パターンが把握でき、その一部はバイオマーカーとして利用できる可能性を明らかにした。本研究で得られた成果は、犬または猫における OA の診断技術の向上に大きく貢献することが期待される。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和 3 年 2 月 22 日