

犬または猫の変形性関節症における新規診断法の開発

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

山崎 敦史

2020

本論文略語表

名称	略語
Osteoarthritis	OA
Quality of life	QOL
Matrix metalloproteinases	MMPs
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs	ADAMTS
Type II collagen C-terminal cross-linking telopeptide	CTX-II
Cartilage oligomeric matrix protein	COMP
<sup>108</sup> HRGYPGLDG <sup>116</sup>	Coll2-1
Collagen type II cleavage	C2C
Type II collagen neoepitope	TIINE
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs	NSAIDs
Enzyme-linked immuno-sorbent assay	ELISA
MicroRNA	miRNA
Multidimensional scaling	MDS

# 目次

	頁
序 .....	1
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 の診断への実用性 の検証.....	7
1.1. 緒言 .....	8
1.2. 材料および方法 .....	11
1.2.1. Acitcal <sup>®</sup> と Plus Cycle <sup>®</sup> の比較	
1.2.2. 犬における Plus Cycle <sup>®</sup> の測定精度の検証	
1.2.3. 猫における Plus Cycle <sup>®</sup> の測定精度の検証	
1.2.4. 一般家庭で飼育されている犬の活動量および休息・睡眠時間の分析	
1.2.5. 一般家庭で飼育されている猫の活動量および休息・睡眠時間の分析	
1.2.6. OA に罹患した犬と猫の活動量および休息・睡眠時間の評価	
1.2.7. 統計学的解析	
1.3. 結果 .....	22
1.3.1. Acitcal <sup>®</sup> と Plus Cycle <sup>®</sup> の比較	
1.3.2. 犬における Plus Cycle <sup>®</sup> の測定精度の検証	

1.3.3. 猫における Plus Cycle®の測定精度の検証	
1.3.4. 一般家庭で飼育されている犬の活動量および休息・睡眠時間の分析	
1.3.5. 一般家庭で飼育されている猫の活動量および休息・睡眠時間の分析	
1.3.6. OA に罹患した犬と猫の活動量および休息・睡眠時間の評価	
1.4. 考察 .....	42
第二章 犬の OA の診断マーカーとしての CTX-II の有用性 .....	46
2.1. 緒言 .....	47
2.2. 材料および方法 .....	49
2.2.1. 対象動物	
2.2.2. 検体の採取および保存方法	
2.2.3. CTX-II 濃度の測定	
2.2.4. CTX-II 濃度の比較	
2.2.5. 統計学的解析	
2.3. 結果 .....	54
2.4. 考察 .....	63
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.....	68
3.1. 緒言 .....	69

3.2. 材料および方法 .....	71
3.2.1. 対象動物	
3.2.2. 検体の採取および保存方法	
3.2.3. Total RNA の抽出	
3.2.4. Small RNA-seq	
3.2.4.1 ライブラリー作製およびシーケンス解析	
3.2.4.2 アライメントおよび miRNA の検出	
3.2.4.3 miRNA 発現量の比較	
3.2.5. cDNA の合成と RT-qPCR	
3.2.6. 統計学的解析	
3.3. 結果 .....	79
3.3.1. 対象症例	
3.3.2. Small RNA-seq	
3.3.3. RT-qPCR	
3.4. 考察 .....	94
総括 .....	100
謝辞 .....	105

参考文献 .....106

序

変形性関節症（Osteoarthritis: OA）とは、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（Innes, 2012）。獣医療の発展に伴う動物の高齢化から、現在では犬や猫においても OA の罹患率は増加傾向にある。米国での調査によると、成犬の約 20%が OA に罹患していることが示されている（Johnston, 1997）。また、猫においては、従来まで関節疾患は少ないと認識されていたが、6 ヶ月齢から 20 歳齢までの猫 100 頭を調査した報告によると、驚くべきことに 90%以上の猫に OA が存在することが明らかになった（Lascelles *et al.* 2010）。過去に当研究室で行った調査においても、わが国の 10 歳齢以上の犬の約 20%、10 歳齢以上の猫の約 40%が OA に罹患していることが判明しており、OA は犬や猫で生じる最も多い運動器疾患と言っても過言ではない。

OA の原因は多岐にわたり、一般的に一次性と二次性に大別される。関節に既存の障害や形状の異常がなく、加齢性変化、体重や運動などの負荷によって生じるものが一次性に分類される。一方で、関節内骨折、靭帯断裂、半月板損傷、脱臼といった外傷や、関節の形成異常に続発するものが二次性に分類される（Dieppe and Lohmander, 2005）。OA の初期では、まず関節軟骨の水分含有量が増加して軟骨軟化症が生じる。次いで、関節軟骨の細胞外マトリックスが進行性に破壊されていく。軟骨基質の破壊には、軟骨細胞や滑膜細胞から産生されるマ



トリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinases: MMPs) やアグリカナ  
ーゼ (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs: ADAMTS) が  
関与している。これらの軟骨分解酵素によって、軟骨基質であるII型コラーゲン  
やプロテオグリカンが分解されると、関節軟骨にびらんや潰瘍が形成される。最  
最終的には、軟骨細胞が活性を維持することができなくなり、軟骨組織が消失す  
る。このような関節軟骨の破壊が進行すると同時に、関節包の付着部などに骨増  
殖体が形成される。さらに、関節軟骨が削れて骨同士が接するようになると、軟  
骨下骨の硬化が生じ関節構造が変化する (Innes, 2012)。このような状態にまで  
進行してから初めて X 線検査で診断することができる。

罹患関節では、比較的初期の段階から、関節包を裏打ちする滑膜の炎症を伴う  
(Innes, 2012)。滑膜炎が生じると関節痛が発現し、関節包が肥厚したり、関節液が貯  
留したりして、関節の拘縮や腫脹も生じる。そのような状況になると、運動機能が損な  
われ、日常の生活の質 (Quality of life: QOL) が著しく低下する。残念ながら、このよ  
うな関節内の変化は不可逆的であり、一度生じたら元に戻すことはできない。したがっ  
て、OA は早期の診断が重要であり、その進行をいかに緩徐にして QOL の改善およ  
び維持を図るかが治療の要点となる。

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。

現在、わが国において、膝関節の OA に罹患している 40 歳以上患者数は約 2,500 万人と推定されており (Yoshimura *et al.* 2009)、非常に多くの国民が罹患していることが明らかになっている。そのため、OA などの運動器障害によって移動機能が低下した状態を「ロコモティブシンドローム」と称し、症状の自覚をすためのチェックリストを作成することで来院率の向上を図っている。近年、ヒトでは、そのような主観的な指標に加えて、客観的に自身の健康状態を把握することができる様々なウェアラブルデバイスが開発され、運動器の健康管理にも既に活用されている。

一方、犬や猫においては、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。近年、動物の活動量や睡眠時間を客観的に計測するためのウェアラブルデバイスも開発され始めているが、開発されたデバイスの多くは測定精度が明らかにされていない。また、大型犬に装着することを想定して開発されたデバイスがほとんどであり、小型犬や猫を含めた全ての品種において一貫して装着することはできないのが現状である。最近、わが国において、小型犬や猫にも装着できるより高性能のウェアラブルデバイスが開発されたことにより、OA の早期診断への活用期待が高まっている。

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。ヒトでは、関節軟骨基質の構成成分である軟骨オリゴマーマトリックス蛋白質 (Cartilage oligomeric matrix protein: COMP) や、II 型コラーゲンの分解産物である II 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (Type II collagen C-terminal cross-linking telopeptide: CTX-II) が、OA の診断や重症度判定に有用であることが報告されており、臨床の現場においても補助診断として活用されている (Bay-Jensen *et al.* 2016)。このような関節構成体の代謝を反映するバイオマーカーは、OA の病態を評価するための客観的指標として有用性が示されている。獣医学領域においても、早期診断に有用な OA のバイオマーカーとして関節軟骨の代謝産物が注目されており、基礎研究が進められている。犬では、ヒトと同様に、II 型コラーゲンの分解産物である CTX-II や II 型コラーゲンネオエピトープ (Collagen type II cleavage: C2C, Type II collagen neoepitope: TIINE)、基質の構成成分であるコンドロイチン硫酸やアグリカンなどがバイオマーカーの候補として挙げられている (Shahid *et al.* 2017)。一方、猫では、血液中の IL-4 や IL-8 などの炎症性サイトカインがバイオマーカーとして利用できる可能性が報告されている (Shahid *et al.* 2017)。特に、犬において II 型コラーゲンの分解産物である軟骨分解マーカーに注目が集まっているが、いずれの研究においても OA の診断に有用なバイオマーカーは確立されていない。

そのため、日常の診療において簡便かつ早期に OA を診断することが可能で、重症度の判定に有用なバイオマーカーの開発が望まれている。

最近では、ヒトの OA の病態に micro RNA (miRNA) が関与することが明らかとなっている (Nugent, 2016)。miRNA は、血液や尿などの体液中でも安定して存在するため、検体を簡便に採取することが可能であり、早期診断に有用なバイオマーカーとして注目されている。実際に、ヒトでは OA に罹患した患者の血液に含まれる miRNA の発現を網羅的に解析し、バイオマーカーの候補となる miRNA を探索するために、多くの研究施設において調査が進められている (Munjal *et al.* 2019)。一方、犬や猫の OA における miRNA の発現は全く明らかにされておらず、バイオマーカーとしての可能性についても検討されていないのが現状である。そのため、動物においても OA の病態に関与する miRNA を明らかにし、体液中にも存在する miRNA を特定することができれば、OA の新規バイオマーカーとして miRNA が活用できる可能性が高い。

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 の診断への実用性を検討した。次いで、軟骨分解マーカーとして 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 に罹患した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 の診断への実用性の検証

## 1.1 緒言

獣医療の発展に伴う動物の高齢化から、現在では犬や猫の変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) の罹患率は増加しており、当研究室で行った疫学調査からも、わが国の 10 歳齢以上の犬の約 20%、12 歳齢以上の猫の約 40%に OA が存在していることが明らかになっている。しかし、わが国の 0~12 歳齢の犬と猫を用いた大規模な疫学調査によると、運動器疾患を主訴に動物病院へ来院した犬の割合は 11.3%、猫の割合は 2.2%であったと報告されている (岸田ら, 2019)。このように、多くの犬や猫が OA に罹患していることが判明しているのにも関わらず、動物病院に来院する割合は低いのが現状である。

OA に罹患した犬は、跛行などの運動機能の低下を示すことが多いが、その他にも様々な行動の変化が生じることも明らかになっている (Innes, 2012)。最近では、OA に伴う慢性痛によって睡眠時間が変動することも報告されている (Knazovicky *et al.* 2015)。過去の当研究室での調査においても、関節疾患による慢性痛を伴う犬は、移動機能の低下に加えて睡眠時間が変動することが明らかとなっている。このように、OA に罹患した犬は必ずしも跛行のみを呈するわけではないため、飼い主が OA の臨床徴候を認識することが困難なことが多い。そのような背景から、OA の臨床徴候を早期に検出するために、犬の行動の変化を主観的に評価する手法が開発されてきた。現在までに、Canine brief pain inventory

(CBPI)、Helsinki chronic pain index (HCPI)、Health-related quality of life (HRQL)、Liverpool osteoarthritis in dogs (LOAD)、動物のいたみ研究会の慢性痛判定シートなどが、OA に罹患した犬の主観的な評価法として用いられている (Brown *et al.* 2008, Hielm-Björman *et al.* 2009, Hercock *et al.* 2009, Wiseman-Orr *et al.* 2004, 左近 允ら, 2012)。

猫では、OA に罹患していても顕著な跛行を呈することが少ないため、飼い主は自身の猫が OA に罹患していることに気がつかない場合が多い。OA の猫において最も多く認められる臨床徴候は、ジャンプ能力の低下およびジャンプできる高さが低下することである (Clarke and Bennett, 2006)。その他には、高い所から飛び降りられない、階段を昇らない、あまり遊ばない、トイレの使用が難しくなる、爪が伸びている、睡眠時間の変調などといった行動の変化が認められる (Lascelles *et al.* 2010)。このような OA に罹患した猫の臨床徴候を早期に検出するために、猫においても様々な主観的評価法が開発されてきた。猫では、Feline musculoskeletal pain index (FMPI)、Client-specific outcome measure (CSOM)、Montreal instrument for cat arthritis testing for use by caretaker (MI-CAT(C))、Montreal instrument for cat arthritis testing for use by veterinarian (MI-CAT(V)) などが報告されている (Bentio *et al.* 2013, Lascelles *et al.* 2007, Klink *et al.* 2018)。しかし、このような主観的評価法の判定基準は曖昧であるため、一貫した結果を得ることは難しいのが現状で

ある。そのため、OA によって生じる犬と猫の行動の変化を客観的に評価できる手法の確立が望まれている。

最近では、犬と猫の OA を早期に診断するために、加速度計を搭載した活動量計の使用が注目されている。これらのデバイスは、活動のパターン、活動した時間、強度と頻度によって変化する加速度を検出し記録することが可能である (Belda *et al.* 2018)。犬では、測定精度が検証された動物用デバイスが開発されているが、デバイスのサイズが大きいため小型犬に装着することは難しく、全ての犬種で使用することができないのが現状である (Belda *et al.* 2018)。また、猫において活動量計の測定精度を検証した報告は過去に 1 報だけ存在するが、この研究で使用された活動量計はヒト用に開発されたデバイスであり、動物用デバイスではなかった (Lascelles *et al.* 2008)。さらに、このヒト用のデバイスは、OA に罹患した猫において特徴的な臨床徴候であるジャンプ回数を測定することができない。そのような背景から、3 軸加速度センサーと気圧センサーを内蔵し、休息・睡眠時間も計測できるソフトウェアを搭載した犬猫用の新たな活動量計が開発された。

そこで本章では、まず、この新たに開発された活動量計と、犬と猫において既に測定精度が検証されているヒト用の活動量計の測定値を比較することにした。次いで、新たな活動量計を用いて犬と猫の活動量および休息・睡眠時間を測



定し、その測定精度を評価した。さらに、活動量および休息・睡眠時間における、性別、年齢、時間帯（昼間と夜間）の影響を調査した。最後に、OAに罹患した犬と猫のデータを取得し、OAの診断への実用性を検討した。

## 1.2 材料および方法

### 1.2.1 Actical<sup>®</sup>と Plus Cycle<sup>®</sup>の比較

本検討は、ボランティアとして参加した1歳齢以上の健康な犬（n=10）と猫（n=10）を対象とし、日本動物高度医療センター動物実験委員会の承認を得て実施した（Protocol ID: F0602-17001）。

本検討では、ヒト用のウェアラブルデバイスで動物の活動量の評価に最も広く使用されている Actical<sup>®</sup>（Philips Respironics Inc. Bend, OR, U.S.A.）と、犬と猫のために新たに開発された Plus Cycle<sup>®</sup>（日本動物高度医療センター、川崎）の2つの活動量計を使用し、両デバイス間での測定結果を比較した。Actical<sup>®</sup>は、大きさが28×27×10mm、重量が17gで、犬と猫の両方における活動量の測定精度が既に検証されている（Hansen *et al.* 2007, Lascelles *et al.* 2008）。

Plus Cycle<sup>®</sup>は、直径が27mm、厚みが9.1mmで、重量は9gのデバイスであり、3軸加速度センサーと気圧センサーを搭載している。我々が知る限り、このデバイスは、気圧センサーによりジャンプ数を測定することが可能な世界初の動物

用ウェアラブルデバイスであり、小型犬や猫を含めた全ての品種において一貫して装着することができるという特徴を有している。

まずは、対象動物の首輪に 2 つの活動量計を同時に装着し、動物が通常の日常生活を行っている間に計測を実施した。活動量計のエポック長（デバイスが計測した活動量データを保存する間隔）は 1 分間とした。Actical<sup>®</sup>で測定した活動量のデータを取得するために、Actical<sup>®</sup>を首輪から外してから、Actical<sup>®</sup> reader device（Philips Respironics Inc.）を用いてパソコンへと接続し、Actical<sup>®</sup> software を使用してデータをダウンロードした。一方、Plus Cycle<sup>®</sup>は、Bluetooth を用いて飼い主のスマートフォンと接続し、活動量に関するデータを取得した。取得したデータは、Plus Cycle<sup>®</sup>のデータサーバーにアップロードされ、データを解析する時にパソコンへダウンロードしてから検証を行った。これらの活動量は、24 時間測定した。Actical<sup>®</sup>もしくは Plus Cycle<sup>®</sup>を用いて測定した Total activity は、24 時間で測定した総活動量と定義し、Activity intensity は、1 分間ごとの活動量と定義した。

### 1.2.2 犬における Plus Cycle<sup>®</sup>の測定精度の検証

本検討は、ボランティアとして参加した健康な犬（n=3）を対象とし、日本大学動物病院倫理審査委員会の承認を得て実施した（ANMEC-2019-03）。

Plus Cycle<sup>®</sup>を対象犬の首輪に装着し（図 1-1A）、運動量、振動数、昇回数、休息・睡眠時間を測定した。活動量計のエポック長は、前検討と同様に 1 分間とした。運動量は、波形として検出した 3 軸の加速度を合成し、合成波の 1 分間あたりの積分値をアルゴリズムにかけて算出した。振動数は、1 分間に加速度を検出した回数とした。また、昇回数は気圧センサーを用いて計測し、1 分間に 40cm 以上の気圧変化を検出した回数とした。測定した活動量データと実際の動物の動きを比較することで、Plus Cycle<sup>®</sup>の測定精度を評価した。

犬における運動量および振動数の測定精度は、通常の地面での歩行と、トレッドミル上での歩行を行って検証し、両者の比較も実施した。その際には、それぞれ時速 3km と時速 5km で 5 分間歩行させ、運動量と振動数を計測した（図 1-2A）。Plus Cycle<sup>®</sup>からダウンロードしたデータを Excel<sup>®</sup>（Microsoft Corporation, Washington, U.S.A.）に取り込み、歩行様式および速度による運動量と振動数の変化を検討した。

昇回数の測定精度を検証するために、40cm 以上の段差をジャンプさせた（図 1-3A）。次いで、活動量計の計測値と観察者が肉眼で計測した昇回数を比較することで、Plus Cycle<sup>®</sup>による昇回数の測定精度を評価した。

休息・睡眠時間の測定精度を検証するために、午前 0 時から午前 8 時までの様子をビデオカメラで撮影し、1 分間ごとに行動を記録した（図 1-4A）。ケージ

内で立ち上がっている、歩いている、遊んでいる、水を飲んでいる状態は覚醒状態として記録した。一方、横臥位もしくは伏臥位でじっとしている、寝ている状態を休息・睡眠状態とした。次いで、Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した活動量と実際の犬の行動を比較することで、休息・睡眠時間の測定精度を評価した。

### 1.2.3 猫における Plus Cycle<sup>®</sup>の測定精度の検証

本検討は、ボランティアとして参加した健康な猫 (n=6) を対象とし、日本大学動物病院倫理審査委員会の承認を得て実施した (ANMEC-2019-03)。

Plus Cycle<sup>®</sup>を対象猫の首輪に装着し (図 1-1B)、運動量、振動数、昇回数、休息・睡眠時間を測定した。Plus Cycle<sup>®</sup>の設定は前述した犬における検証と同様のものとした。

運動量と振動数の測定精度を検証するために、対象猫を 3.6×2.4m の部屋で 1 時間自由に行動させ、運動量と振動数を計測した。部屋には 2 台のビデオカメラを対角線上に設置して猫の行動を撮影し、撮影した映像をもとに移動した距離と移動に要した時間を 1 分間毎に記録した (図 1-2B)。Plus Cycle<sup>®</sup>からダウンロードしたデータを Excel<sup>®</sup>に取り込み、動画の解析データと比較することで、活動量と移動距離および時間との相関関係を調査した。

猫における昇回数と休息・睡眠時間の測定精度は、前述した犬での検証と同

様の方法で実施した（図 1-3B, 1-4B）。

#### 1.2.4 一般家庭で飼育されている犬の活動量および休息・睡眠時間の分析

本検討は、一般家庭で飼育されている 1 歳齢以上の犬を対象とし、日本大学動物病院倫理審査委員会の承認を得て実施した（ANMEC-2019-03）。

Plus Cycle<sup>®</sup>を対象動物の首輪に 3 週間装着し、運動量、振動数、昇回数、休息・睡眠時間を測定した。得られたデータをもとに 1 日の平均を算出し、性別、年齢、時間帯（昼間と夜間）の 3 項目において比較を行った。休息・睡眠時間は、1 分間あたりの運動量および振動数がともに 0 と計測された時間の積算値とした。本検討では、午前 6 時から午後 11 時 59 分までを昼間、午前 0 時から午前 5 時 59 分までを夜間と設定して検討を行った。

#### 1.2.5 一般家庭で飼育されている猫の活動量および休息・睡眠時間の分析

本検討は、一般家庭で飼育されている 1 歳齢以上の猫を対象とし、日本大学動物病院倫理審査委員会の承認を得て実施した（ANMEC-2019-03）。

Plus Cycle<sup>®</sup>を対象動物の首輪に 3 週間装着し、運動量、振動数、昇回数、休息・睡眠時間を測定した。猫においても、前述した犬での分析と同様の方法で比較検討を実施した。

### 1.2.6 OA に罹患した犬と猫の活動量および休息・睡眠時間の評価

本検討は、ボランティアとして参加した犬と猫において X 線検査を行い、OA が認められた症例を対象に行った。本検討は、日本大学動物病院倫理審査委員会の承認を得て実施した (ANMEC-2019-03)。

Plus Cycle<sup>®</sup>を対象動物の首輪に 3 週間装着し、運動量、振動数、昇回数、休息・睡眠時間を測定した。得られたデータをもとに 1 日の平均を算出し、一般家庭で飼育されている犬と猫から収集した基礎データと比較した。

### 1.2.7 統計学的解析

本検討で得られたデータは、全て平均値±標準偏差で示した。統計学的解析には、データ解析ソフト (GraphPad Prism version 6.0 for Macintosh, GraphPad Software Inc., San Diego, California, U.S.A) を使用した。Plus Cycle<sup>®</sup>と Actical<sup>®</sup>で計測したデータの相関関係、Plus Cycle<sup>®</sup>の活動量データと移動距離および時間の相関関係、Plus Cycle<sup>®</sup>を用いて計測した各項目のデータと年齢の相関関係を調査するために、ピアソンの積立相関係数 (Pearson product-moment correlation coefficient) を算出した。また、Plus Cycle<sup>®</sup>の活動量データの歩行速度および歩行様式による比較、Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した昇回数と実測値の比較、Plus Cycle<sup>®</sup>を用

いて計測した各項目のデータの性別による比較を行うために、Mann-Whitney 検定を使用した。覚醒時と休息・睡眠時の活動量データを区別するために、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いて、活動量と振動数の最適なカットオフ値を決定した。そして、感度、特異度、area under the receiver operating characteristic curve (AUC) を算出し、覚醒状態と休息・睡眠状態との判別精度を評価した。

A



B



図 1-1 Plus Cycle®の装着方法  
(A) 犬の首輪に装着した様子  
(B) 猫の首輪に装着した様子



A



B



図 1-2 運動量および振動数の測定精度の検証方法

- (A) 犬では、時速 3km と 5km で通常の地面およびトレッドミル上での歩行を実施し、Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した活動量の歩行速度と歩行様式による変化を検討した。
- (B) 猫では、2 台のカメラを部屋の対角線上に設置し、行動を記録した。その後、Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した活動量と記録した行動の相関関係を調査した。

A



B



図 1-3 昇回数の測定精度の検証方法

40cm 以上の段差をジャンプさせ、実際の昇回数と Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した昇回数を比較した。

(A) 犬で実施している時の様子

(B) 猫で実施している時の様子

A



B



図 1-4 休息・睡眠時間の測定精度の検証方法

午前 0 時から午前 8 時までの動物の様子をビデオカメラで記録し、実際の動物の動きと Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した活動量を比較した。

(A) 犬で実施している時の様子

(B) 猫で実施している時の様子

## 1.3 結果

### 1.3.1 Actical®と Plus Cycle®の比較

対象となった 10 頭の犬の平均年齢は  $7.2 \pm 4.3$  歳齢で、平均体重は  $9.1 \pm 6.5\text{kg}$  であった。性別は、去勢雄が 3 頭、不妊雌が 6 頭、未不妊雌が 1 頭であった。犬種は、ミニチュア・ダックスフンドが 6 頭、シベリアン・ハスキーが 2 頭、トイ・プードルおよび雑種が各 1 頭であった。

対象となった 10 頭の猫の平均年齢はそれぞれ  $5.0 \pm 2.2$  歳齢で、平均体重は  $4.6 \pm 1.4\text{kg}$  であった。性別は、去勢雄が 3 頭、不妊雌が 7 頭であった。猫種は、日本家猫が 7 頭、ヨーロピアン・ショートヘアが 3 頭であった。

Actical®と Plus Cycle®を用いて、1,440 分間の活動量データを連続的に取得した (表 1-1)。Total activity を評価したところ、Actical®と Plus Cycle®から得られたデータには、犬と猫それぞれにおいて非常に強い正の相関関係 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.97$ ;  $p < 0.05$ ,  $r = 0.89$ ) が認められた (図 1-5A, C)。また、2 つのデバイス間の Activity intensity についても同様に、犬と猫それぞれにおいて強い正の相関関係 ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.79$ ;  $p < 0.05$ ,  $r = 0.78$ ) があることが示された (図 1-5B, D)。

### 1.3.2 犬における Plus Cycle®の測定精度の検証

本検討に用いた 3 頭の犬の平均年齢は  $5.1 \pm 4.7$  歳齢で、平均体重は  $23.2 \pm$

2.1kgであった。性別は、去勢雄が2頭、不妊雌が1頭であった。犬種は、ラブラドル・レトリバーが1頭で、雑種が2頭であった。

対象犬を通常の地面およびトレッドミル上で時速3kmと5kmにて歩行させたところ、運動量および振動数は歩行速度の上昇に伴って有意に増加した ( $p < 0.05$ )。また、歩行様式による違いは認められず、トレッドミル上でも運動量と振動数を通常の歩行時と同様に計測することができた (図 1-6A, B)。Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した昇回数と実測値の間に有意な差は認められなかった (図 1-6C)。休息・睡眠状態と覚醒状態を判別するために運動量のカットオフ値を算出したところ、カットオフ値は1分間あたり0.5で、感度は95.7%、特異度は95.8%、AUCは0.97であった。振動数に関しては、カットオフ値が1分間あたり0.5で、感度は97.0%、特異度は82.7%、AUCは0.9であった (図 1-7)。

### 1.3.3 猫における Plus Cycle<sup>®</sup>の測定精度の検証

本検討で使用した6頭の猫の平均年齢は  $3.5 \pm 2.1$  歳齢で、平均体重は  $4.7 \pm 0.5$ kg であった。全ての猫が、日本家猫の去勢雄であった。

猫の運動量と移動時間および距離との相関関係を調査したところ、移動時間 ( $p < 0.05, r = 0.72$ ) と移動距離 ( $p < 0.05, r = 0.80$ ) のいずれにおいても有意な正の相関があることが明らかになった (図 1-8A)。また、振動数と移動時間 ( $p <$

0.05,  $r = 0.84$ ) および移動距離 ( $p < 0.05, r = 0.82$ ) においても有意な正の相関が認められた (図 1-8B)。Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した昇回数と実測値の間に有意な差は認められなかった (図 1-8C)。休息・睡眠状態と覚醒状態を判別するために運動量のカットオフ値を算出したところ、カットオフ値は1分間あたり 0.5 で、感度は 95.1%、特異度は 88.4%、AUC は 0.93 であった。振動数に関しては、カットオフ値が1分間あたり 0.5 で、感度は 98.6%、特異度は 56.4%、AUC は 0.78 であった (図 1-9)。

#### 1.3.4 一般家庭で飼育されている犬の活動量および休息・睡眠時間の分析

本検討の対象となった犬は 75 頭で、平均年齢は  $8.4 \pm 5.0$  歳齢であった。性別は、雄が 39 頭、雌が 36 頭であった。本検討では、一般家庭で飼育されている犬の不妊と去勢の有無についてはデータを得ることができなかった。犬種は、チワワが 13 頭、ミニチュア・ダックスフンドが 12 頭、柴犬が 11 頭、トイ・プードルが 4 頭、プードルが 3 頭、ゴールデン・レトリバーが 2 頭、シベリアン・ハスキーが 2 頭、ビーグルが 2 頭、ポメラニアンが 2 頭であり、アメリカン・コッカー・スパニエル、キャバリア・キング・チャールズ・スパニエル、キング・チャールズ・スパニエル、シー・ズー、シェットランド・シープドッグ、狽、日本スピッツ、パグ、パピヨン、フレンチ・ブルドッグ、ボロニーズ、ミニチュア・

シュナウザー、ラブラドル・レトリバーが各1頭であった。

1日の平均活動量を性別によって比較したところ、運動量、振動数、昇回数  
いずれにおいても差は認められなかった(図1-10)。年齢との相関関係を調査し  
たところ、運動量( $p=0.72, r=-0.04$ )、振動数( $p=0.74, r=-0.04$ )、昇回数( $p<$   
 $0.05, r=-0.28$ )は加齢に伴い減少する傾向が認められた(図1-11)。休息・睡眠  
時間に関しては、1日の合計の休息・睡眠時間( $p=0.61, r=0.06$ )と昼間の休息・  
睡眠時間( $p=0.53, r=0.08$ )が高齢になるにつれて増加する傾向が認められた。  
一方で、夜間の休息・睡眠時間( $p=0.89, r=-0.02$ )はほとんど変化しなかった  
(図1-12)。

### 1.3.5 一般家庭で飼育されている猫の活動量および休息・睡眠時間の分析

本検討の対象となった猫は71頭で、平均年齢は $6.6\pm 5.4$ 歳齢であった。性別  
は、雄が38頭、雌が33頭であった。本検討では、一般家庭で飼育されている猫  
の不妊と去勢の有無についてはデータを得ることができなかった。猫種は、日本  
家猫が47頭、スコティッシュ・フォールドが3頭、ジャパニーズ・ボブテイル  
が2頭、トンキニーズが2頭含まれており、アメリカン・ボブテイル、ミヌエッ  
ト、マンチカン、ノルウェージャン・フォレスト・キャット、オリエンタル、ラ  
グドール、ロシアン・ブルーが各1頭であった。

1日の平均活動量を性別によって比較したところ、運動量、振動数、昇回数  
いずれにおいても差は認められなかった（図 1-13）。年齢との相関関係を調査し  
たところ、猫も犬と同様の傾向があり、犬よりも明瞭に運動量（ $p < 0.05$ ,  $r = -$   
0.32）、振動数（ $p = 0.12$ ,  $r = -0.2$ ）、昇回数（ $p < 0.05$ ,  $r = -0.26$ ）が加齢に伴って減  
少していた（図 1-14）。休息・睡眠時間に関しては、1日の合計の休息・睡眠時  
間（ $p < 0.05$ ,  $r = 0.45$ ）と昼間の休息・睡眠時間（ $p < 0.05$ ,  $r = 0.41$ ）は高齢になる  
につれて有意に増加していた。また、夜間の休息・睡眠時間は高齢になるにつれ  
て有意に増加していたが（ $p < 0.05$ ,  $r = 0.25$ ）、1日の合計および昼間の休息・睡  
眠時間と異なり変化の幅は非常に小さかった（図 1-15）。

### 1.3.6 OA に罹患した犬と猫の活動量および睡眠時間の評価

本検討では、OA に罹患した犬と猫の活動量および休息・睡眠時間のデータを取  
得したが、年齢によって各パラメーターが変動してしまうため、OA に罹患し  
た高齢の犬と猫の各 1 例を用いて検討を行った。

本検討の対象となった犬は、15 歳齢のラブラドル・レトリバーの去勢雄  
であった。本症例は、臨床的に健康上の問題は存在しなかったが、X 線検査によ  
って肘関節と股関節に OA が認められた。一方、対象となった猫は、16 歳齢の  
日本家猫の去勢雄であった。本症例も、臨床的に健康上の問題は存在しなかつ



が、X線検査で肘関節にOAが認められた。

OAに罹患した犬から得られたデータを同年代の基礎データと比較したところ、運動量、振動数、昇回数すべてが顕著に減少していた（図 1-16）。また、1日の合計と昼間の休息・睡眠時間は増加する傾向が認められた（図 1-16）。

OAに罹患した猫においても犬と同様の傾向があり、運動量、振動数、昇回数のすべてが顕著に減少し（図 1-17）、1日の合計と昼間の休息・睡眠時間が増加する傾向が認められた（図 1-17）。

表 1-1 Plus Cycle<sup>®</sup>および Actical<sup>®</sup>を用いて得られた Total activity と Activity intensity の概要

**A**

	Total activity		Activity intensity	
	Plus Cycle <sup>®</sup>	Actical <sup>®</sup>	Plus Cycle <sup>®</sup>	Actical <sup>®</sup>
最小値	4964.00	55579.00	0.00	0.00
最大値	31505.00	1062481.00	63.00	7759.00
平均値	11073.60	213954.90	7.50	138.80
標準偏差	7546.16	305237.69	13.15	469.42
相関係数	0.97		0.79	

**B**

	Total activity		Activity intensity	
	Plus Cycle <sup>®</sup>	Actical <sup>®</sup>	Plus Cycle <sup>®</sup>	Actical <sup>®</sup>
最小値	3820.00	23651.00	0.00	0.00
最大値	10012.00	91664.00	63.00	2455.00
平均値	7320.10	60238.00	5.08	41.83
標準偏差	1734.38	23422.14	8.79	128.97
相関係数	0.89		0.78	

(A) 犬におけるデータの概要

(B) 猫におけるデータの概要

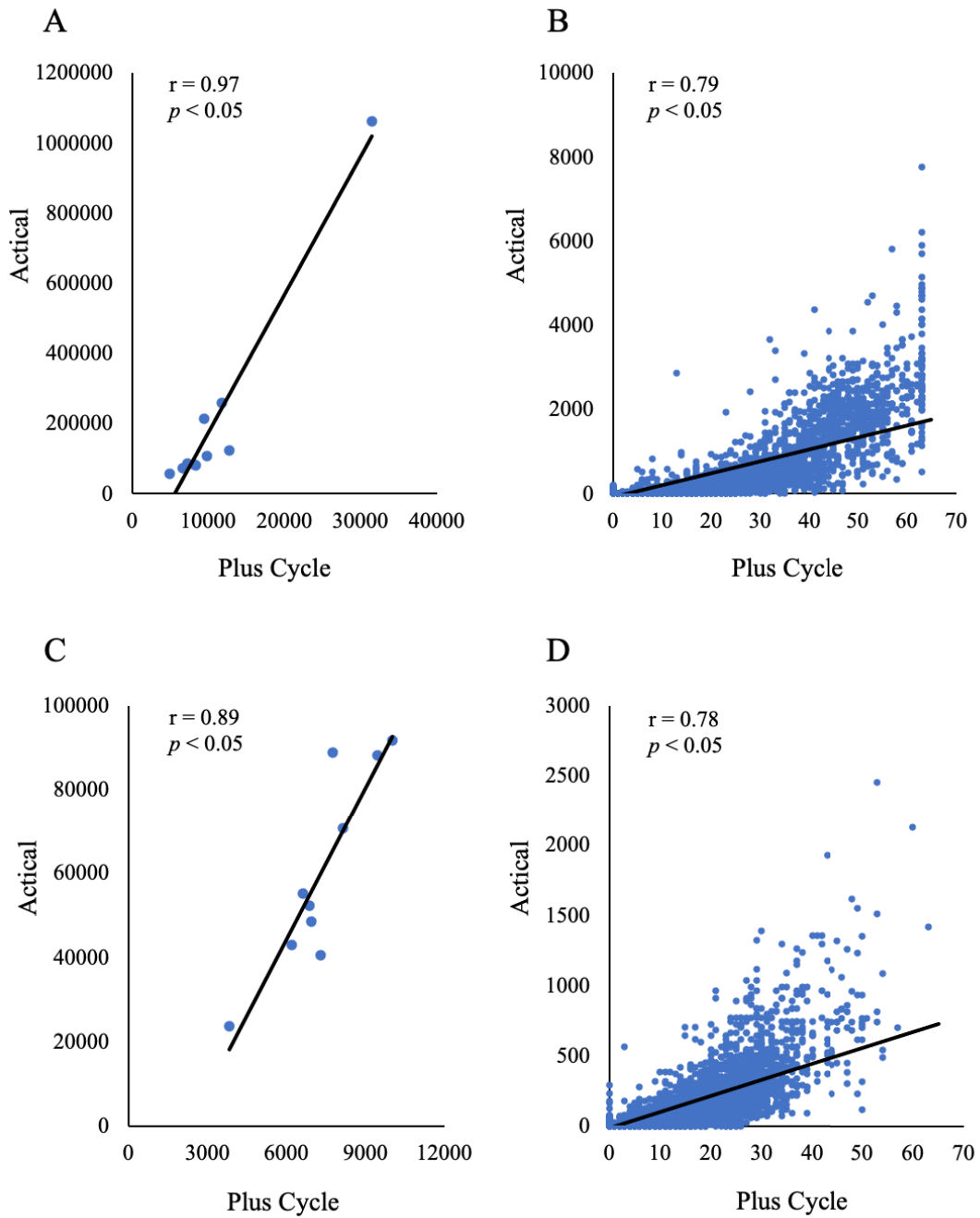


図 1-5 Plus Cycle<sup>®</sup>および Actical<sup>®</sup>を用いて計測したデータの相関関係を示した散布図

- (A) 犬における Total activity の相関関係
- (B) 犬における Activity intensity の相関関係
- (C) 猫における Total activity の相関関係
- (D) 猫における Activity intensity の相関関係

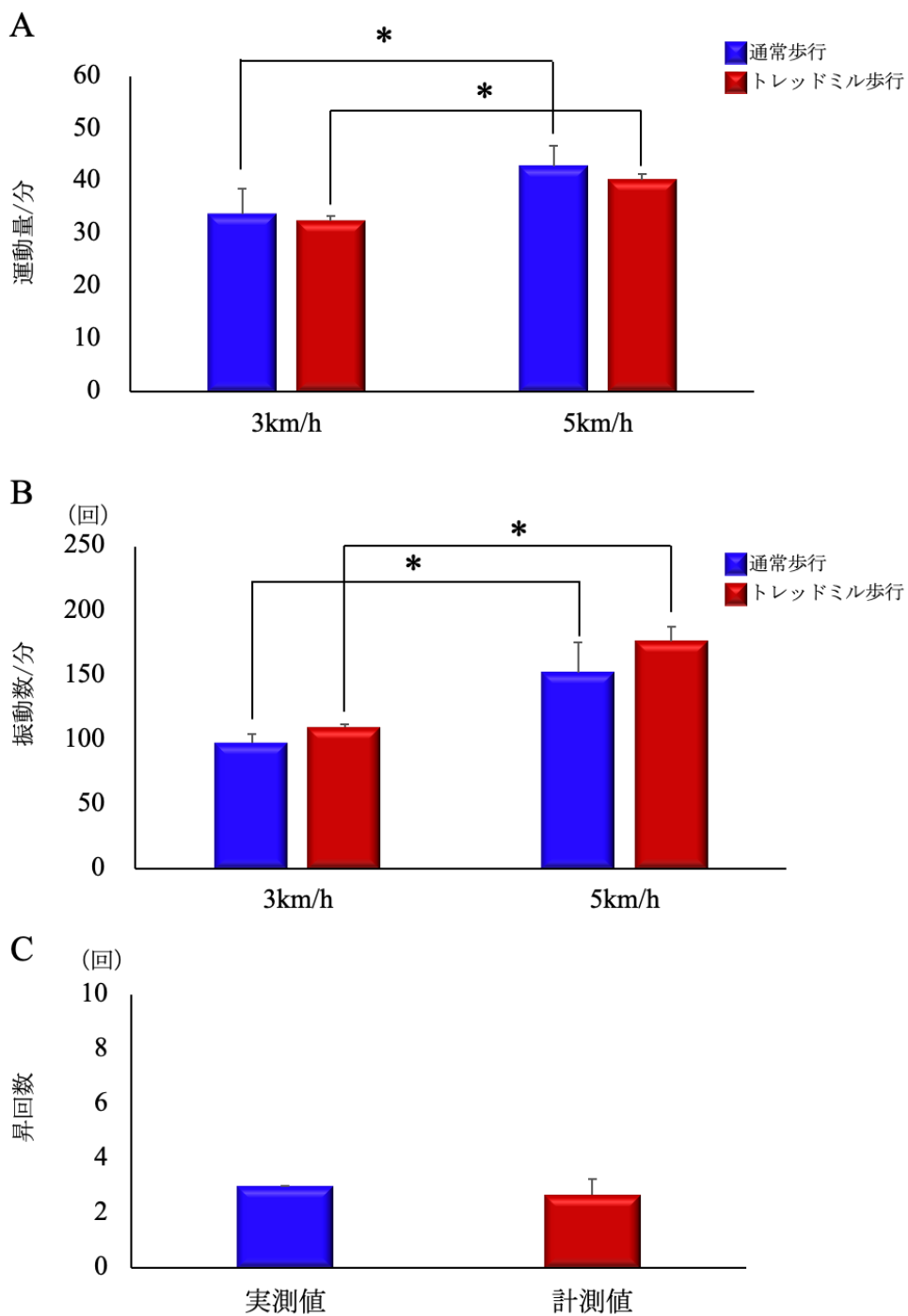


図 1-6 Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した犬の活動量  
 (A) 運動量の歩行速度および歩行様式による比較  
 (B) 振動数の歩行速度および歩行様式による比較  
 (C) 実際の昇回数と Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した昇回数の比較  
 \* : 有意差あり ( $p < 0.05$ )

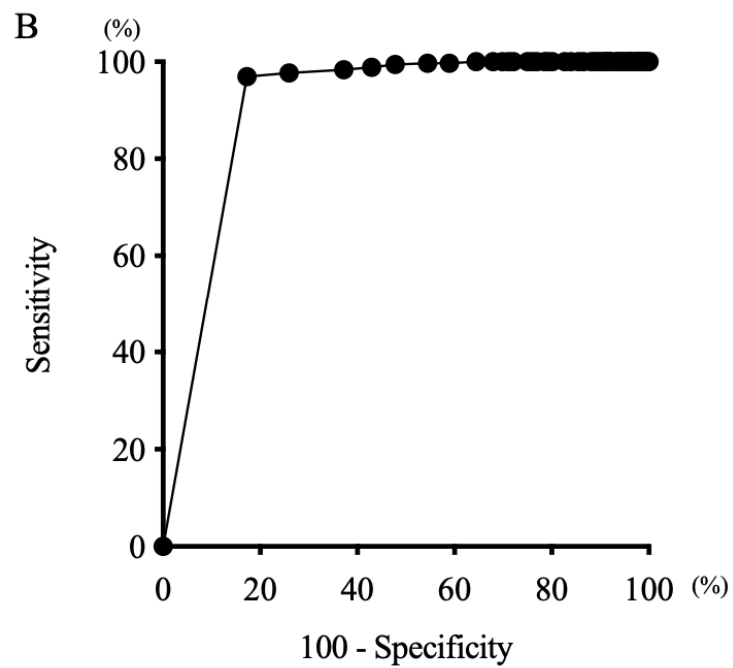
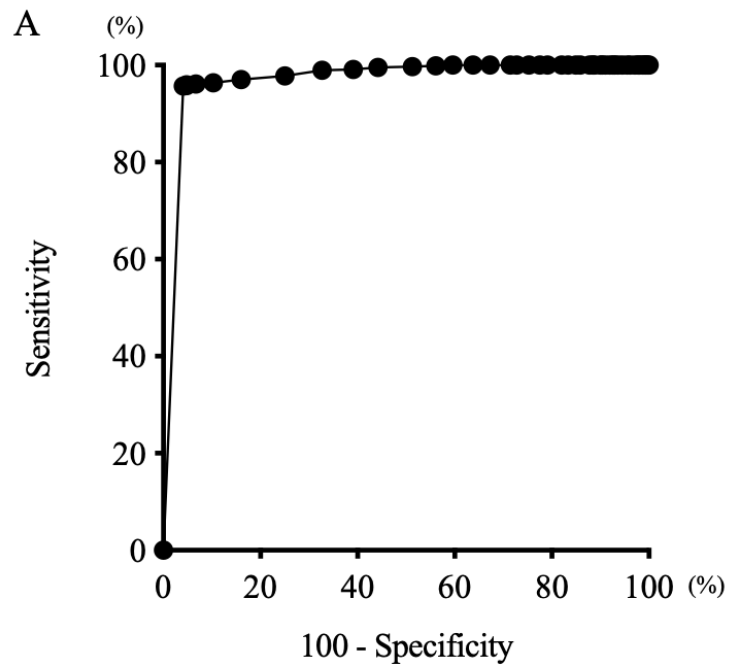


図 1-7 犬の休息・睡眠時間の測定精度を示した ROC 曲線  
 (A) 運動量の ROC 曲線  
 (B) 振動数の ROC 曲線

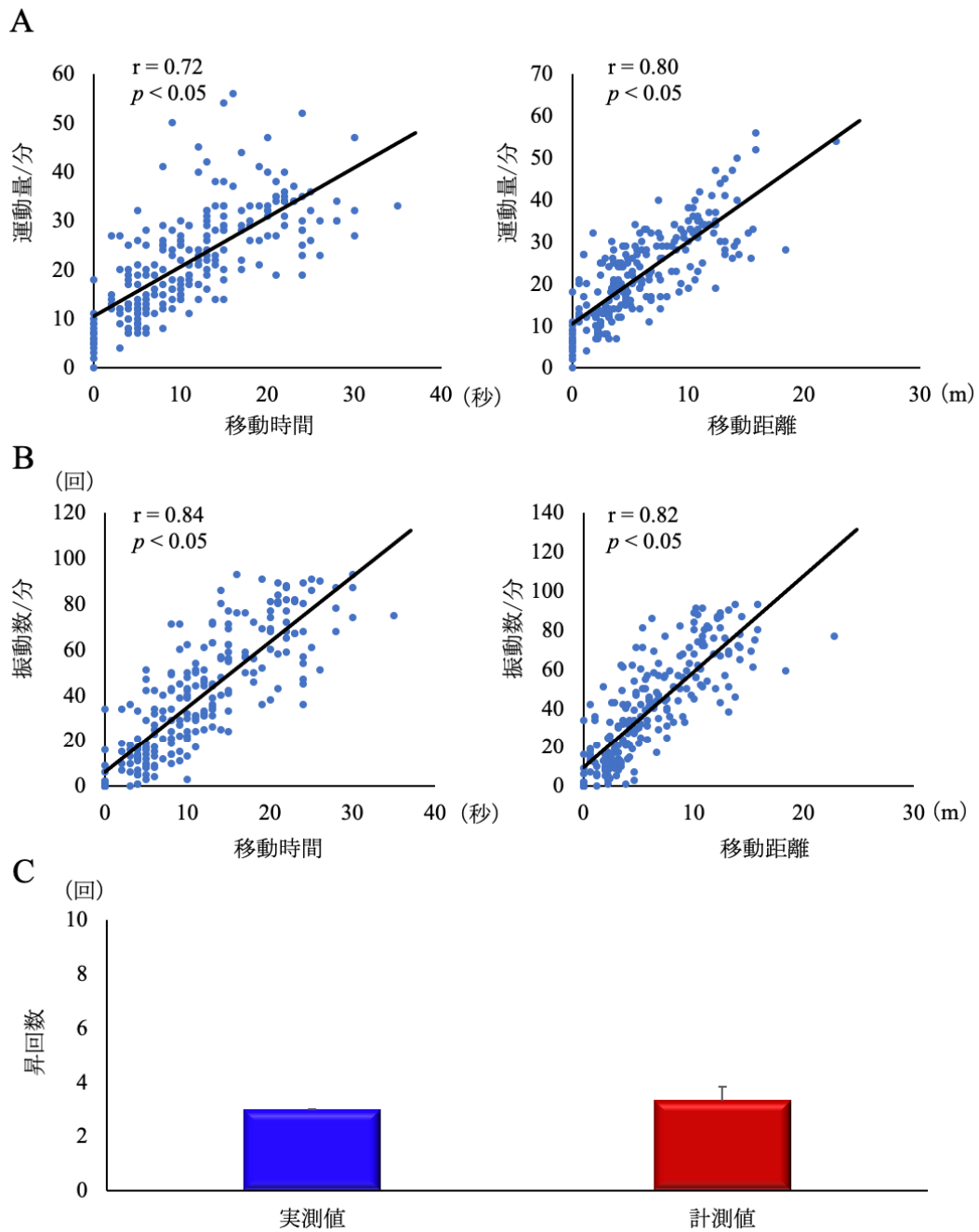


図 1-8 Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した猫の活動量

- (A) 運動量と移動時間および移動距離との相関関係を示した散布図
- (B) 振動数と移動時間および移動距離との相関関係を示した散布図
- (C) 実際の昇回数と Plus Cycle<sup>®</sup>で計測した昇回数の比較

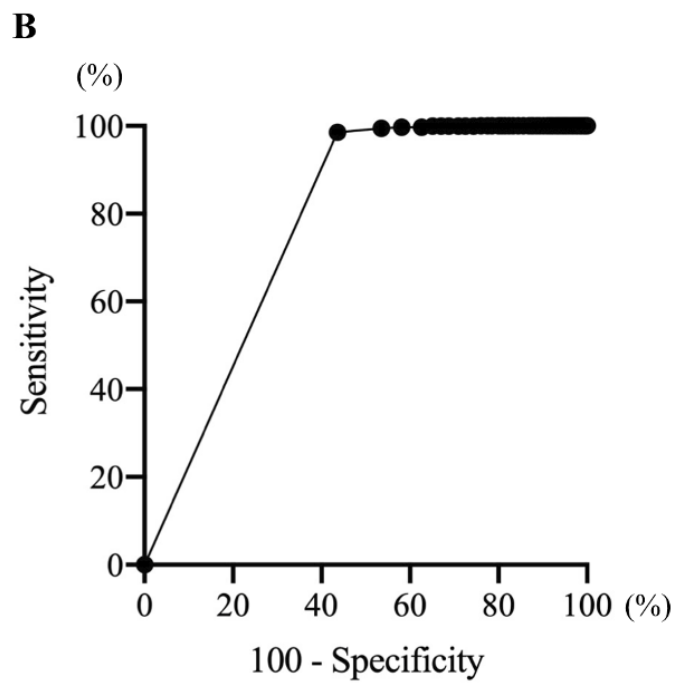
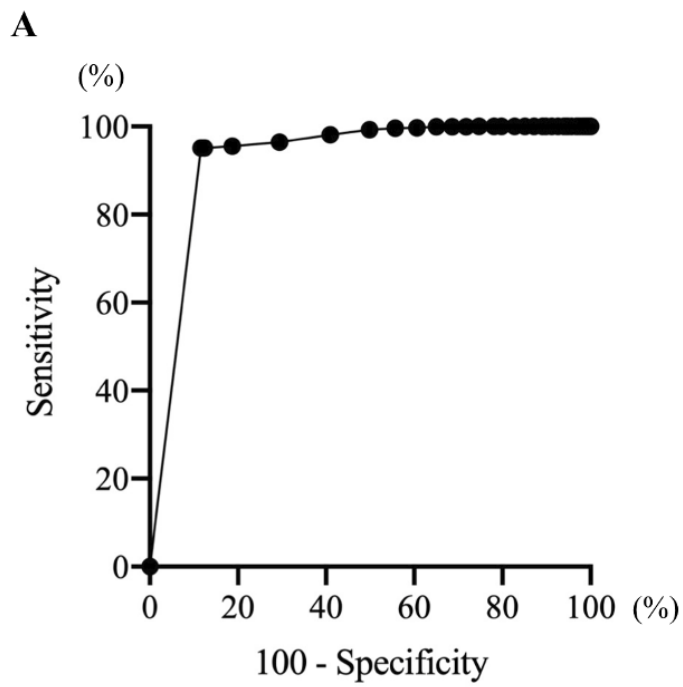


図 1-9 猫の休息・睡眠時間の測定精度を示した ROC 曲線  
 (A) 運動量の ROC 曲線  
 (B) 振動数の ROC 曲線

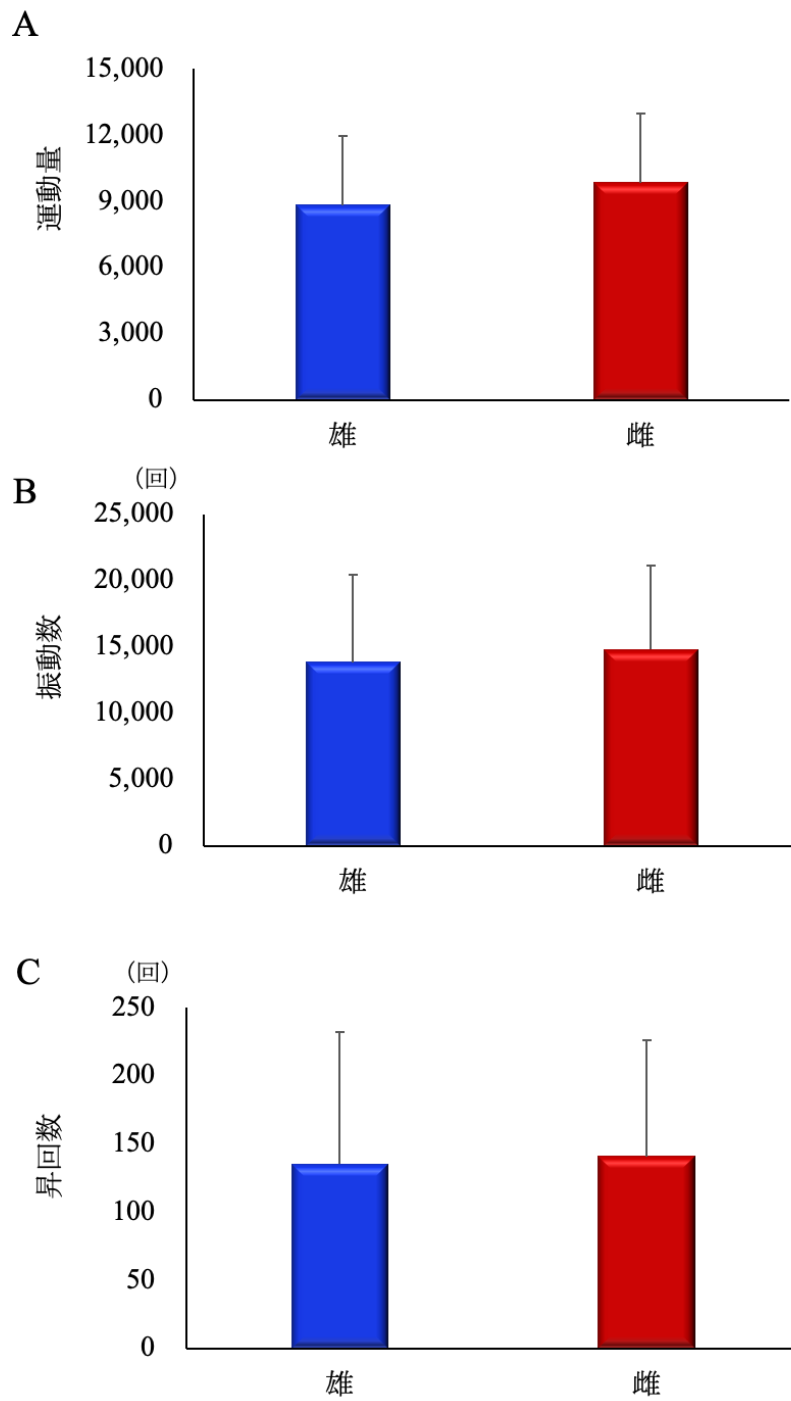


図 1-10 性別による犬の活動量の比較  
 (A) 運動量の性別による比較  
 (B) 振動数の性別による比較  
 (C) 昇回数の性別による比較



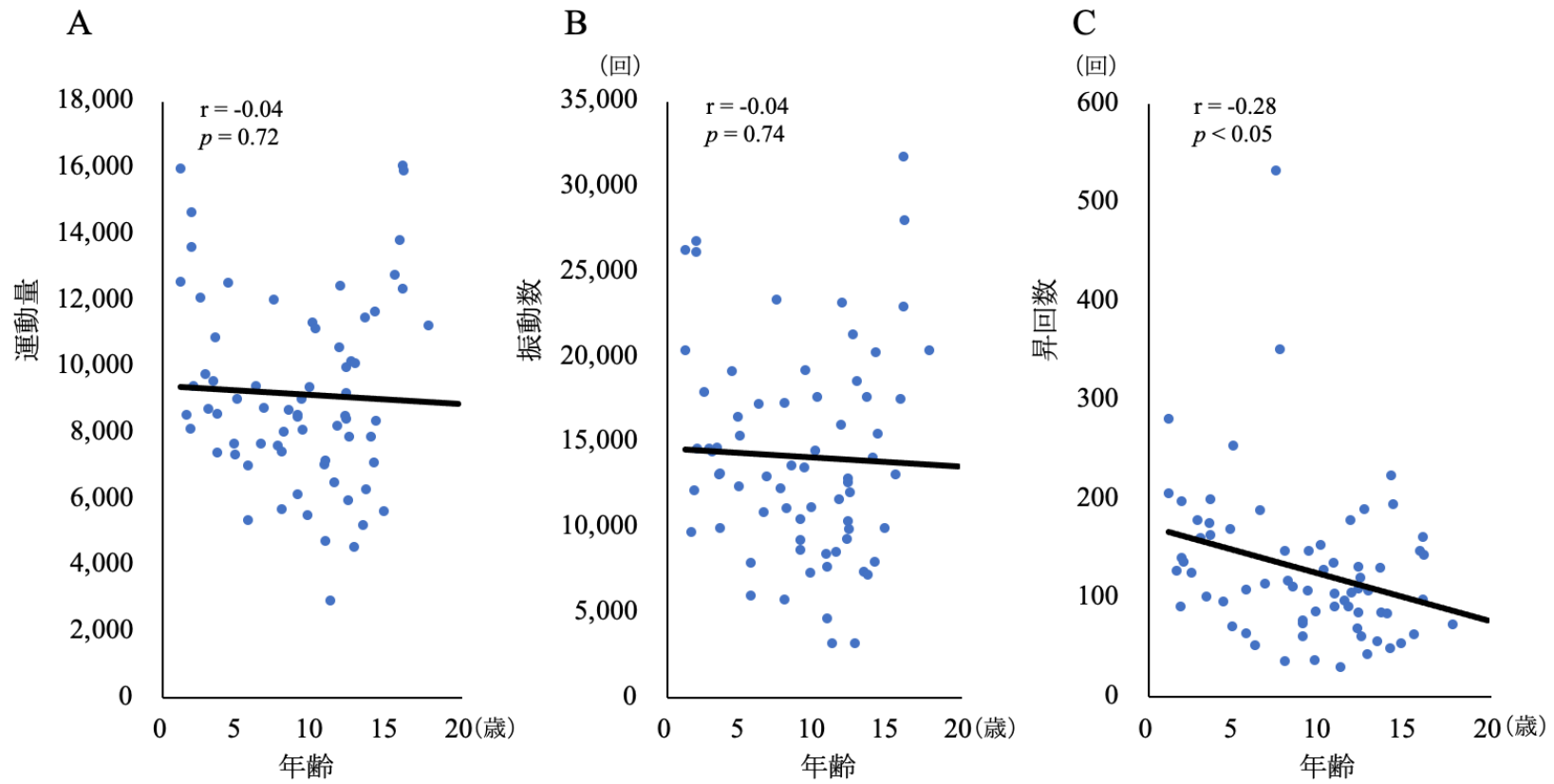


図 1-11 犬の活動量と年齢の相関関係を示した散布図

- (A) 運動量と年齢の相関関係
- (B) 振動数と年齢の相関関係
- (C) 昇回数と年齢の相関関係

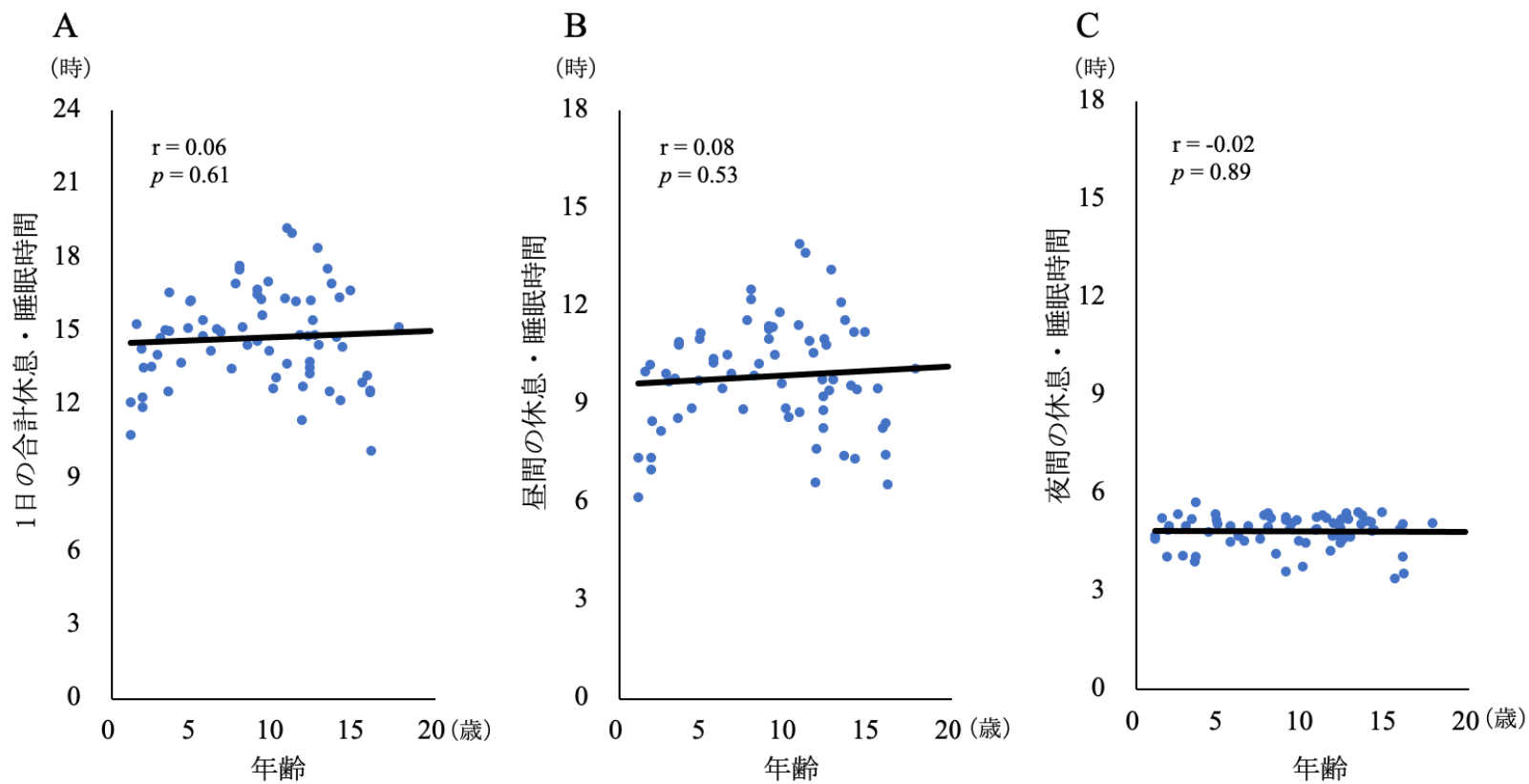


図 1-12 犬の休息・睡眠時間と年齢の相関関係を示した散布図

(A) 1日の合計休息・睡眠時間と年齢の相関関係

(B) 昼間の休息・睡眠時間と年齢の相関関係

(C) 夜間の休息・睡眠時間と年齢の相関関係

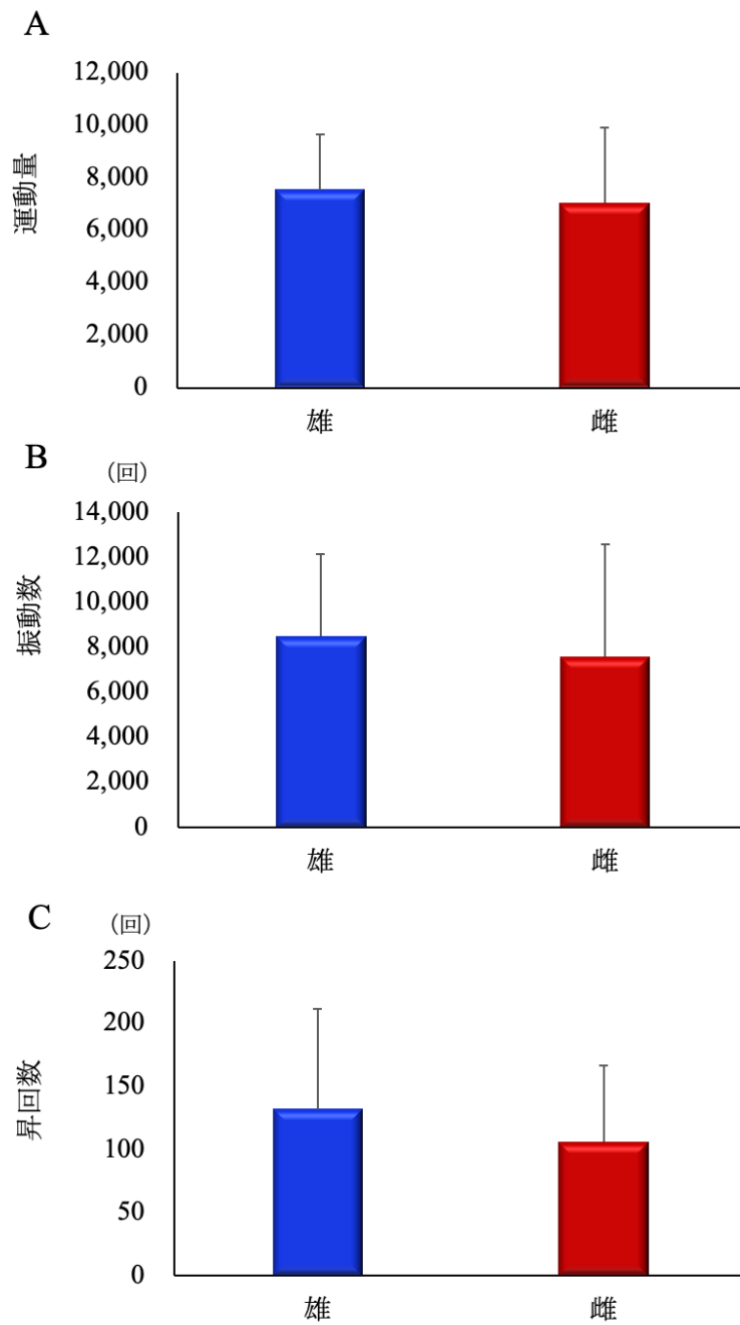


図 1-13 性別による猫の活動量の比較  
 (A) 運動量の性別による比較  
 (B) 振動数の性別による比較  
 (C) 昇回数の性別による比較

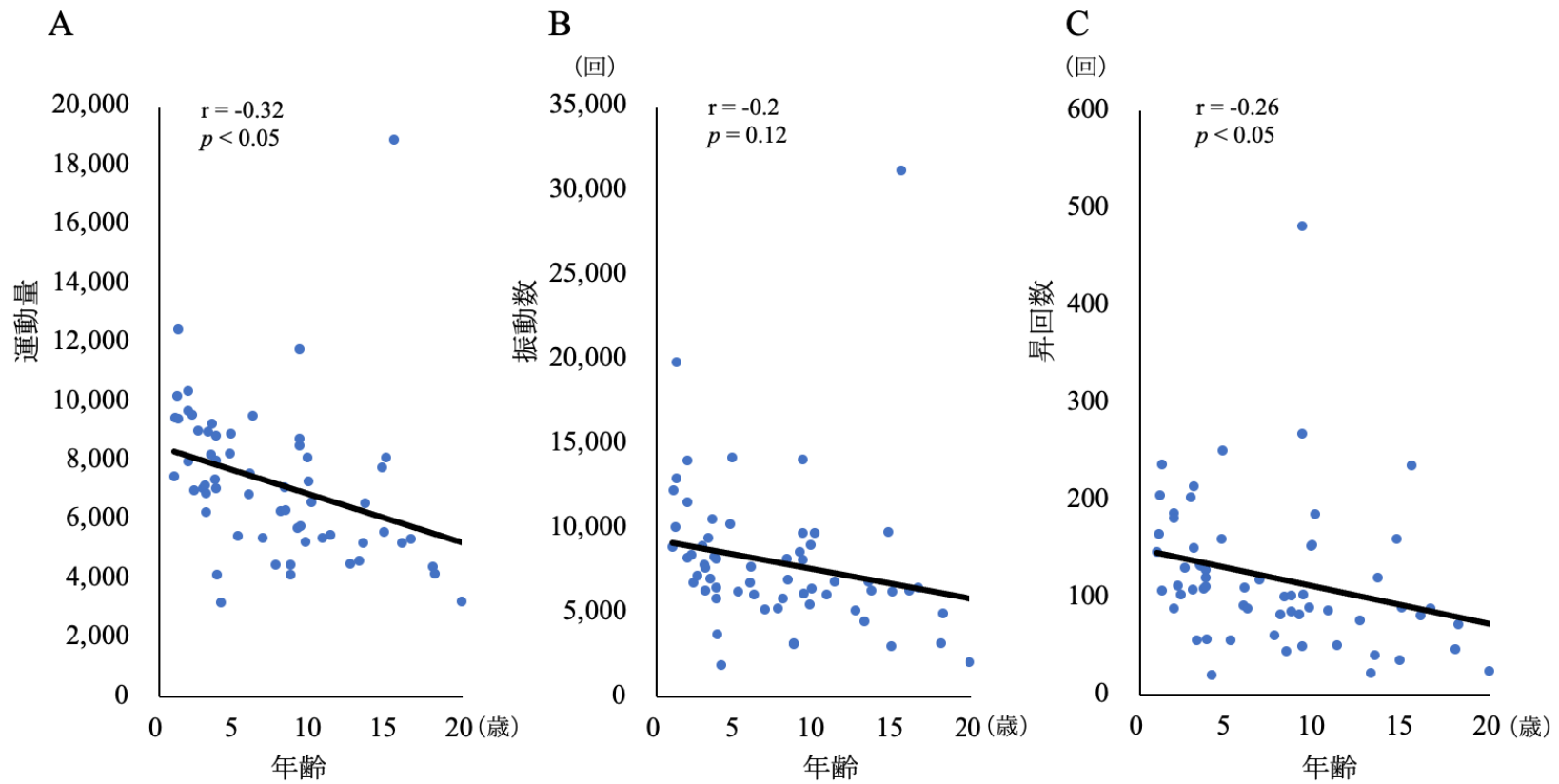


図 1-14 猫の活動量と年齢の相関関係を示した散布図

- (A) 運動量と年齢の相関関係
- (B) 振動数と年齢の相関関係
- (C) 昇回数と年齢の相関関係

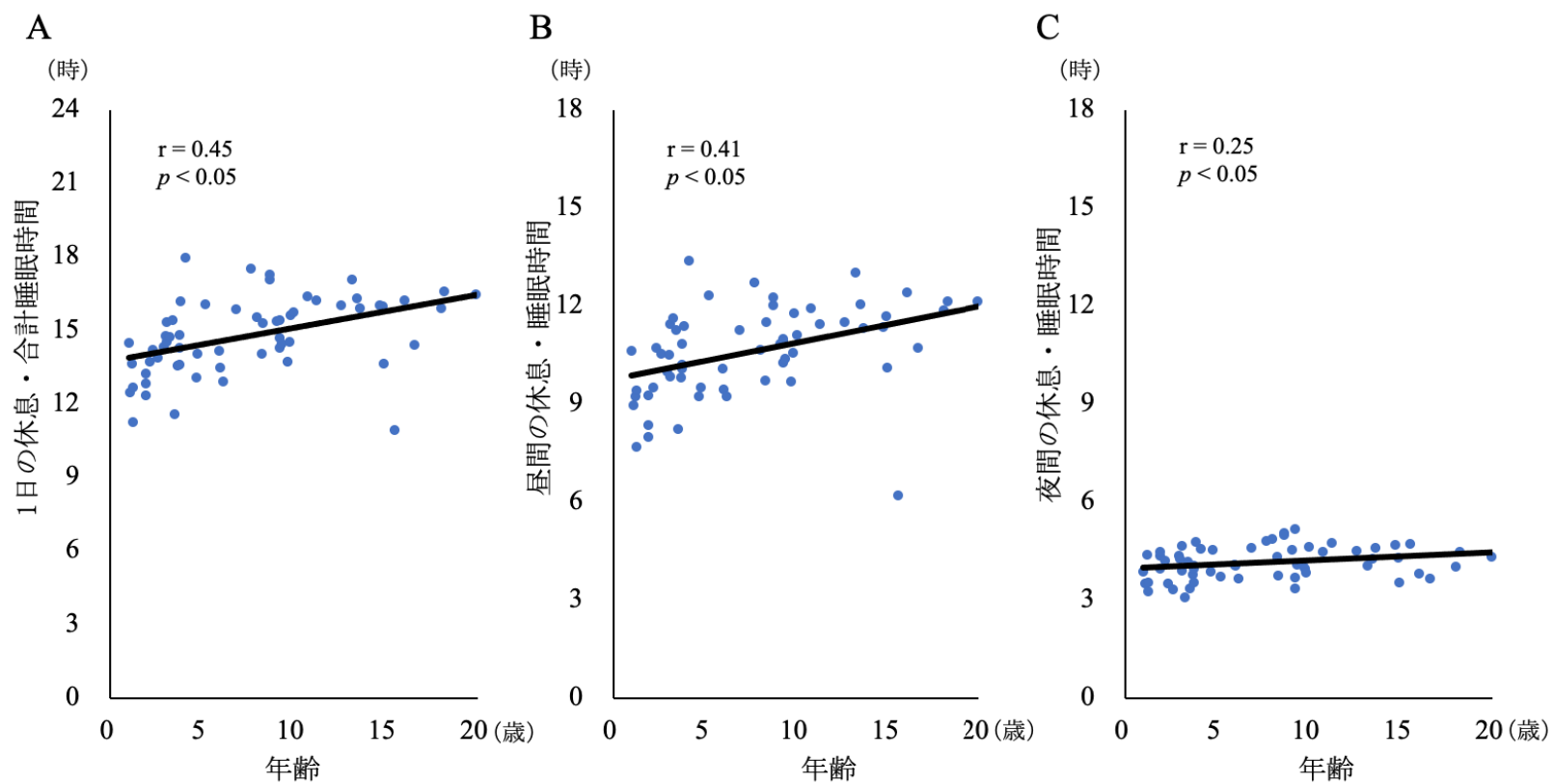


図 1-15 猫の休息・睡眠時間と年齢の相関関係を示した散布図

- (A) 1日の合計休息・睡眠時間と年齢の相関関係
- (B) 昼間の休息・睡眠時間と年齢の相関関係
- (C) 夜間の休息・睡眠時間と年齢の相関関係

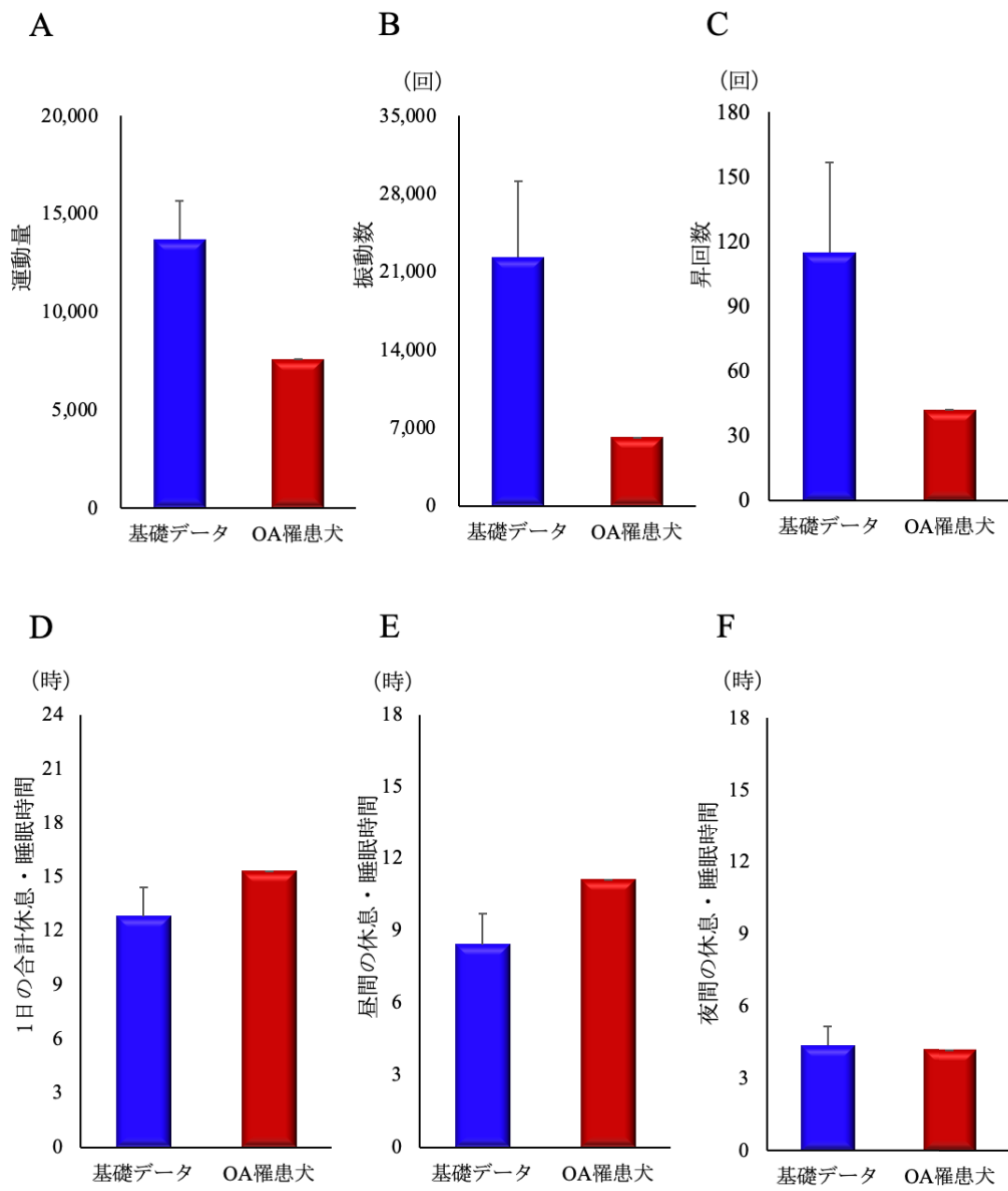


図 1-16 活動量および睡眠時間における OA 罹患犬と基礎データの比較

- (A) 運動量の比較
- (B) 振動数の比較
- (C) 昇回数の比較
- (D) 1日の合計休息・睡眠時間の比較
- (E) 昼間の休息・睡眠時間の比較
- (F) 夜間の休息・睡眠時間の比較

基礎データ：一般家庭で飼育されている 15～17 歳齢の犬の平均値

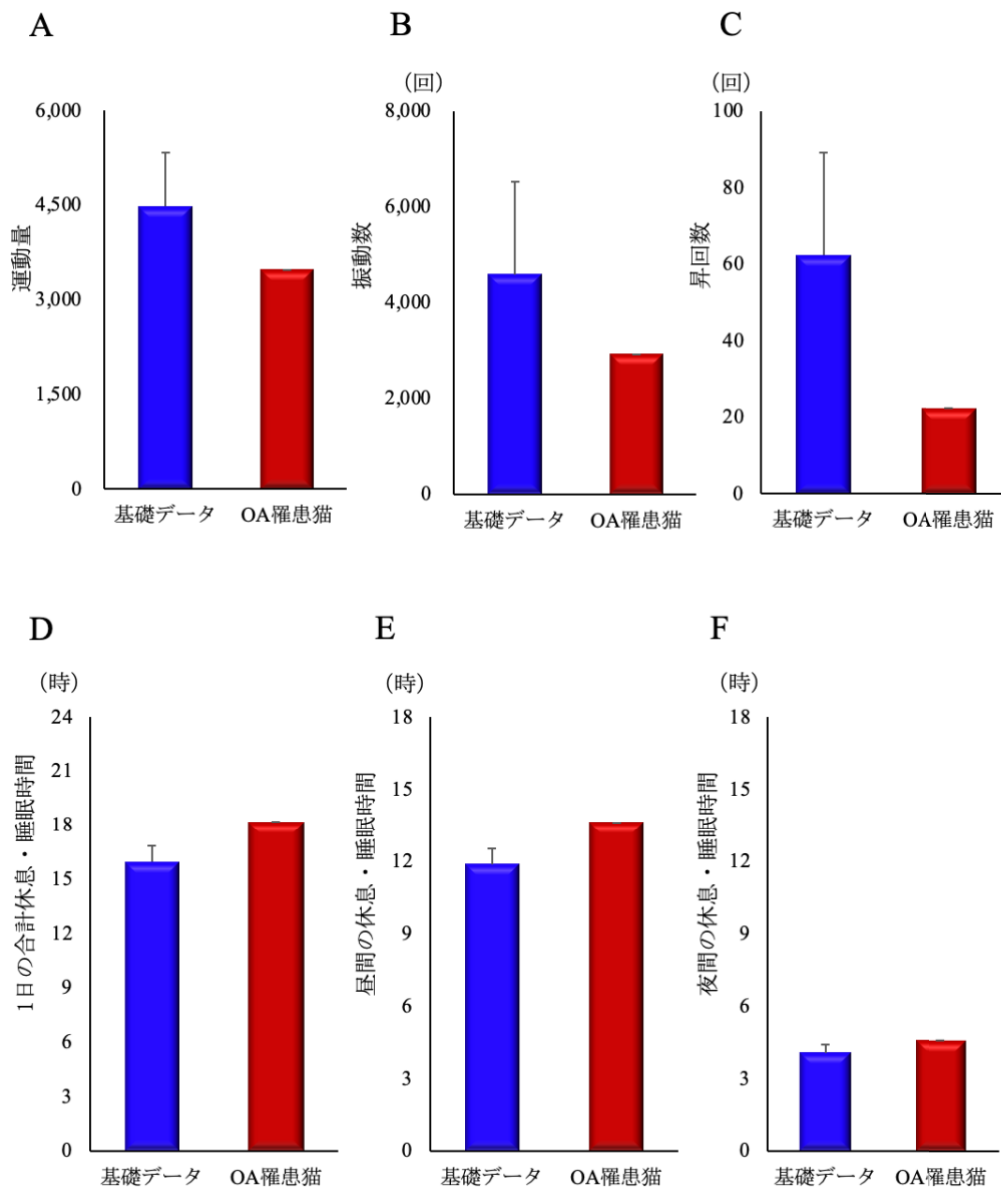


図 1-17 活動量および睡眠時間における OA 罹患猫と基礎データの比較

- (A) 運動量の比較
- (B) 振動数の比較
- (C) 昇回数の比較
- (D) 1日の合計休息・睡眠時間の比較
- (E) 昼間の休息・睡眠時間の比較
- (F) 夜間の休息・睡眠時間の比較

基礎データ：一般家庭で飼育されている 16～19 歳齢の猫の平均値

## 1.4 考察

本検討では、犬と猫での活用を目的に新たに開発された Plus Cycle<sup>®</sup>と、ヒト用のウェアラブルデバイスである Actical<sup>®</sup>を用いて、Total activity および Activity intensity を計測したところ、2つのデバイス間には強い正の相関関係があることが明らかになった。また、健康な犬と猫に Plus Cycle<sup>®</sup>を装着して運動量、振動数、昇回数を計測したところ、活動量を非常に高い精度で定量できることが示された。休息・睡眠状態の判別に関しても、その判別精度はきわめて高いことが示された。一般家庭で飼育されている犬と猫の活動量を計測したところ、どちらも高齢になるにつれて活動量が減少し、犬では昇回数が、猫では運動量と昇回数が有意に減少した。一方、休息・睡眠時間は加齢とともに増加する傾向が認められたが、夜間の休息・睡眠時間に関しては加齢に伴う変化の幅が小さいことが示された。

過去の研究において、犬や猫の行動の変化を検出するために、客観的に活動量を計測できる活動量計が使用されており（Brown *et al.* 2010, Lascelles *et al.* 2007）、これらの研究において最も多く使用されていた活動量計は Actical<sup>®</sup>であった。Actical<sup>®</sup>は、ヒト用の活動量計ではあるが、犬や猫の活動量の計測に使用されており、犬や猫における測定精度も既に検証されている（Hansen *et al.* 2007, Lascelles *et al.* 2008）。また、Actical<sup>®</sup>は、OA に罹患した動物における非ステロイ



ド系消炎鎮痛薬（Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs）の治療効果を評価するためにも用いられている（Brown *et al.* 2010, Lascelles *et al.* 2007）。しかし、Actical<sup>®</sup>は、気圧センサーを内蔵していないため、OA に罹患した猫に最もよく認められる臨床徴候であるジャンプを測定することができない。さらに、Actical<sup>®</sup>のデータ解析ソフトには、休息・睡眠時間を計測する機能は搭載されていない。そこで、3 軸加速度センサーと気圧センサーを内蔵した Plus Cycle<sup>®</sup>が開発された。さらに、この活動量計と連動するアプリケーションには休息・睡眠時間を計測する機能が搭載されている。本検討では、Plus Cycle<sup>®</sup>で計測したデータは、過去に多くの研究で使用されている Actical<sup>®</sup>の計測データと強い相関関係があることが示され、犬と猫の実際の動きを正確に反映していることが明らかとなった。これらの結果から、Plus Cycle<sup>®</sup>が Actical<sup>®</sup>と同様に、犬と猫の活動量を測定することができ、NSAIDs や他の鎮痛薬の治療効果を評価するためにも使用できることが実証された。

犬と猫は、筋骨格系の疾患がなくても、正常な加齢に伴って関節の構成体が劣化し、機能が低下することが報告されている（Bellows *et al.* 2016; Mosier, 1989）。しかし、我々の知る限り、犬と猫の正常な加齢に伴う活動量の変化を客観的に示した報告は存在しない。OA のような筋骨格系の疾患による活動量の減少を検出するためには、正常な加齢に伴う活動量の変化を理解する必要がある。本検討で

は、一般家庭で飼育されている犬と猫の活動量を計測したところ、どちらも高齢になるにつれて活動量が減少し、犬では昇回数が、猫では運動量と昇回数が有意に減少することが明らかになった。本検討により、加齢による正常な運動機能の変化と OA のような筋骨格系疾患による活動量の減少を鑑別するために必要な基礎データを集積することができた。

OA に罹患したヒトと犬では、OA による慢性痛が睡眠を著しく阻害することが報告されている (Knazovicky *et al.* 2015, Woolhead *et al.* 2010)。過去の研究によると、股関節もしくは膝関節の OA に罹患したヒトの 81%は夜間痛を経験しており、この疼痛は睡眠障害につながることを報告されている (Woolhead *et al.* 2010)。OA に罹患した犬においても、疼痛に関連して睡眠障害が引き起こされることが明らかになっている (Knazovicky *et al.* 2015)。OA に罹患した猫では、普段よりも昼間の睡眠時間や休息する時間が長くなることがよく知られている (Lascelles and Robertson, 2010; Zamprogno *et al.* 2010)。本検討では、OA に罹患した犬と猫における休息・睡眠時間の増加が、睡眠障害によるものか、それとも加齢によるものかを判別するために、一般家庭で飼育されている犬と猫の昼間と夜間の休息・睡眠時間を計測した。その結果、加齢に伴って昼間の休息・睡眠時間は増加することが明らかになった。しかし、Plus Cycle<sup>®</sup>で定量した夜間の休息・睡眠時間は、加齢に伴う変化の幅が小さいことが示された。そのため、犬や

猫においても、夜間の睡眠の質を客観的に評価することにより、慢性痛を伴う OA の早期診断に役立つ可能性が示された。

本検討の手法にはいくつかの限界がある。本検討に使用した一般家庭で飼育されている犬と猫は、健康状態や飼育方法の分類がなされておらず、すべての背景を持つ犬と猫が試験対象となっていた。本デバイスの測定精度の検証において、昇回数は気圧センサーを用いて計測し、1 分間に 40cm 以上の気圧変化を検出した回数とした。そのため、40cm 以下のジャンプは昇回数として記録されておらず、大型犬が伏臥位から座位や立位に変化した時の動きを昇回数として記録している可能性もある。また、本デバイスを用いて計測した休息・睡眠時間は、非活動時間を示したものであり、休息と睡眠の状態を完全に反映していないかもしれない。本検討では、各年齢における OA に罹患した犬と猫の症例数は少なかったため、基礎データと OA 罹患症例の比較検討を十分に実施することができなかった。犬と猫の OA の診断に Plus Cycle<sup>®</sup>を活用するためには、各年齢における基準値を設定するなど、さらなる検討が必要である。

本章の結果から、Plus Cycle<sup>®</sup>は、犬と猫の活動量および睡眠の質を客観的かつ正確に計測できることが明らかになった。また、この新しい活動量計は、犬と猫の筋骨格系の健康管理および OA による慢性痛の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

## 2.1 緒言

犬の変形性関節症（Osteoarthritis: OA）の診断は、触診、歩行検査、X線検査によって行うのが一般的であり、OAの存在を確認するために最も重要な検査はX線検査である。OAに罹患している関節では、骨棘の形成、腱または靭帯付着部の骨増殖体、軟骨下骨の硬化症および骨嚢胞といった異常所見がX線画像上に認められる（Innes, 2012）。しかし、このような骨の異常所見はOAがかなり進行してから認められるため、診断時には既に末期の状態であることが多い。また、X線検査を含めた現在の診断方法はすべて主観的であり、感度が低いことも問題として挙げられる。さらに、犬のOAは、他臓器疾患や免疫介在性関節炎とは異なり、血液、尿、関節液などの体液を用いたスクリーニング検査が開発されていないため、臨床の現場において簡便に検査することはできないのが現状である。そのため、日常の診療において簡便に診断が可能で、重症度の判定に有用なバイオマーカーの開発が望まれている。

医学領域では、OAの補助診断として多くのバイオマーカーが使用されており、ヒアルロン酸、II型コラーゲンの分解産物、軟骨オリゴマーマトリックス蛋白質（Cartilage oligomeric matrix protein: COMP）、軟骨基質分解酵素（Matrix metalloproteinase: MMP, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs: ADAMTS）などが既に臨床応用されている（Bay-Jensen *et al.* 2016）。さら

に、OAに罹患した患者においては、その進行に伴って、血液、尿、関節液中のII型コラーゲン三重らせん領域のエピトープ ( $^{108}\text{HRGYPGLDG}^{116}$ : Coll2-1)、II型コラーゲンネオエピトープ (Collagen type II cleavage: C2C)、II型コラーゲン架橋Cテロペプチド (Collagen type II C-terminal cross-linking telopeptide: CTX-II) の濃度が増加することが報告されている (Bay-Jensen *et al.* 2016, Tanishi *et al.* 2014)。このように、特にII型コラーゲンの分解産物がOAのバイオマーカーとして有用であることが見出されている。OAに罹患した患者でバイオマーカーの有用性を検討したレビューによると、2014年4月から2015年5月の期間において、最も使用されていたバイオマーカーのひとつにCTX-IIが挙げられており (Bay-Jensen *et al.* 2016)、OAの診断に有用な軟骨分解マーカーとしてCTX-IIが最も注目されている。

犬の前十字靭帯切断によるOAモデルを用い、切断前後に5種類のバイオマーカーを測定した報告では、犬のOAのバイオマーカーとしてCTX-II、アグリカン、C2Cが有用である可能性が示されている (Matyas *et al.*, 2004)。一方、自然発生のOAに罹患した犬を用いた最近の研究によると、C2Cの臨床的有用性は低いという報告も存在する (Hayashi *et al.*, 2009)。このように、ヒトと犬で共通して有用性が示されているのはCTX-IIであり、その測定は関節軟骨を構成する主要な細胞外基質であるII型コラーゲンの破壊の程度を推測することができ

ることから、犬の OA の診断にも利用できる可能性が高い。しかし、我々が知る限り、自然発生の OA に罹患した犬において、CTX-II の診断価値を検討した研究はひとつも存在しない。

そこで、本検討では、OA に罹患した犬の血清、尿、関節液に含まれる CTX-II を酵素免疫測定法（Enzyme-linked immuno-sorbent assay: ELISA）にて測定し、正常犬での測定値と比較することで、犬の OA を診断するためのバイオマーカーとしての CTX-II の有用性を検討した。

## 2.2 材料および方法

### 2.2.1 対象動物

本検討は、2017 年 4 月から 2018 年 3 月の間に日本大学動物病院に来院し、X 線検査によって膝関節に OA があると診断された犬を対象として行った（OA 群  $n = 11$ ）。一方、整形外科的検査および X 線検査によって整形外科疾患がないことを確認した健康な犬を対照として用いた（正常群  $n = 10$ ）。本検討は、日本大学動物実験委員会の承認を得て実施した（AP17B053）。

### 2.2.2 検体の採取および保存方法

CTX-II 濃度の測定に使用する血清、尿、関節液は、全て同じ日に採取した。

OA 群の関節液は、OA に罹患している膝関節から採取した。一方、正常群の関節液も同様に、膝関節から採取した。血液は、両群ともに、外頸静脈から採取した。採取した血液を血清分離管に入れ、1,000g で 20 分間遠心した後に血清を回収した。尿は、両群ともに、尿カテーテルを用いて膀胱から採取した。採取した尿は 1,000g で 20 分間遠心を行い、上清を回収した。採取した血清、尿、関節液の検体は全て CTX-II 濃度の測定に使用するまで-80 度のディープフリーザーで保管した。

### 2.2.3 CTX-II 濃度の測定

CTX-II 濃度の測定には、犬に特異的な canine CTX-II ELISA kit (My Bio Source, California, U.S.A) を使用した。まず、50 $\mu$ l の標準溶液、検体、検体の希釈液をプレート各ウェルに入れ、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体を全てのウェルに添加し、37 $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートした。次いで、洗浄液を用いてプレートを 4 回洗浄した後に、クロモゲン基質を全てのウェルに加え、37 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした。最後に、停止液を全てのウェルに添加して反応を止め、450nm の波長で吸光度を測定した。血清と関節液の CTX-II 濃度は ng/ml で算出した。また、尿中の CTX-II 濃度は、日内変動を考慮してクレアチニン濃度で補正するため、ng/mg Cre として算出した。



#### 2.2.4 CTX-II 濃度の比較

本検討では、各検体において正常群と OA 群の両群間の CTX-II 濃度を比較した。さらに、関節液中の CTX-II 濃度の測定結果について、性別、年齢（若齢：1～5 歳齢、中齢：6～9 歳齢、高齢：10 歳齢以上）、発症からの経過日数（急性期：1 ヶ月未満、亜慢性期：1 ヶ月～2 ヶ月、慢性期：3 ヶ月以上）、跛行スコア（軽度：0～2、重度：3～5）、X 線検査による OA の重症度（軽度：0～2、重度：3～5）の 5 項目で比較検討を行った。跛行スコアは、過去に報告されている分類を使用し（Millis and Mankin, 2014）、正常な歩行を 0、軽度の跛行を 1、軽度な体重負重性の跛行を 2、重度な体重負重性の跛行を 3、間欠的な非負重性の跛行を 4、連続的な非負重性の跛行を 5 と判定した（表 2-1）。また、X 線検査による膝関節の OA の重症度は、骨棘と関節液貯留の程度に基づいて、0～5 の 6 段階のスコアで評価した（Chuang *et al.* 2014）（表 2-2）。

#### 2.2.5 統計学的解析

得られた全てのデータは、平均値±標準偏差で算出した。統計解析には、統計処理ソフト（GraphPad Prism version 6.0 for Macintosh, GraphPad Software Inc., San Diego, California, U.S.A）を使用した。両群間の比較には Mann-Whitney 検定

を使用し、多群間の比較には Kruskal-Wallis 検定を使用した。また、OA 群においては、CTX-II 濃度と臨床データの相関関係を調査するために、線形回帰分析を実施した。本検討では、 $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

表 2-1 跛行スコアの分類

スコア	状態
0	正常
1	軽度の跛行
2	体重負重性の跛行：軽度
3	体重負重性の跛行：重度
4	間欠的な体重非負重性の跛行
5	連続的な体重非負重性の跛行

表 2-2 X線検査での重症度分類

関節液貯留の重症度スコア		骨棘の重症度スコア	
スコア	状態	スコア	状態
0	正常：貯留なし	0	正常：骨棘なし
1	軽度の貯留	1	軽度の骨棘
2	重度の貯留	2	中等度の骨棘
		3	重度の骨棘

関節液貯留と骨棘の重症度スコアの合計を X線検査での OA の重症度とした。  
 軽度：0～2 重度：3～5

## 2.3 結果

OA 群の平均年齢は  $7.0 \pm 3.5$  歳齢で、平均体重は  $24.4 \pm 12.9$  kg であった。性別は、去勢雄が 5 頭、不妊雌が 6 頭であった。犬種は、ゴールデン・レトリバーが 2 頭、柴犬が 2 頭であり、雑種、サモエド、シベリアン・ハスキー、トイ・プードル、バーニーズ・マウンテン・ドッグ、ブルドック、ラブラドル・レトリバーが各 1 頭であった。OA 群の症例においては、全例で手術時に前十字靭帯が断裂していることを確認した。

正常群の平均年齢は  $2.1 \pm 0.9$  歳齢で、平均体重は  $9.7 \pm 1.0$  kg であった。性別は、未去勢雄が 6 頭、未不妊雌が 4 頭であり、犬種は全てがビーグルであった。

血清、尿、関節液の全ての検体において、OA の有無による CTX-II 濃度の差異を比較したところ、OA 群の関節液中の CTX-II 濃度は正常群よりも有意に高い値を示した (図 2-1)。しかし、OA 群の血清と尿においては、CTX-II 濃度の有意な高値は認められなかった (図 2-1)。そのため、以下の検討は、関節液のみで実施した。

関節液中の CTX-II 濃度は、雄雌ともに正常群よりも OA 群において有意に高い値を示した (図 2-2)。年齢で比較したところ、若齢 (1~5 歳齢) と中齢 (6~9 歳齢) の OA 罹患症例における関節液中の CTX-II 濃度は、正常群よりも有意に高い値を示した (図 2-3)。高齢 (10 歳齢以上) の OA 罹患症例にお

ける CTX-II 濃度も、正常群より高い傾向が認められたが、正常群との間に有意差は認められなかった (図 2-3)。跛行スコアに関しては、軽度 (0~2) と重度 (3~5) の OA 罹患症例における CTX-II 濃度は、いずれにおいても正常群より有意に高い値を示した (図 2-4)。また、OA が発症してからの経過日数が少ない急性期 (1 ヶ月未満) の症例や、X 線検査での OA の重症度が軽度 (0~2) な症例においても、正常群より有意に高い CTX-II 濃度を示した (図 2-5, 2-6)。

関節液中の CTX-II 濃度と年齢 ( $r = -0.25$ ,  $p = 0.12$ )、跛行スコア ( $r = -0.001$ ,  $p = 0.91$ )、X 線検査による OA の重症度 ( $r = -0.06$ ,  $p = 0.46$ ) との間には有意な相関関係は認められなかったが、CTX-II 濃度と OA が発症してからの経過日数との間には、有意な負の相関関係が認められた ( $r = -0.38$ ,  $p < 0.05$ ) (図 2-7)。

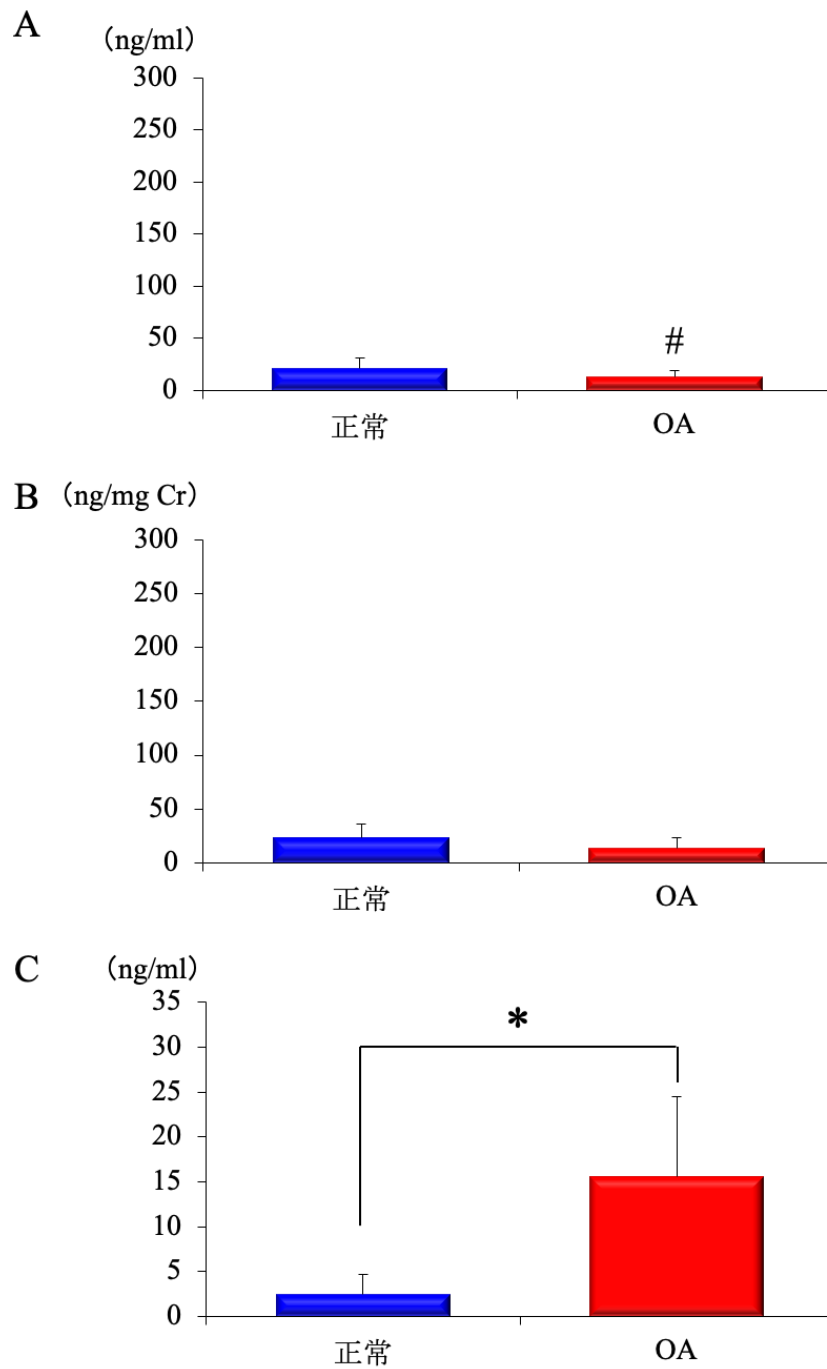


図 2-1 正常群と OA 群の各検体における CTX-II 濃度

(A) 血清の CTX-II 濃度の比較

(B) 尿の CTX-II 濃度の比較

(C) 関節液の CTX-II 濃度の比較

\*, #: 有意差あり ( $p < 0.05$ )

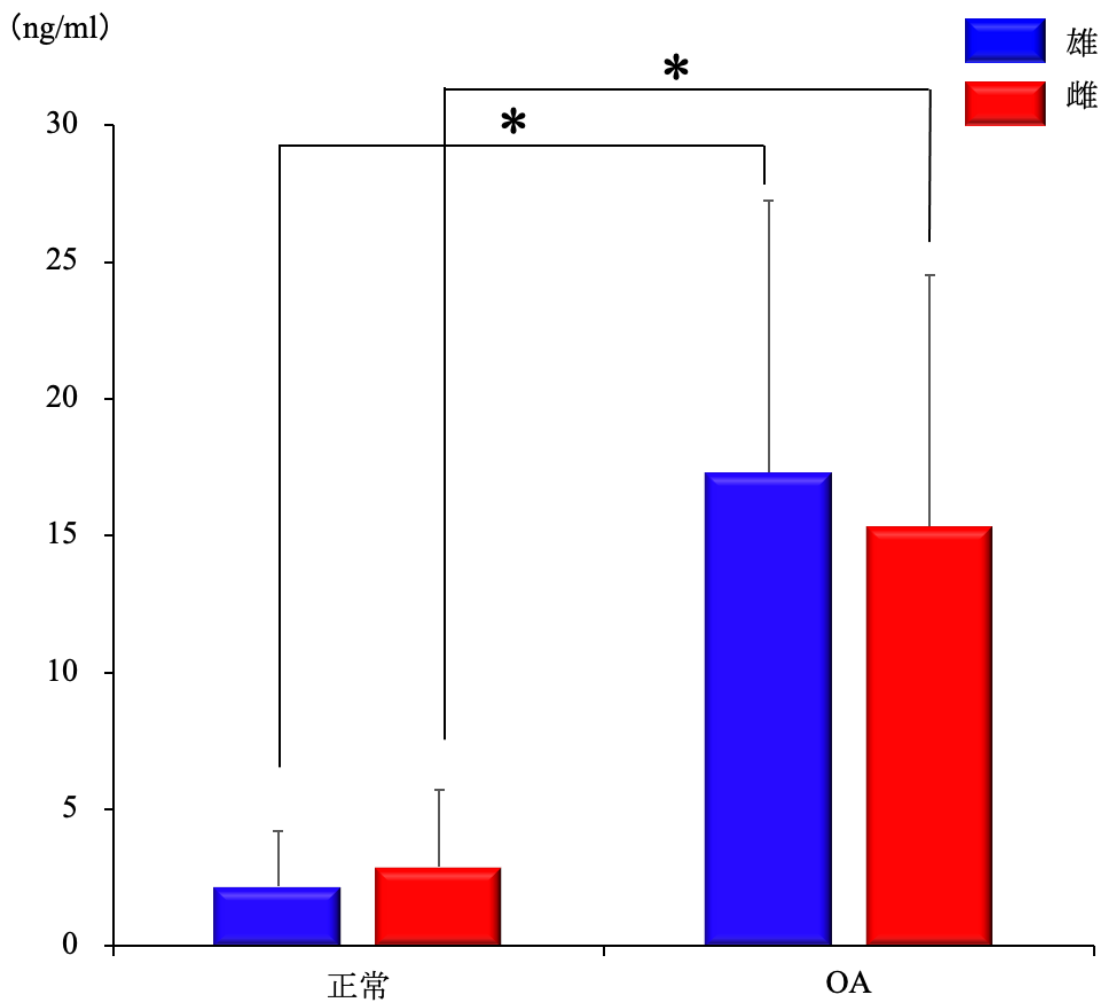


図 2-2 性別による関節液中の CTX-II 濃度の比較  
\* : 有意差あり ( $p < 0.05$ )

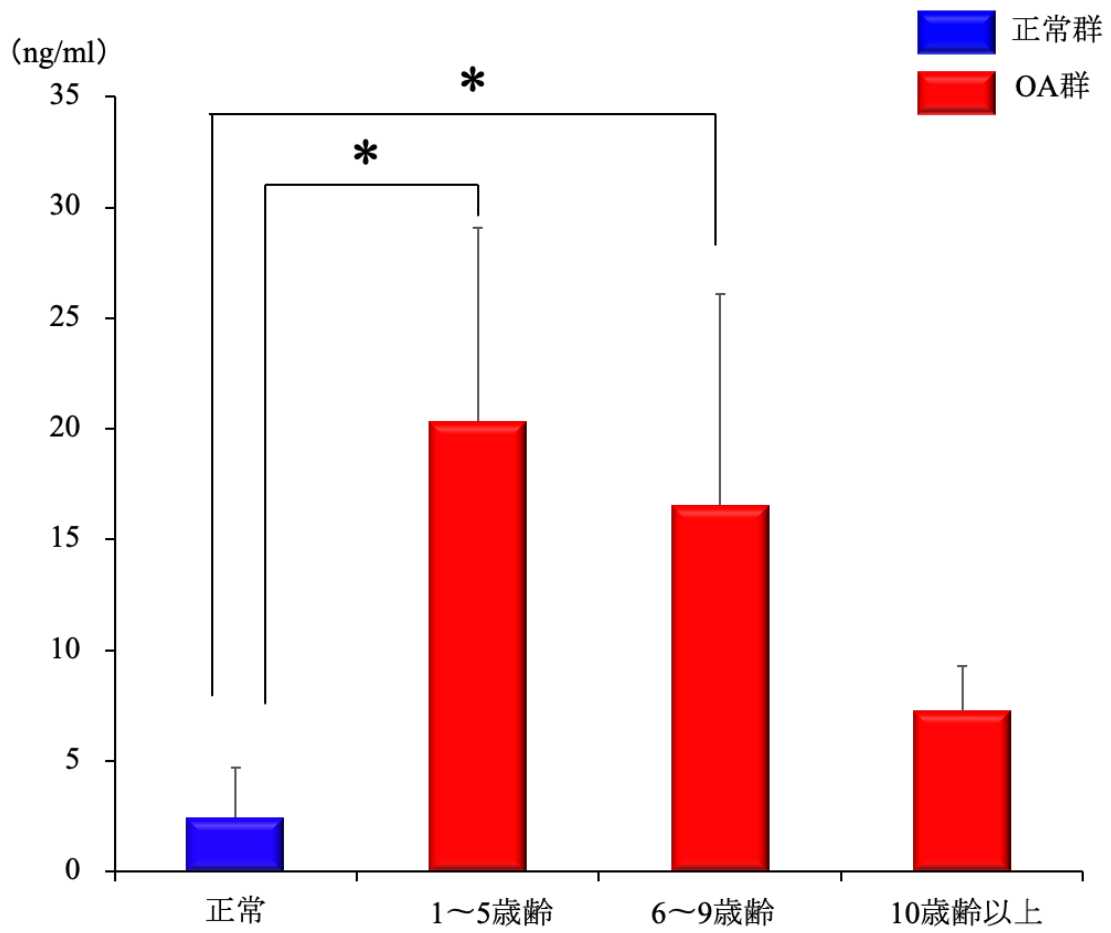


図 2-3 年齢による関節液中の CTX-II 濃度の比較  
 \* : 有意差あり ( $p < 0.05$ )



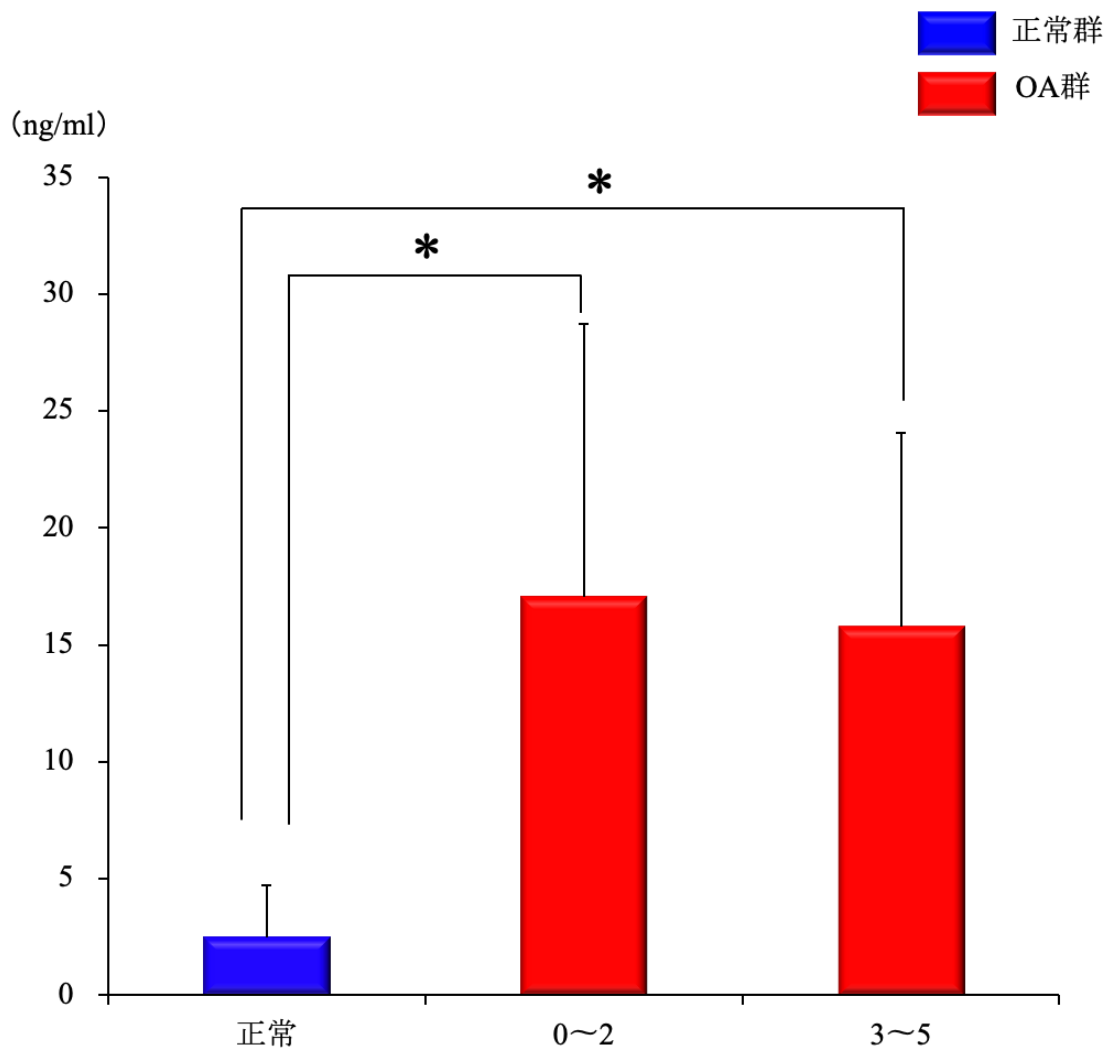


図 2-4 歩行スコアによる関節液中の CTX-II 濃度の比較  
 \* : 有意差あり ( $p < 0.05$ )

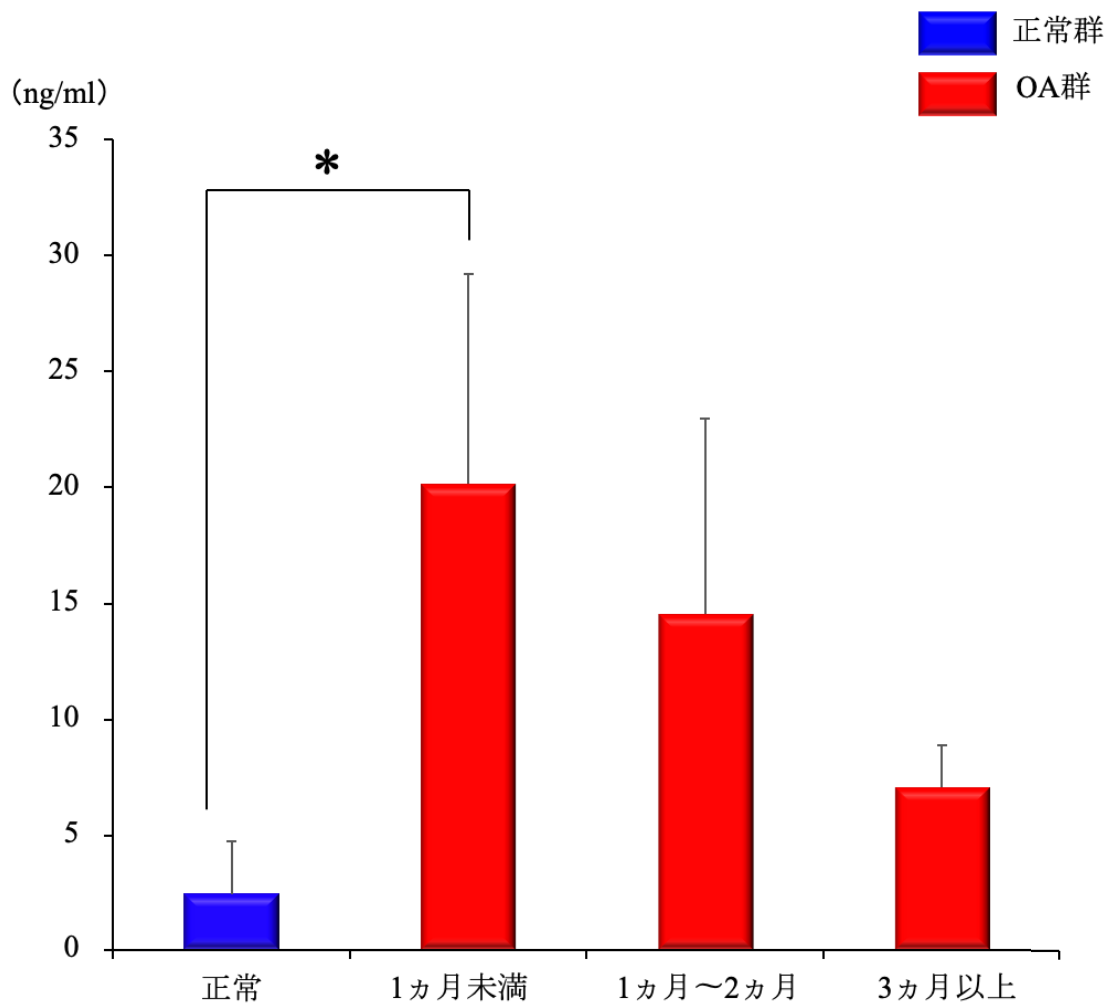


図 2-5 発症からの経過日数による関節液中の CTX-II 濃度の比較  
\* : 有意差あり ( $p < 0.05$ )

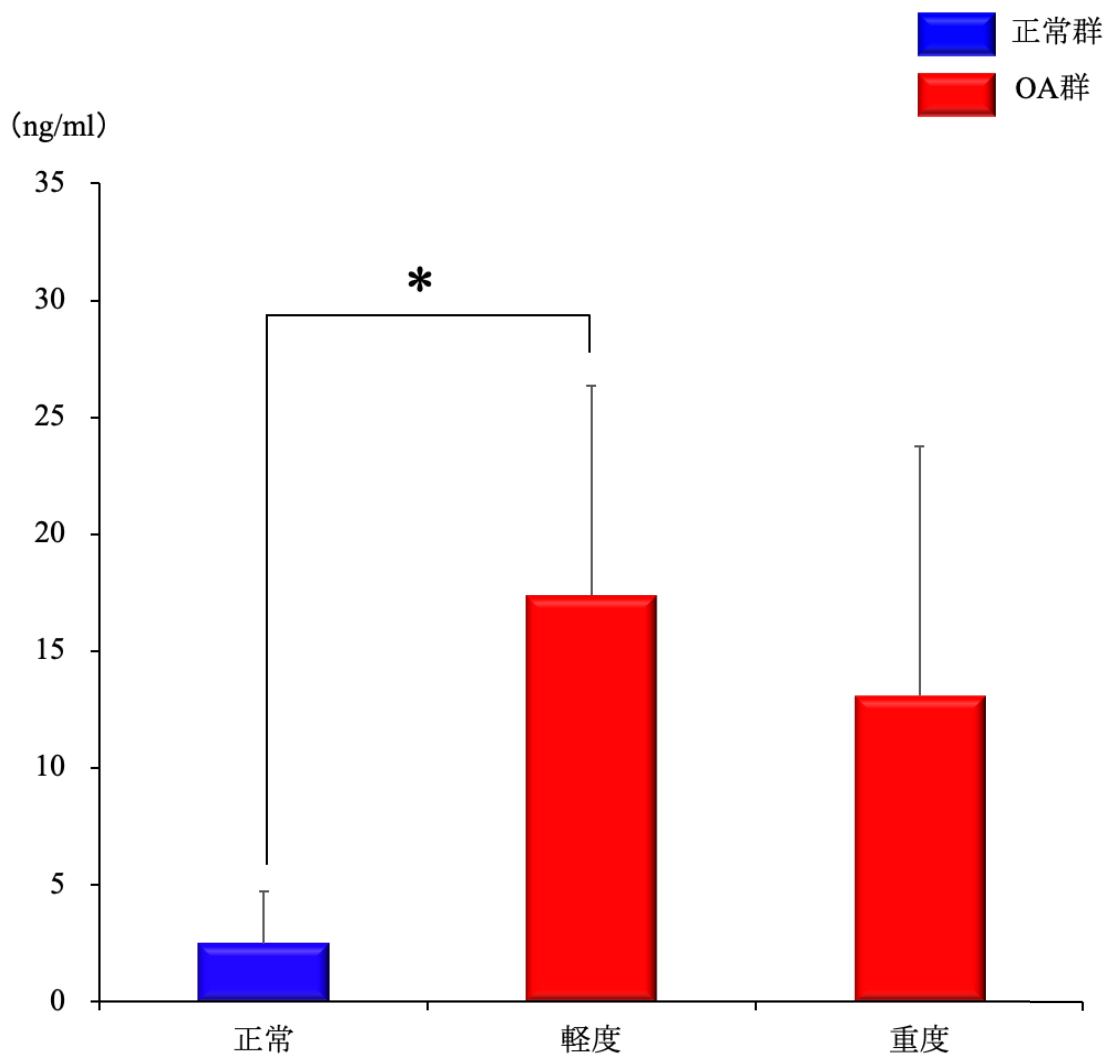


図 2-6 X線検査での重症度による関節液中のCTX-II濃度の比較  
 \* : 有意差あり ( $p < 0.05$ )

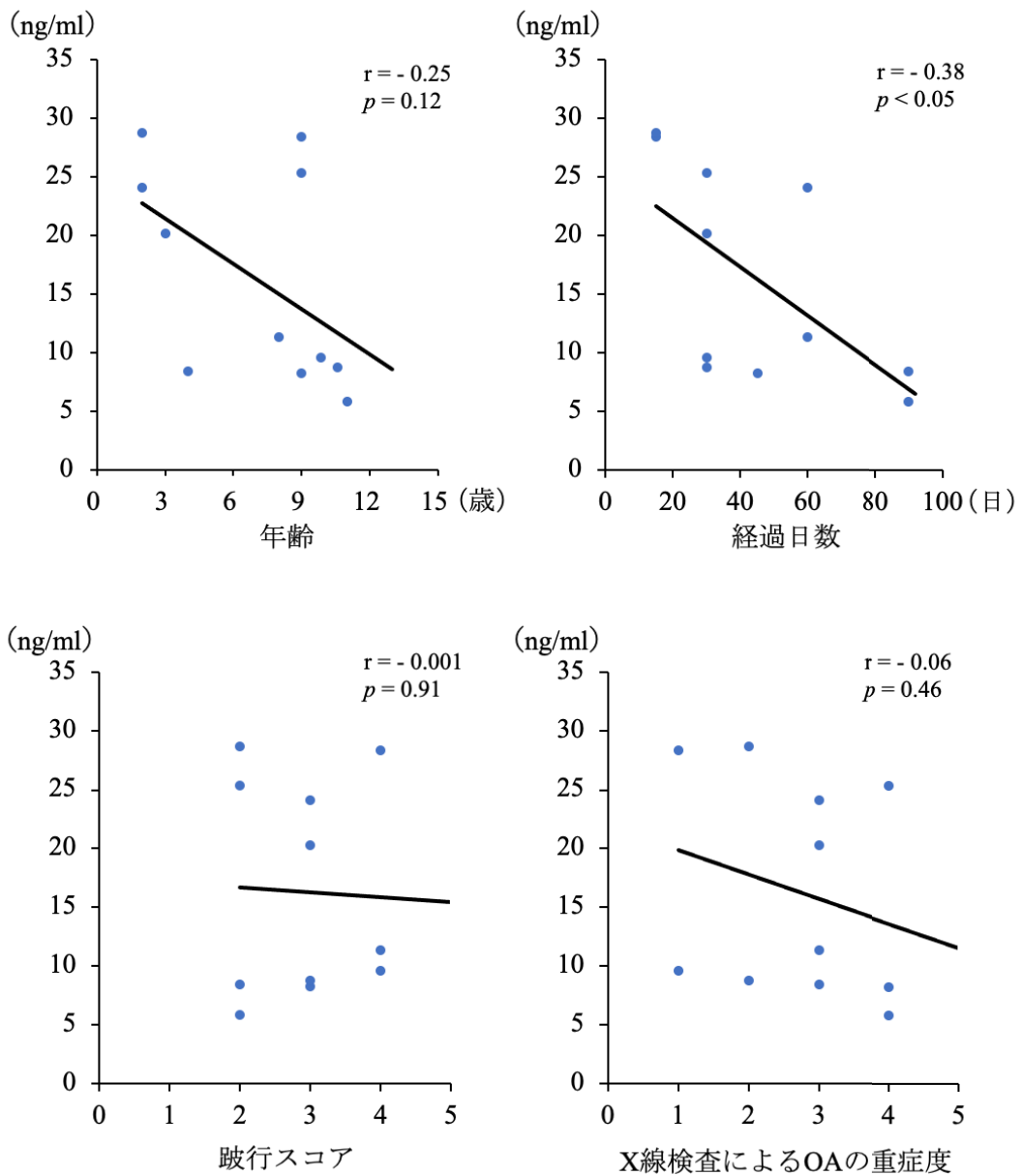


図 2-7 関節液中の CTX-II 濃度と各項目の相関関係を示した散布図

- (A) 年齢との相関関係
- (B) 発症からの経過日数との相関関係
- (C) 跛行スコアとの相関関係
- (D) X線検査による OA の重症度との相関関係

## 2.4 考察

ヒトにおいて、関節軟骨を構成する II 型コラーゲンは、滑膜や軟骨細胞から分泌される MMPs などの蛋白質分解酵素によって分解されることが明らかになっている (Moskowitz *et al.* 2006)。MMPs の中で、MMP-3 と MMP-13 は、OA の病態において主要な軟骨基質分解酵素であると考えられている (Rose and Kooyman, 2016)。特に、MMP-13 は、II 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖の C-テロペプチド内における P-L ペプチド結合を切断し、CTX-II を生成することが示されている (Atley *et al.* 2000)。犬の OA においても、ヒトと同様に MMP-13 が II 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖の P-L ペプチド結合を切断することによって、CTX-II が生成される可能性が高い。そのため、犬の OA の診断における CTX-II の有用性と最適な検体に関する検討を行った。

本検討では、OA を診断する目的で CTX-II 濃度を測定する検体として、関節液が最も適していることが明らかとなった。OA に罹患したヒトの CTX-II 濃度について調査した総説によると、OA に罹患した患者の関節液と尿において、CTX-II 濃度が上昇することが多数報告されている (Saber Hosnijeh *et al.* 2019)。OA に罹患したヒトの関節液に含まれる炎症性サイトカインや軟骨分解マーカーを調査した研究によると、CTX-II 濃度は X 線検査による OA の重症度と有意に相関することが明らかになっている (Leung *et al.* 2017)。また、犬の前十字靭

帯切断による OA モデルを用いた研究では、関節液と血清において CTX-II 濃度が有意に上昇したと報告されている (Matyas *et al.* 2004)。これらの過去の研究結果をまとめると、OA に罹患したヒトおよび犬の両方において、一貫して CTX-II 濃度が上昇したサンプルは関節液であった。本検討の結果から、自然発症の OA に罹患した犬においても、関節液中の CTX-II 濃度は有意に高いことが示されたため、関節液は CTX-II 濃度の測定に適した検体の一つであることが再確認された。

本検討では、血清において、OA 群で CTX-II 濃度の有意な高値は認められなかった。犬の前十字靭帯切断による OA モデルは、自然発症の OA とは異なり病態が重度であると考えられるため、OA モデルでは血清においても高濃度の CTX-II が検出された可能性が高い。そのため、短期間で多量の関節軟骨が損傷する重度の OA 罹患症例においては、血清においても CTX-II が検出できるのかもしれない。

医学領域では、CTX-II 濃度を測定するための検体として、尿を使用することが最も多い (Bay-Jensen *et al.* 2016)。OA に罹患したヒトの尿に含まれる CTX-II 濃度を調査した研究によると、X 線検査で評価した OA の重症度が上がるにつれて、CTX-II 濃度も有意に増加することが示されている (García-Alvarado *et al.* 2020)。また、尿中の CTX-II 濃度は、OA による疼痛が持続した日数とも関連す

ることが明らかになっている (García-Alvarado *et al.* 2020)。しかし、本検討において、自然発症の OA に罹患した犬で尿中の CTX-II 濃度を測定したところ、OA を検出する程の差異は認められなかった。ヒトでは、II 型コラーゲンの前駆体であるプロコラーゲンが軟骨細胞によって合成され、細胞外に分泌される。II 型プロコラーゲンは、II 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖の三重螺旋、直鎖状の N-テロペプチドおよび C-テロペプチド、両極に存在する N 末端および C 末端プロペプチドによって構成されている。このプロペプチドは、II 型コラーゲンの成熟分子が細胞質に組み込まれる前に、特定の蛋白質分解酵素によって除去される (Moskowitz *et al.* 2006)。しかし、現在までに、関節軟骨の II 型コラーゲン分解に関する経路の詳細はヒトおよび犬の両方においてほとんど明らかにされていない (Matyas *et al.* 2004; Poole, 1994)。また、コラーゲンの分解産物の輸送および腎臓を介した排出の過程は、ヒトと犬で異なっている可能性があるため、OA に罹患した犬の尿中では CTX-II 濃度が増加しなかったのかもしれない。本検討では、残念ながら、簡便に採取可能な検体である血液や尿では、OA 罹患症例において CTX-II 濃度の高値を検出できなかった。そのため、関節液よりも簡便に採取できる検体を用いて OA を診断することができるバイオマーカーを特定するためには、さらなる研究が必要である。

本検討では、OA による臨床徴候が軽度な症例や、X 線検査による OA の進行

ステージが初期の症例において、関節液中の CTX-II 濃度が高値を示した。OA に罹患した関節においては、比較的初期の段階から関節軟骨の変性と破壊が生じる (Sellam and Berenbaum, 2010)。そのため、CTX-II の測定は、このような初期の病態を捉えるのに有効かもしれない。一方、慢性化した OA では、関節軟骨が破壊し尽くされ、関節液中に放出される CTX-II が減少するため、高齢や X 線検査でのスコアが高い症例では CTX-II 濃度が低くなる傾向が認められたのかもしれない。したがって、関節液中の CTX-II は、犬の OA を早期に診断することができるバイオマーカーとして有用である可能性が示された。

本検討には、研究手法にいくつかの限界がある。まず、バイオマーカー自体が変化する性質をもっているため、血清や尿における輸送および排出の過程をさらに理解する必要がある。また、本検討に用いたサンプル数は少なく、他疾患に罹患している犬の CTX-II 濃度も検討していない。今後は、血液や尿のようにより簡便に入手可能な検体を介して、OA を検出することができるバイオマーカーを特定するためにさらなる研究が必要であろう。

本章の結果から、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も明らかになった。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

### 3.1. 緒言

ヒトの変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) において、microRNA (miRNA) は OA の病態と関節軟骨の恒常性を制御する新たな因子であると報告されており、治療のターゲットおよびバイオマーカーの有力な候補として注目されている (Kung *et al.* 2017)。miRNA は、正常および疾患状態における細胞内制御因子であり、転写後の遺伝子発現を調節する役割を持っている。核内で産生された一次 miRNA は、前駆体 miRNA を経て細胞質に移行し、RNaseIII である Dicer の作用によって 21-25 塩基の成熟 miRNA に変換される。成熟 miRNA は、RNA 誘導サイレンシング複合体においてアルゴノートタンパク質と結合し、標的となる mRNA に誘導され、標的の mRNA を分解もしくは翻訳を抑制する。また、miRNA は細胞外小胞体であるエクソソームを介して細胞外に分泌され、細胞間のコミュニケーションにおいて重要な役割を果たしている (Kato *et al.* 2014)。さらに、細胞外に分泌される miRNA は細胞の置かれている環境や状態を反映することが明らかとなっており、最近では OA のバイオマーカーとしても注目されている (Oliviero *et al.* 2019)。

OA における miRNA の役割を調査した総説によると、罹患部位での関節軟骨の miRNA 発現パターンは変化しており、関節軟骨の恒常性に影響することが示されている (Vicente *et al.* 2016)。また、OA に罹患した関節の滑膜組織における

miRNA の発現と機能を調査した総説によると、滑膜組織における miRNA 発現パターンも OA によって変化し、滑膜組織の代謝や炎症の制御機構に影響していることが明らかとなっている (Tavallae *et al.* 2020)。さらに、OA に罹患した患者の血液に含まれる miRNA の発現を網羅的に解析した研究では、正常な血液と比較して、OA の症例で発現量が有意に増減する miRNA がいくつか報告されており、バイオマーカーの候補となる miRNA が明らかにされつつある (Borgonio Cuadra *et al.* 2014, Ali *et al.* 2020)。

一方、犬の OA は慢性痛をもたらす主要な疾患であるにも関わらず、その病態は未解明な部分が多い。犬の OA の病態に関する研究の多くは、滑膜組織と関節軟骨における炎症性サイトカインや軟骨基質分解酵素の発現を調査した報告であり (Maccoux *et al.* 2007)、miRNA の発現は一切明らかにされておらず、バイオマーカーとしての可能性も全く検討されていないのが現状である。OA に罹患すると、変性した関節軟骨の断片が滑膜に取り込まれ炎症を引き起こす (Sellam and Berenbaum, 2010)。そのような状況下では、滑膜細胞から炎症性サイトカインや軟骨基質分解酵素が過剰に産生され、さらに OA の病態を進行させる。このように、滑膜炎は OA の病態の一部として重要な鍵を握っているため、その制御に関わる miRNA の解析は OA の病態解明の一助となるであろう。また、その際に発現が変化する miRNA を関節液や血液にて検出することができ

れば、OA のバイオマーカーとして活用することができるかもしれない。

そこで、本章では、犬の OA の病態に関与する miRNA を明らかにするために、OA に罹患した犬の滑膜組織における miRNA の発現を RNA シーケンス解析 (RNA-seq) を用いて網羅的に解析した。次いで、OA の診断に有用なバイオマーカーとなる miRNA の候補を探索するために、滑膜組織において発現量が顕著に増減した miRNA を選出した。さらに、それらの発現量を OA に罹患した犬の関節液と血清において定量的に測定し、そのバイオマーカーとしての有用性を検討した。

## 3.2. 材料および方法

### 3.2.1. 対象動物

本検討は、2019 年 10 月から 2020 年 10 月までの期間に日本大学動物病院整形外科を来院し、X 線検査によって膝関節に OA が認められた症例を対象に行った (OA 群)。本検討は、日本大学動物病院倫理審査委員会の承認を得て実施した (ANMEC R2-2)。

一方、整形外科疾患が認められない健康な犬を対照として使用した (正常群)。正常犬からの検体の採取は、日本大学動物実験委員会の承認を得て実施した (AP19BRS066-1)。

### 3.2.2. 検体の採取および保存方法

OA 群においては、全例で手術時に関節鏡検査を行って、滑膜炎の有無を確認した。関節鏡で評価した部位から滑膜組織を採取し、採取した滑膜組織は速やかに液体窒素で凍結した。本検討では、同一個体から関節液と血清も採取した。関節液は、OA に罹患している膝関節から採取し、1,000g で 20 分間、遠心分離してから上清を回収した。血液は、外頸静脈から採取し、血清分離管に分注してから室温で 30 分間静置した。次いで、静置した血清分離管を 12,000g で 90 秒間、遠心分離した後に血清を回収した。採取した全てのサンプルは、RNA を抽出するまで-80 度のディープフリーザーで保管した。

正常群においては、全身麻酔下で膝関節の関節包を切開し、肉眼で滑膜炎がないことを確認した後に滑膜組織を採取した。また、同一個体から関節液と血清も採取し、採取した全てのサンプルは前述した方法と同様に保管した。

### 3.2.3. Total RNA の抽出

凍結保存していた滑膜組織は、液体窒素の中で粉碎し、さらに TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.) に加えてホモジナイズした。次いで、ホモジナイズした溶液にクロロホルムを添加した後に 4°C、12,000g で

15 分間遠心し、水層を分離した。Total RNA の抽出は miRNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用し、DNase 処理は RNase-Free DNase set (QIAGEN) を用いて実施した。最後に、30 $\mu$ l の RNase free water (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, Thermo Fisher Scientific Inc.) で Total RNA を溶出した。

凍結保存していた関節液と血清は、室温で融解し、16,000g で 5 分間の遠心分離を行った。回収した上清に TRIzol LS reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を加え、ボルテックスを用いて 15 秒間混和した。次いで、クロロホルムを添加した後に、4°Cにて 12,000g で 15 分間遠心し、水層を分離した。Total RNA の抽出は miRNeasy Serum/Plasma kit (QIAGEN) を使用し、14 $\mu$ l の RNase free water で Total RNA を溶出した。Total RNA 濃度と 260/280 比は NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて計測した。

### **3.2.4. Small RNA-seq**

#### **3.2.4.1 ライブラリー作製およびシーケンス解析**

ライブラリーの作製には、TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina, Inc., California, U.S.A.) を使用した。3'アダプターと 5'アダプターを T4RNA リガーゼ 2 にて RNA 分子へ結合させ、cDNA への逆転写および PCR においてプライマーが結合する領域とした。5'アダプターは、miRNA に特徴的な 5'リン酸基を有す

る small RNA を捕捉するように設計した。次いで、アダプターを付加した small RNA を cDNA に逆転写し、PCR によって cDNA を増幅させた。最後に、増幅した cDNA をポリアクリルアミドゲルで電気泳動させ、アダプターが付加された small RNA を含む領域のバンドを切り出した。ライブラリーサイズは 145~160 bp とした。

作製したライブラリーのシーケンス解析には、HiSeq 2500 (Illumina, Inc.) を使用した。1 サンプルあたり約 10 億個の配列をシングルリード法および 51bp のリード長で読み取り、配列を決定した。

#### 3.2.4.2 アライメントおよび miRNA の検出

シーケンス解析により得られた small RNA の配列データからアダプター配列を除去するために、Cutadapt プログラム (National Bioinformatics Infrastructure Sweden, Uppsala, Sweden.) を用いてトリミングした。次いで、rRNA を排除するために、犬の 45S pre-rRNA とミトコンドリア rRNA にアラインメントされた配列を除外した。rRNA を取り除いた各サンプルの配列を、マッピングプログラムである Bowtie (Langmead *et al.* 2009) を用いて、miRBase v22.1 から取得した犬の miRNA の配列にアラインメントした。最後に、miRDeep2 quantifier モジュール (Max Delbrück Center for Molecular Medicine in the Helmholtz Association, Berlin,



Germany) を用いてアライメントされた成熟 miRNA の配列を検出し、リード数を計測した。

### 3.2.4.3 miRNA 発現量の比較

各 miRNA のリード数の正規化は、統計解析ソフト R の edgeR パッケージ (Lucent Technologies, New Jersey, U.S.A.) を用いて、Trimmed Mean of M-values (TMM) 正規化法で実施した。次いで、全サンプルの 51% 以上でリード数のカウントが 0 になった miRNA を除外した。解析対象となった miRNA のリード数に 1 を加え、log<sub>2</sub> 変換を行い様々なプロットを作製した。各 miRNA において、両群間の log CPM (Counts Per Million) と log fold change を算出し、miRNA の発現量を比較した。また、多次元尺度構成 (multidimensional scaling: MDS) 法を用いてサンプル間の類似性を可視化し、非類似性の指標にはユークリッド距離を用いた。完全連結法を用いて階層的クラスタリング解析も行い、ユークリッド距離を類似性の指標とした。さらに、階層的クラスタリング解析によってヒートマップを作製し、両群間の発現量の差が明確な miRNA を選出した。

### 3.2.5. cDNA の合成と RT-qPCR

抽出した Total RNA から 1 本鎖 cDNA を合成するために、My Genie 32 Thermal

Block (BIONEER Co., Daejon, Korea) と miScript® II RT Kit (QIAGEN) を使用して逆転写反応を実施した。反応液に 75ng の Total RNA を加え、37°C、60 分間にて逆転写反応を行い、その後、95°C、5 秒間にて逆転写酵素を失活させた。合成した cDNA は、RT-qPCR に使用するまで-80°Cで保存した。

RT-qPCR は Thermal Cycler Dice Real Time System II (TaKaRa Bio Inc., 滋賀) を用い、反応液には miScript® SYBR Green PCR kit (QIAGEN) を使用した。1 well あたりの PCR 反応液は、QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (12.5µl)、miScript Universal Primer (2.5µl)、miScript Primer Assay (2.5µl)、テンプレート cDNA (1µl: 1.25ng)、RNase free water (6.5µl) とした。本検討において、miRNA の発現を調べるために使用したプライマーを表 3-1 に示した。滑膜組織と関節液のハウスキーピング遺伝子には RNU6-2 を用い (Kolhe *et al.* 2017, Kung *et al.* 2017)、血清には Let-7a を使用した (Ciera *et al.* 2019)。まず、95°Cにて 15 分間で DNA 合成酵素を活性化した。PCR 反応は、初期変性が 94°Cで 15 秒間、アニーリングが 55°Cで 30 秒間、伸長反応が 70°Cで 30 秒間にて合計 40 サイクル行った。最後に解離曲線分析を行い、PCR 反応の特異性を確認した。RT-qPCR で得られた結果は、 $\Delta\Delta CT$  法にて解析を行い、各遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である RNU6-2 もしくは Let-7a に対する相対発現量として算出した。

### 3.2.6. 統計学的解析

Small RNA-seq における miRNA の発現量の比較には、edgeR (Lucent Technologies) の exact test を使用し、発現量の倍率変化 2 以上、 $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。また、RT-qPCR の測定結果は、平均値±標準偏差で算出し、統計解析には統計処理ソフト (GraphPad Prism version 6.0 for Macintosh, GraphPad Software Inc., San Diego, California, U.S.A) を使用した。両群間の比較には Mann-Whitney 検定を使用し、 $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

表 3-1 RT-qPCR に使用したプライマー

Primer name	Official symbol	Catalog number
Cf_miR-127_1	miR-127	MS00029435
Cf_miR-542_1	miR-542	MS00030912
Cf_miR-369_1	miR-369	MS00030520
Cf_miR-381_1	miR-381	MS00030604
Cf_miR-543_1	miR-543	MS00030919
Cf_miR-146a_1	miR-146a	MS00029617
Cf_miR-338_1	miR-338	MS00030429
Cf_miR-208b_1	miR-208b	MS00030030
Hs_miR-1249_1	miR-1249	MS00014245
Cf_miR-145_1	miR-145	MS00029610
Cf_miR-144_1	miR-144	MS00029603
Cf_miR-29a_1	miR-29a	MS00030240
Hs_RNU6-2_1	RNU6-2	MS00033740
Cf_let-7a_1	let-7a	MS00029288

### 3.3. 結果

#### 3.3.1 対象症例

Small RNA-seq を用いた検討においては、OA 群に 3 頭の犬を使用した。それらの犬の平均年齢は  $6.9 \pm 7.1$  歳齢で、平均体重は  $21.8 \pm 5.3\text{kg}$  であった。性別は、去勢雄が 2 頭、未不妊雌が 1 頭であった。犬種は、ボーダーコリー、秋田犬、ラブラドル・レトリバーが各 1 頭であった。いずれの症例においても、関節鏡視下で重度な滑膜炎が認められた。一方、正常群には、3 頭の成熟したビーグルを使用し、平均年齢は  $8.2 \pm 5.3$  歳齢で、平均体重は  $11.1 \pm 1.3\text{kg}$  であった。性別は、未去勢雄が 1 頭、未不妊雌が 2 頭であった。

各 miRNA の発現を RT-qPCR にて定量した検討では、OA 群に 11 頭の犬を使用した。それらの犬の平均年齢は  $7.3 \pm 3.4$  歳齢で、平均体重は  $21.7 \pm 10.5\text{kg}$  であった。性別は、未去勢雄が 1 頭、去勢雄が 3 頭、不妊雌が 7 頭であった。犬種は、ラブラドル・レトリバーが 2 頭、雑種が 2 頭であり、アメリカン・コッカー・スパニエル、ゴールデン・レトリバー、ジャック・ラッセル・テリア、珍島犬、トイ・プードル、バーニーズ・マウンテン・ドッグ、ボーダー・コリーが各 1 頭であった。いずれの症例においても、関節鏡で中程度以上の滑膜炎が認められた。一方、正常群には、6 頭の成熟したビーグルを使用し、平均年齢は  $6.8 \pm 4.9$  歳齢で、平均体重は  $10.7 \pm 0.4\text{kg}$  であった。性別は、未去勢雄が 2 頭、

未不妊雌が4頭であった。

### 3.3.2 Small RNA-seq

ライブラリー調整したサンプルのシーケンス解析を行い、各個体から得られたデータの品質を評価したところ、Q30は $96.8 \pm 0.3\%$ であり品質はきわめて高いことが示された(表3-2)。また、アダプターおよびrRNAを除去した後の平均リード数は約1,900万リードであり、miRNAの網羅的解析に十分なデータ量を得ることができた(表3-3)。さらに、各サンプルに含まれるRNAの構成を確認したところ、いずれのサンプルにおいても既知のmiRNAが約60%含まれており、解析に十分な量のmiRNAを回収することができた(図3-1)。

検出されたmiRNAから、全サンプルの51%以上でリード数のカウントが0であったmiRNAを除外し、281種類のmiRNAを解析対象とした。MDSおよび階層的クラスタリング解析の結果、正常群とOA群のサンプルに含まれるmiRNAの構成は各群内のサンプル同士で類似していることが明らかとなった(図3-2)。

次いで、OA群と正常群のmiRNAの発現量を比較したところ、OA群で有意に高かったmiRNAは57種類、有意に低かったmiRNAは42種類であった(図3-3)。また、両群間の比較において算出した $\log_2$  fold changeと $p$ 値を用いてvolcano plotを作製したところ、両群間のmiRNAの発現量は明確に異なること

が明らかとなった (図 3-4)。さらに、階層的クラスタリング解析によりヒートマップを作製したところ (図 3-5)、OA 群で明確に発現量が高かった miRNA は 20 種類、低かった miRNA は 22 種類であった (表 3-4)。

### 3.3.3 RT-qPCR

Small RNA-seq の結果を RT-qPCR にて検証するために、ヒートマップによって OA 群で明確に発現量が増減することが示された合計 42 種類の miRNA から、発現量の倍率変化が大きい miRNA、もしくは、ヒトの膝関節の OA において発現することが報告されている miRNA を選出した。すなわち、OA 群で有意に高かった 6 種類の miRNA (miR-543、miR-146a、miR-127、miR-381、miR-542、miR-369) および OA 群で有意に低かった 6 種類の miRNA (miR-145、miR-338、miR-1249、miR-29a、miR-208b、miR-144) を RT-qPCR での検証のために選出し、滑膜組織 (正常群 n=3、OA 群 n=7)、関節液 (正常群 n=3、OA 群 n=5)、血清 (正常群 n=6、OA 群 n=11) において miRNA の発現を定量した。

滑膜組織における miRNA の発現量を調査したところ、Small RNA-seq の結果と同様に、OA 群では miR-543 と miR-127 の発現量が正常群と比較して有意に高い値を示した (図 3-6)。また、統計学的な有意差は認められなかったものの、miR-146a と miR-381 の発現量も正常群と比較して高い傾向が認められた (図 3-

6)。Small RNA-seqにてOA群で低値を示したmiR-145の発現量は、RT-qPCRにおいても正常群に比較して低い傾向が認められた(図3-6)。しかし、mir-338、miR-1249、miR-29aの発現量は、Small RNA-seqの結果と異なり、正常群よりも高くなる傾向が認められた(図3-5)。滑膜組織を用いたRT-qPCRにおいては、miR-542、miR-369、miR-208b、miR-144を検出することはできなかった。そのため、OA群において発現量が有意な高値もしくは高い傾向を示したmiR-543、miR-146a、miR-127、miR-381をバイオマーカーの候補とし、関節液と血清においても発現量を測定した。

関節液のmiRNAの発現量を調査したところ、OA群ではmiR-543とmiR-146aの発現量が高くなる傾向が認められたが、miR-127とmiR-381は検出することができなかった(図3-7)。また、血清では、OA群においてmiR-543の発現量が高くなる傾向が認められたが、miR-146aの発現量にほとんど変化は認められなかった(図3-8)。関節液の結果と同様に、血清においてもmiR-127とmiR-381は検出することができなかった(図3-8)。



表 3-2 シーケンス解析により得られたデータの概要

Sample ID	総リード数	Q20 (%)	Q30 (%)
N 1	24,564,732	98.64	97.00
N 2	24,784,647	98.69	97.11
N 3	24,297,714	98.60	96.94
OA 26	28,609,744	98.54	96.40
OA 32	27,805,267	98.66	97.01
OA 40	26,931,737	98.47	96.54

N : 正常群 OA : OA 群

表 3-3 トリミング後のデータの概要

Sample ID	総リード数	トリミング後の リード数	アダプターなし のリード数	短いリード数	低品質の リード数
N 1	24,564,732	19,681,778 (80.12%)	27,297 (0.11%)	4,835,738 (19.69%)	19,919 (0.08%)
N 2	24,784,647	23,016,958 (92.87%)	32,766 (0.13%)	1,712,103 (6.91%)	22,820 (0.09%)
N 3	24,297,714	21,675,113 (89.21%)	34,928 (0.14%)	2,566,079 (10.56%)	21,549 (0.09%)
OA 26	28,609,744	17,460,794 (61.03%)	26,515 (0.09%)	11,104,616 (38.81%)	17,819 (0.06%)
OA 32	27,805,267	18,219,055 (65.52%)	36,196 (0.13%)	9,531,867 (34.28%)	18,176 (0.07%)
OA 40	26,931,737	15,594,422 (57.99%)	27,470 (0.1%)	11,294,416 (41.94%)	15,429 (0.06%)

トリミング後のリード数：アダプター配列を除去したリードの数

アダプターなしのリード数：アダプター配列を持たないリードの数

短いリード数：アダプターを除去した後の配列が 17 塩基以下のリードの数

低品質のリード数：未決定の塩基 N が 1 つ以上含まれるリードの数

N：正常群 OA：OA 群

表 3-4 OA 群において明確に発現量が増減した miRNA

Mature ID	倍率変化 (OA群/正常群)	Mature ID	倍率変化 (OA群/正常群)
cfa-miR-127	19.7	cfa-miR-338	-10.6
cfa-miR-542	19.4	cfa-miR-208b	-4.8
cfa-miR-369	19.2	cfa-miR-1249	-4.7
cfa-miR-376b	16.0	cfa-miR-145	-4.4
cfa-miR-376a	16.0	cfa-miR-150	-4.3
cfa-miR-493	14.5	cfa-miR-130a	-3.4
cfa-miR-409	12.6	cfa-miR-125a	-3.3
cfa-miR-450a	11.7	cfa-miR-144	-3.2
cfa-miR-381	11.7	cfa-miR-505	-3.1
cfa-miR-889	11.6	cfa-miR-29a	-3.1
cfa-miR-411	11.3	cfa-miR-885	-3.1
cfa-miR-410	10.0	cfa-miR-328	-3.1
cfa-miR-487b	8.6	cfa-miR-365	-2.9
cfa-miR-380	8.4	cfa-miR-497	-2.9
cfa-miR-450b	7.6	cfa-miR-30c	-2.6
cfa-miR-370	6.7	cfa-miR-30b	-2.6
cfa-miR-543	6.0	cfa-miR-193a	-2.5
cfa-miR-8890	5.7	cfa-miR-342	-2.5
cfa-miR-146a	5.5	cfa-miR-9	-2.4
cfa-miR-135b	4.5	cfa-miR-125b	-2.2
		cfa-miR-23a	-2.2
		cfa-miR-23b	-2.0

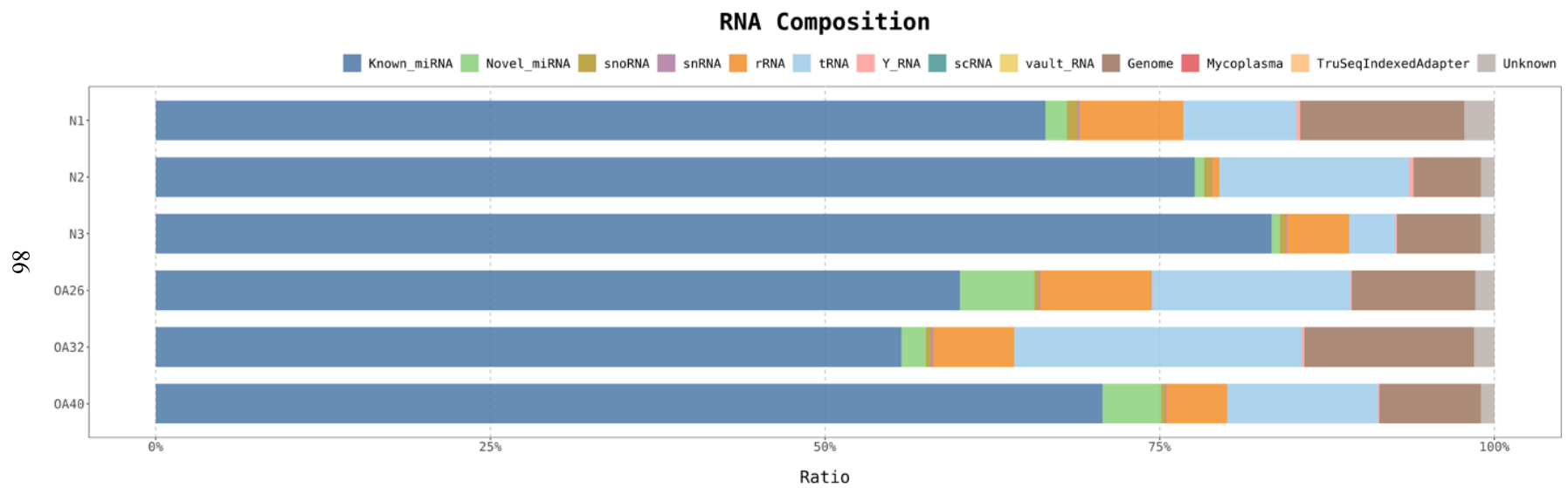
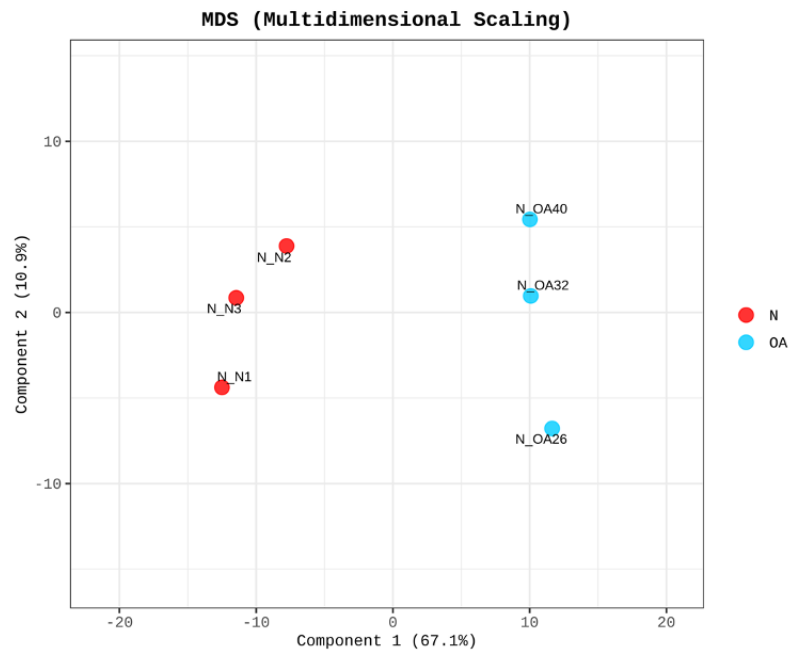


図 3-1 各サンプルに含まれる RNA の構成  
 いずれのサンプルにおいても、既知の miRNA は約 60%含まれていた。  
 N : 正常群 OA : OA 群

A



B

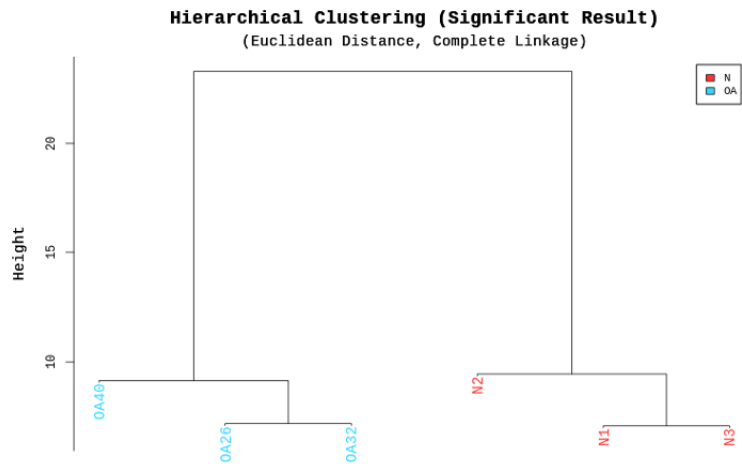


図 3-2 MDS および階層的クラスタリング解析の結果

- (A) 各サンプルの正規化された値を使用して、サンプル間の類似性を散布図に示した。
- (B) 各サンプルの正規化された値を用いて、類似度が高いものをグループ化した。

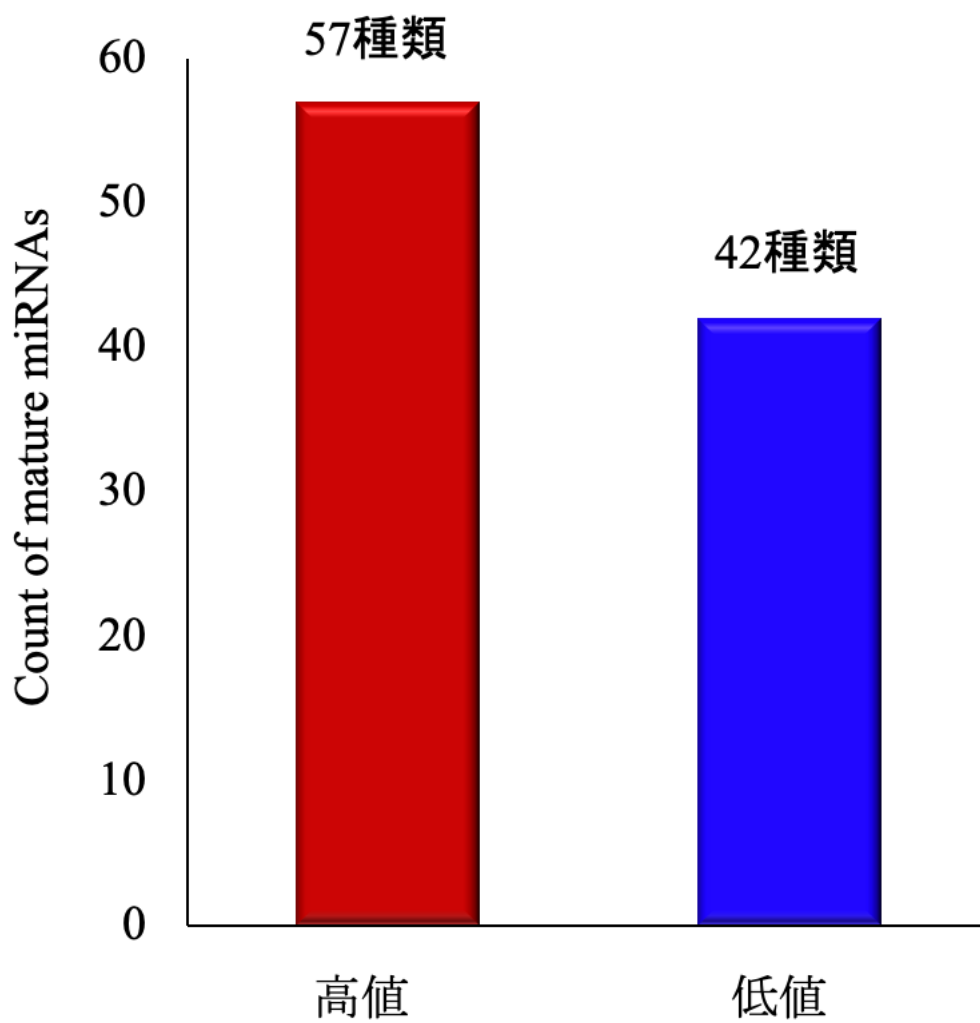


図 3-3 OA 群において有意に増減した miRNA の数  
発現量の倍率変化 2 以上、 $p < 0.05$  の miRNA を選出した。

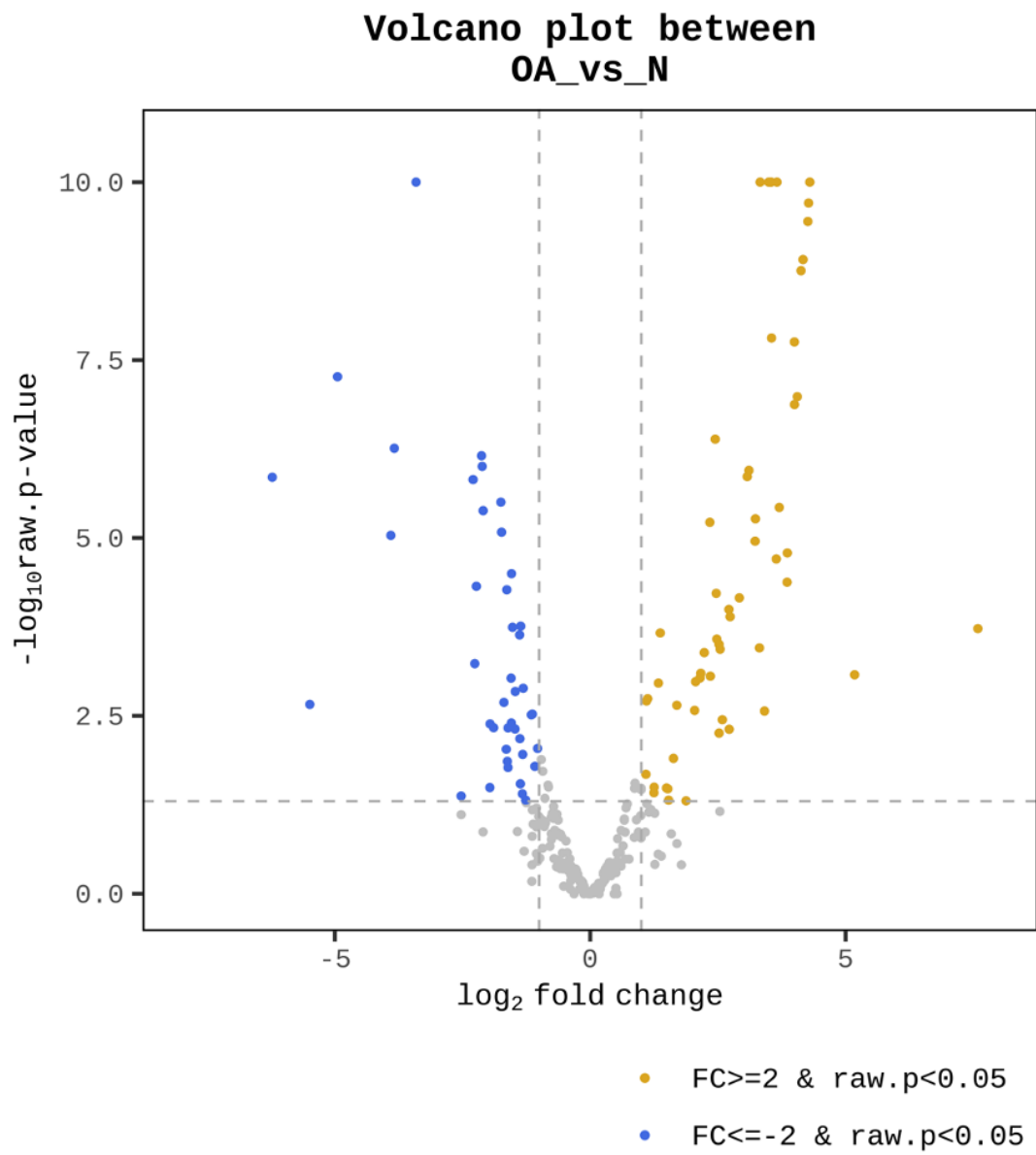


図 3-4 Volcano plot の結果  
Log2 fold change と  $p$  値を用いて miRNA の発現量の差を示した。

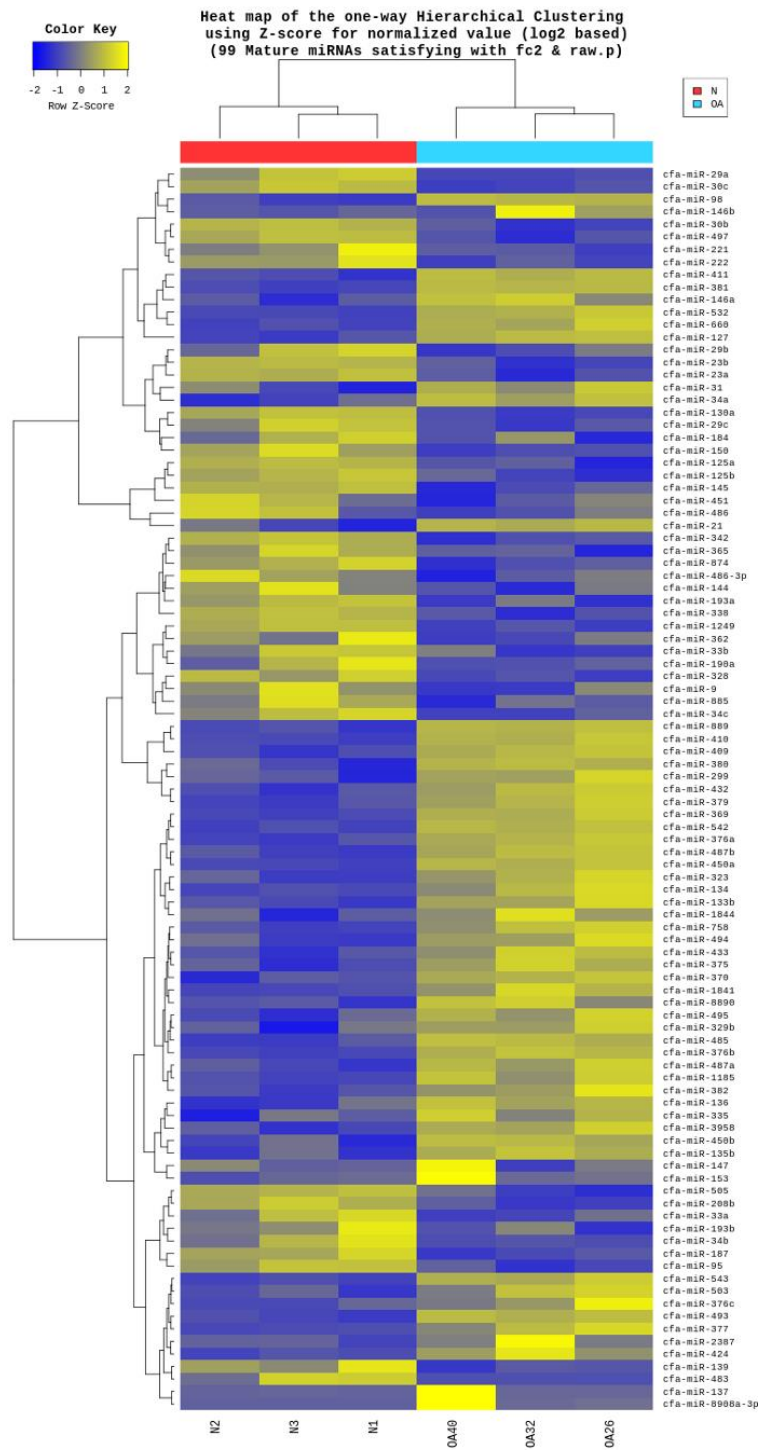


図 3-5 クラスタリング解析によって作製されたヒートマップ  
各サンプルにおける miRNA の発現量を色で示した。



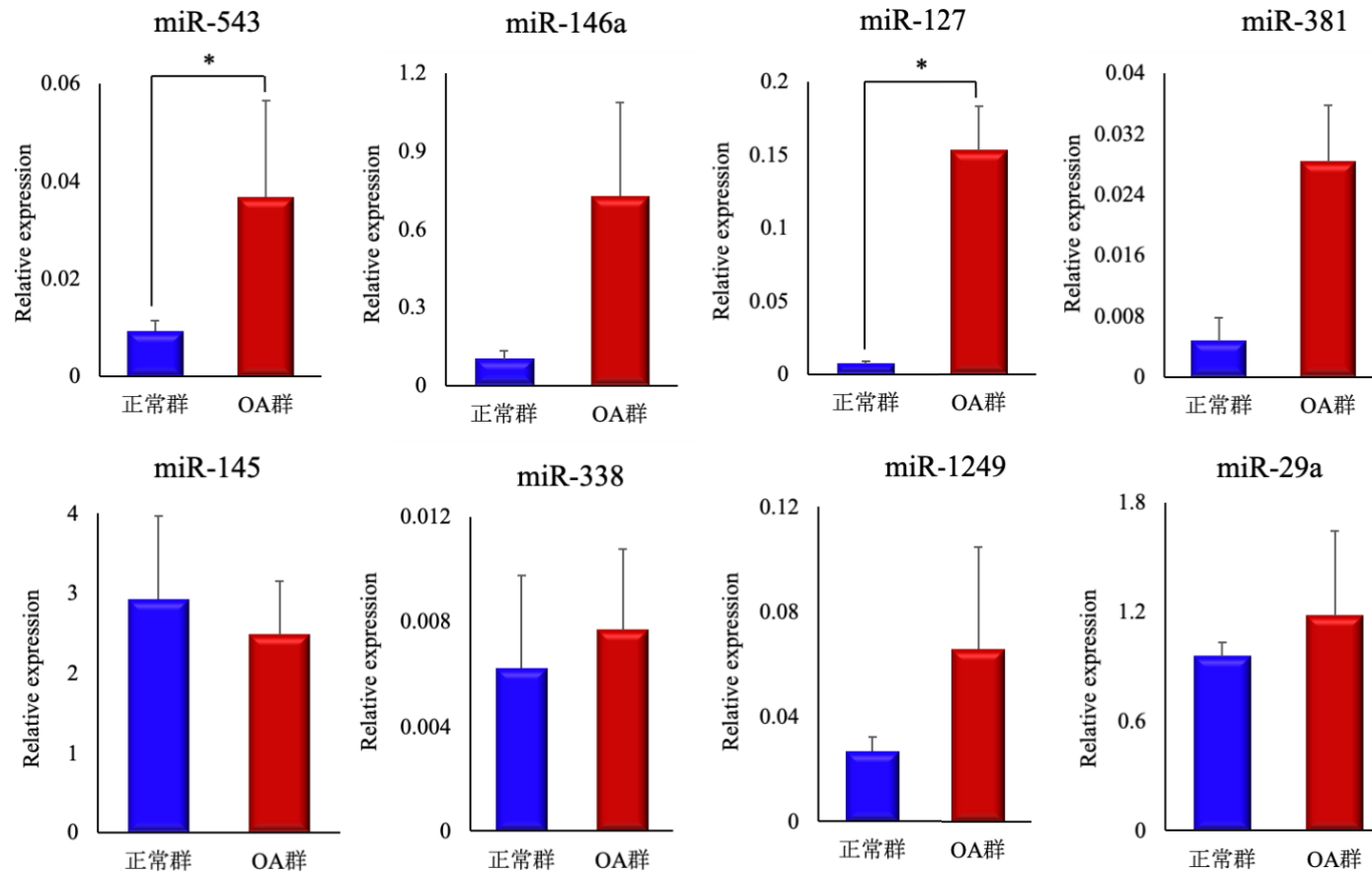


図 3-6 滑膜組織における miRNA の発現量

正常群と OA 群の滑膜組織における miRNA の発現量を比較した。

\* : 有意差あり ( $p < 0.05$ )

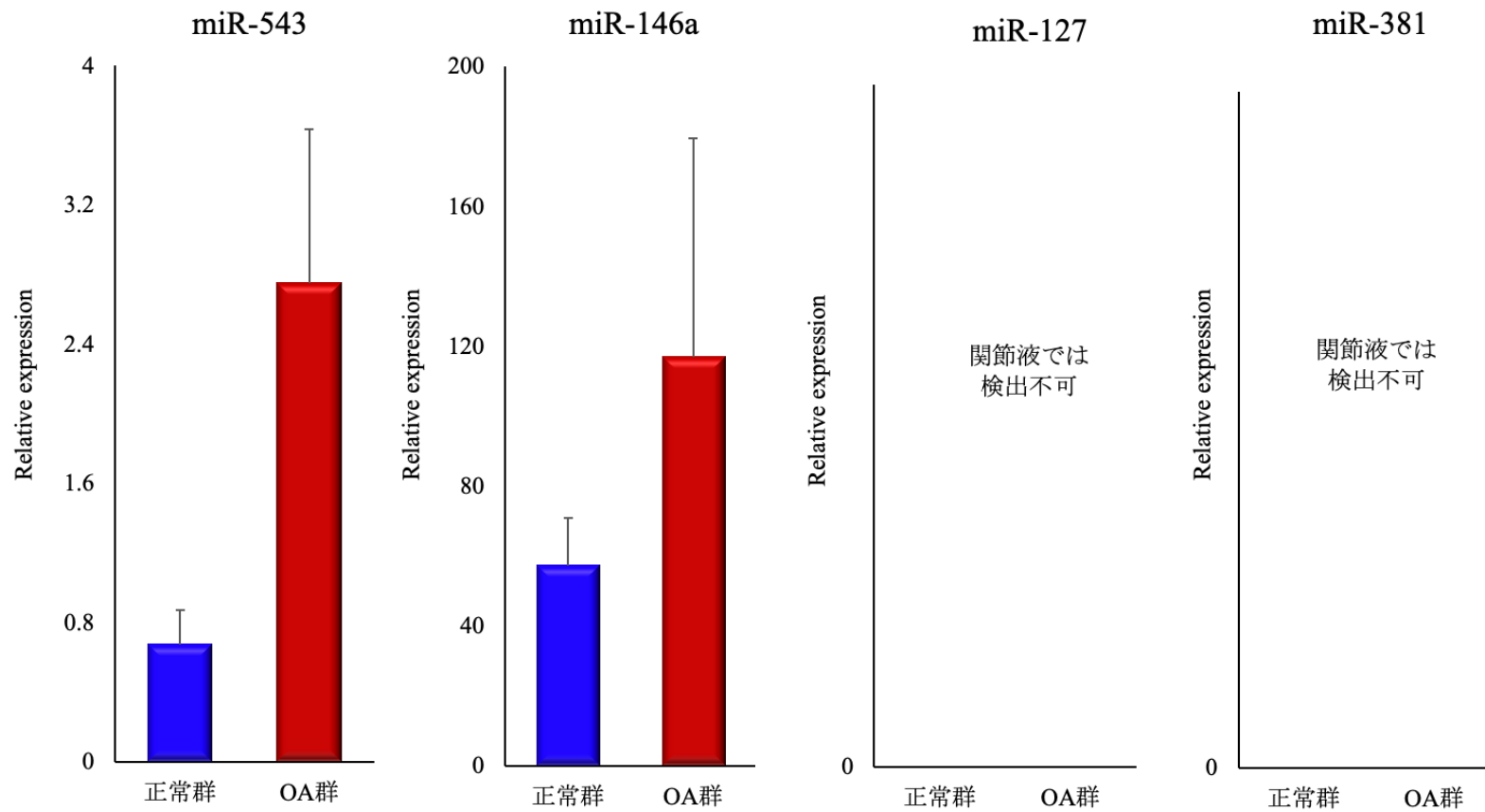


図 3-7 関節液における miRNA の発現量  
正常群と OA 群の関節液における miRNA の発現量を比較した。

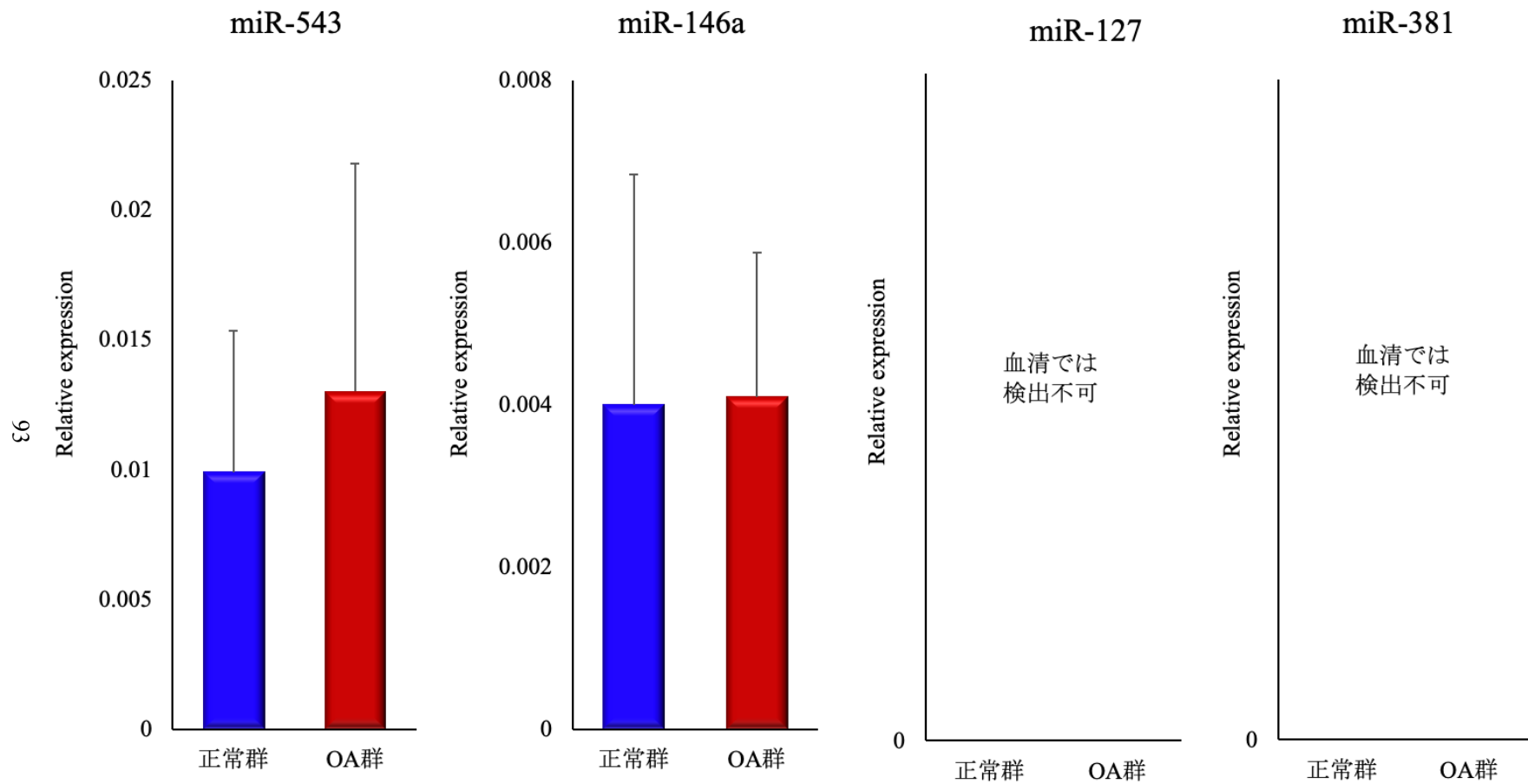


図 3-8 血清における miRNA の発現量  
 正常群と OA 群の血清における miRNA の発現量を比較した。

### 3.4. 考察

本検討は、OA に罹患した犬の滑膜組織における miRNA の発現を網羅的に解析し、その発現パターンを明らかにした世界初の報告である。また、RT-qPCR を用いて miRNA の発現量を調査したところ、miR-543 は OA に罹患した犬の滑膜組織、関節液、血清の全てにおいて一貫して発現量が高い傾向が示された。

Small RNA-seq によって得られたデータを解析したところ、OA 群で発現する miRNA の構成は特異的であり、正常群で発現した miRNA の構成とは全く異なっていた。また、OA 群において発現量が有意に高かった miRNA は 52 種類、有意に低かった miRNA は 44 種類あることが明らかとなり、犬の OA に罹患している関節では、miRNA の発現が大きく変化していることが示された。また、階層的クラスター解析によって作製されたヒートマップを用いて、各群のサンプル間における発現量の差が大きい miRNA を除外すると、OA 群において発現量が有意に高かった miRNA は 20 種類、有意に低かった miRNA は 22 種類に絞られた。これらの miRNA は、個体差による影響をほとんど受けなかったため、犬の OA の病態に関与する miRNA である可能性が高い。そこで、この 42 種類の miRNA の中から、特に発現量の倍率変化の絶対値が大きい miRNA、もしくは OA に罹患したヒトの関節軟骨や滑膜組織において発現量に変化することが報告されている miRNA を選出し、それらの発現量を RT-qPCR を用いて定量的に

解析した。

OA 群における miR-543 と miR-127 の発現量は、Small RNA-seq の結果と同様に、正常群に比べ有意に高い値を示した。それに加え、miR-146a と miR-381 の発現量も、正常群に比べ OA 群において高くなる傾向が認められた。しかし、Small RNA-seq にて OA 群で発現量が低くなることが示された miRNA を RT-qPCR で解析したところ、mir-338、miR-1249、miR-29a の発現量は OA 群でやや高い傾向を示しており、一貫した結果を得ることはできなかった。OA のバイオマーカーとなる miRNA の発現を調査したヒトの研究では、まず RNA-seq やマイクロアレイを用いてスクリーニングを行い、RT-qPCR によってその結果を再検証する方法が一般的となっている (Munjali *et al.* 2019)。しかし、RNA-seq によるスクリーニングの結果と、RT-qPCR を用いた検証の結果が一致しないこともある (Ntoumou *et al.* 2017)。そのため、本検討において、2 種類の検査法を用いて一貫した結果を得ることができた miR-543、miR-146a、miR-127、miR-381 が、犬の OA の病態に関与している可能性が示唆された。

ヒトにおいては、OA 罹患関節の滑膜で発現が変化する miRNA が報告されている。現在までに、miR-18a、miR-19b、miR-26a-5p、miR-27a、miR-29a、miR-34a、miR-122、miR-125、miR-125b-5p、miR-146a、miR-152、miR-155、miR-181a、miR-181c、miR-188-5p、miR-221、miR-203、miR-338a-3p、miR-381a-3p、miR-451、miR-

770 などが、OA による滑膜炎との関連が指摘されている (Tavallae *et al.* 2020, Endisha *et al.* 2018)。これらの miRNA の中で、犬の OA の滑膜にも発現していたのは、miR-146a のみであった。

miR-146a は、ヒトの OA の病態に関連する miRNA として、複数の施設で研究が進められている。本検討では、OA 罹患関節の滑膜組織における miR-146a の発現量を直接的に解析したが、ヒトでは同じ手法を用いた報告は存在しなかった。それらの研究では、OA 罹患関節の滑膜組織を培養して得られた滑膜線維芽細胞が使用されており、正常な滑膜線維芽細胞に比べて、miR-146a の発現量が高くなる傾向が示されている (Wang *et al.* 2013)。OA 罹患関節の組織を用いて miR-146a の発現量を直接的に解析した研究では、関節軟骨が用いられていた (Kopańska *et al.* 2009)。その研究においても、OA 患者の関節軟骨における miR-146a は、正常な関節軟骨と比較して、発現量が有意に高くなることが報告されている (Kopańska *et al.* 2009)。その他に、OA に罹患したヒトの血漿中においても miR-146a の発現量が有意に高くなることが示されている (Borgonio Cuadra *et al.* 2014)。このように、ヒトでは、miR-146a が OA の病態に関与することが指摘されている。犬の miR-146a は、ヒトの miR-146a もしくは miR-146a-5p と同一の塩基配列であり (Wagner *et al.* 2013)、OA に罹患した犬の滑膜組織において有意に高い発現量が認められた。これらの結果から、犬の miR-146a も OA の病態の

一部に関与している可能性が高いことが示唆された。

本検討では、OA 罹患関節の滑膜組織において、miR-543、miR-381、miR-127 の発現量も高い傾向が認められた。犬の miR-543、miR-381、miR-127 は、ヒトの miR-543、miR-381-3p、miR-127-3p と同じ塩基配列である (Wagner *et al.* 2013)。現在までに、OA に罹患したヒトの関節組織において、これらの miRNA の発現量の変化は明らかになっていない。ヒトにおいて、miR-543 および miR-381-3p は、炎症性疾患との関係は不明だが、胃癌、肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌など多くの腫瘍において重要な役割を果たすことが示されている (Li *et al.* 2016, Yu *et al.* 2014, Fan *et al.* 2016, Du *et al.* 2017, Cao *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2016)。ヒトの miR-127-3p については、慢性炎症性腸疾患の患者の腸管組織において、発現量が有意に高くなることが報告されている (Fasseu *et al.* 2010)。犬においても、これらの miRNA の発現を調査した研究が腫瘍を中心に実施されているが (Kobayashi *et al.* 2017)、炎症組織における役割は不明である。本検討の結果から、RNA-seq と RT-qPCR のいずれにおいても、OA 罹患関節の滑膜組織で miR-543、miR-381、miR-127 の高値が認められたことから、これらの miRNA が犬の OA による滑膜炎の制御に関与している可能性が示された。しかし、犬の滑膜炎におけるこれらの miRNA の生理学的な役割を解明するためには、さらなる研究が必要である。

本検討では、犬の OA のバイオマーカーとしての有用性を検討する目的で、OA に罹患した犬の関節液と血清においても、miR-543、miR-146a、miR-127、miR-381 の発現量を調査した。その結果、miR-543 の発現量は、滑膜組織だけでなく、関節液と血清といった体液サンプルにおいても一貫して高い傾向が認められた。miRNA は OA 患者の関節液と血漿に安定して存在し、関節液中の miRNA は滑膜組織が由来であることが明らかになっている (Murata *et al.* 2010)。したがって、本検討で認められた関節液中の miR-543 の高値は、滑膜組織の状態を反映している可能性が高い。ヒトにおいて、OA 患者の血漿中における miR-543 の発現パターンを明らかにした研究が 1 報だけ存在する (Ali *et al.* 2020)。OA に罹患したヒトの血漿中における循環 miRNA の発現量を網羅的に解析したところ、OA の患者では miR-543 を含めた 7 個の miRNA の発現量が有意に高くなることが示された (Ali *et al.* 2020)。そして、これらの循環 miRNA の発現量の変化は、OA で生じる現象を反映することが示唆されている (Ali *et al.* 2020)。このヒトでの報告と同様に、本検討においても、OA に罹患している犬の血清で miR-543 の発現量が高い傾向が認められたことから、miR-543 の高値は OA に関連して生じていると考えるのが妥当である。したがって、miR-543 は、犬の OA のバイオマーカーとして有用である可能性が示された。miR-543 が、OA の疾患特異的なマーカーであるか否かについては、さらに検討を進める必要がある。



本検討には、研究手法にいくつかの限界がある。本検討に使用したサンプル数は少なく、関節リウマチを含む関節疾患や非運動器疾患に罹患した犬の miRNA を測定することができなかった。そのため、本検討で変化が認められた miRNA が犬の OA の病態を反映しているか否かを明らかにするためには、OA 以外の疾患においても調査を行い、疾患特異性を検討する必要がある。また、本検討では、RNA-Seq で有意な変化が認められた全ての miRNA を検索できていない。したがって、犬の OA の診断に最適なバイオマーカーの候補を探索するためには、これらの miRNA についても検討を進めていかなければならない。

本検討では、OA に罹患した犬の滑膜組織における miRNA の発現を網羅的に解析し、発現パターンを世界で初めて明らかにした。さらに、バイオマーカーの候補として選出した 12 種類の miRNA の発現を、OA に罹患した犬の滑膜組織、関節液、血清において解析したところ、miR-543 は全ての検体において一貫して発現量が高値を示したため、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

獣医療が発展したことによって動物の高齢化が進んでおり、OA に罹患している犬と猫の数は増加傾向にある。犬と猫の OA は、X 線検査にて診断を行うのが一般的であり、OA が慢性化した高齢動物において診断されることが多いのが現状である。そのため、診断時には既に末期の状態であり、より早期に、若齢の段階から診断が可能な手法の確立が望まれている。

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 の診断への実用性を検討した。次いで、軟骨分解マーカーとして 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。

第一章では、犬と猫の活動量および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 の診断への実用性を検討することを目的とした。まず、Plus Cycle<sup>®</sup>の測定精度を検証し、日常生活での活動量と休息・睡眠時間の基礎データも収集した。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。その結果、Plus Cycle<sup>®</sup>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。一般家庭で飼育されている犬と猫の活動量は、高齢になるにつれて減少していく傾向が認められた。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。これらの結果から、第一章では、Plus Cycle<sup>®</sup>によって一般家庭での生活における犬と猫の活動量データが明らかとなり、OAの診断ツールとして利用できる可能性が示された。本章で得られた成果は、OAによる行動の変化を客観的に検出する新たな診断法の開発に貢献できることが期待される。

第二章では、OA罹患犬から血清、尿、関節液を採取し、OAの診断マーカーとしてのCTX-IIの有用性について検討することを目的とした。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線検査によるOA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。その結果、CTX-II濃度は、関節液のみにOA群で有意な高値が認められた。関節液中のCTX-II濃度を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濃度の有意な高値が検出された。X線検査では、OAによる変化が初期の段階

において CTX-II 濃度の有意な高値が認められた。本章の結果から、OA に罹患した犬において CTX-II を検出するために最も有益な検体は、関節液であることが明らかとなった。また、関節液中の CTX-II は犬の OA のバイオマーカーとして利用でき、特に OA の早期診断に有用なマーカーである可能性が示された。本章で得られた成果は、臨床の現場において犬の OA を早期に診断するための一助になると考えられる。

第三章では、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を検討することを目的とした。まず、OA に罹患した犬から滑膜を採取し、組織から抽出した total RNA を用いて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、RT-qPCR によって滑膜、関節液、血清における miRNA の発現量を測定し、正常犬と OA 罹患犬で比較検討した。RNA-seq の結果から、OA 群で有意に高かった miRNA は 57 種類であり、有意に低かった 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 によって発現量を測定した。OA 群の滑膜においては、miR-543 と miR-127 の発現量が有意に高値を示し、miR-146a と miR-381 の発現量も高い傾向が認められた。これらの中で、OA 罹患犬の関節液と血清ともに発現量が高かったのは、miR-543 のみであった。

したがって、miR-543 は全ての検体において一貫して発現量が高い傾向があり、犬の 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。本章で得られた成果により、miRNA を用いた犬の OA の新規診断法の開発に大きく貢献する重要な知見を得ることができた。

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>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。

## 謝辞

本研究を完遂するに至るまで、終始温かい激励とご指導、ご鞭撻を賜りました、日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻獣医外科学研究室の浅野和之教授に心より感謝申し上げます。また、本論文の厳密な審査を賜りました、日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻魚病学/比較免疫学研究室の森友忠昭教授、同獣医神経病学研究室内の北川勝人教授、同獣医外科学研究室の枝村一弥准教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多岐に亘る実験の技術指導並びにご助言を賜りましたコーネル大学獣医学部の林慶先生、日本大学生物資源科学部獣医外科学研究室研究員の種子島貢司先生、日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻獣医外科学研究室大学院生の梶裕磨先生、日本大学動物病院の研修医の先生方に厚く御礼申し上げます。さらには、獣医外科学研究室の学部生諸君に感謝致します。

## 参考文献

Ali, SA., Gandhi, R., Potla, P., Keshavarzi, S., Espin-Garcia, O., Shestopaloff, K., Pastrello, C., Bethune-Waddell, D., Lively, S., Perruccio, AV., Rampersaud, YR., Veillette, C., Rockel, JS., Jurisica, I., Appleton, CT., Kapoor, M. (2020) Sequencing identifies a distinct signature of circulating microRNAs in early radiographic knee osteoarthritis.

*Osteoarthritis Cartilage*. 28(11):1471-1481.

Atley, LM., Sharma, L., Clemens, JD., Shaffer, K., Pietka, TA., Riggins, JA., Eyre, DR. (2000) The collagen II CTx degradation marker is generated by collagenase 3 and in urine reflects disease burden in knee OA patients. *Trans Orthop Res Soc*. 25:168.

Bay-Jensen, AC., Reker D., Kjelgaard-Petersen, CF., Mobasheri, A., Karsdal, MA., Ladel, C., Henrotin, Y., Thudium, CS. (2016) Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis Cartilage*. 24(1):9-20.

Belda, B., Enomoto, M., Case, BC., Lascelles, BD. (2018) Initial evaluation of PetPace activity monitor. *Vet J*. 237:63-68.



Bellows, J., Center, S., Daristotle, L., Estrada, AH., Flickinger, EA., Horwitz, DF., Lascelles, BD., Lepine, A., Perea, S., Scherk, M., Shoveller, AK. (2016) Aging in cats: Common physical and functional changes. *J Feline Med Surg.* 18(7):533-550.

Benito, J., Depuy, V., Hardie, E., Zamprogno, H., Thomson, A., Simpson, W., Roe, S., Hansen, B., Lascelles, BD. (2013) Reliability and discriminatory testing of a client-based metrology instrument, feline musculoskeletal pain index (FMPI) for the evaluation of degenerative joint disease-associated pain in cats. *Vet J.* 196(3):368-373.

Borgonio Cuadra, VM., González-Huerta, NC., Romero-Córdoba, S., Hidalgo-Miranda, A., Miranda-Duarte, A. (2014) Altered expression of circulating microRNA in plasma of patients with primary osteoarthritis and in silico analysis of their pathways. *PLoS One.* 9(6): e97690. doi:10.1371/journal.pone.0097690.

Brown, DC., Boston, RC., Coyne, JC., Farrar, JT. (2008) Ability of the canine brief pain inventory to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc.* 233(8):1278-1283.

Brown, DC., Boston, RC., Farrar, JT. (2010) Use of an activity monitor to detect response to treatment in dogs with osteoarthritis. *J Am Vet Med Assoc.* 237(1):66-70.

Cao, Q., Liu, F., Ji, K., Liu, N., He, Y., Zhang, W., Wang, L. (2017) MicroRNA-381 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting TMEM16A expression. *J Exp Clin Cancer Res.* 36(1):29. doi: 10.1186/s13046-017-0499-z.

Chen, S., Fu, P., Wu, H., Pei, M. (2017) Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell Tissue Res.* 370(1):53-70.

Chuang, C., Ramaker, MA., Kaur, S., Csomos, RA., Kroner, KT., Bleedorn, JA., Schaefer, SL., Muir, P. (2014) Radiographic risk factors for contralateral rupture in dogs with unilateral cranial cruciate ligament rupture. *PLoS One.* 9(9):e106389. doi: 10.1371/journal.pone.0106389.

Cirera, S., Andersen-Ranberg, EU., Langkilde, S., Aaquist, M., Gredal, H. (2019)

Challenges and standardization of microRNA profiling in serum and cerebrospinal fluid in dogs suffering from non-infectious inflammatory CNS disease. *Acta Vet Scand.* 61(1):57. doi: 10.1186/s13028-019-0492-y.

Clarke, SP., Bennett, D. (2006) Feline osteoarthritis: a prospective study of 28 cases. *J Small Anim Pract.* 47(8):439-445.

Dieppe, PA., Lohmander, LS. (2005) Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet.* 365(9463):965-973.

Du, Y., Liu, XH., Zhu, HC., Wang, L., Ning, JZ., Xiao, CC. (2017) MiR-543 Promotes Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer via Targeting RKIP. *Cell Physiol Biochem.* 41(3):1135-1146.

Endisha, H., Rockel, J., Jurisica, I., Kapoor, M. (2018) The complex landscape of microRNAs in articular cartilage: biology, pathology, and therapeutic targets. *JCI Insight.* 3(17):e121630. doi: 10.1172/jci.insight.121630.

Fan, C., Lin, Y., Mao, Y., Huang, Z., Liu, AY., Ma, H., Yu, D., Maitikabili, A., Xiao, H., Zhang, C., Liu, F., Luo, Q., Ouyang, G. (2016) MicroRNA-543 suppresses colorectal cancer growth and metastasis by targeting KRAS, MTA1 and HMGA2. *Oncotarget*. 7(16):21825-21839.

Fasseu, M., Tréton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soulé, JC., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A., Ogier-Denis, E. (2010) Identification of Restricted Subsets of Mature microRNA Abnormally Expressed in Inactive Colonic Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 5(10):e13160. doi: 10.1371/journal.pone.0013160.

García-Alvarado, FJ., González-Martínez, MDR., Jaramillo-Rodríguez, Y., Delgado-Aguirre, HA. (2020) Increased Urinary Concentration of C-Terminal Telopeptide of Type II Collagen and Pain by Radiographic Grade in Women with Knee Osteoarthritis in Northeastern Mexico: A Cross-Sectional Study. *Biores Open Access*. 9(1):7-12.

Hansen, BD., Lascelles, BD., Keene, BW., Adams, AK., Thomson, AE. (2007) Evaluation of an accelerometer for at-home monitoring of spontaneous activity in dogs. *Am J Vet Res*.

68(5):468-475.

Hayashi, K., Kim, SY., Lansdowne, JL., Kapatkin, A., Déjardin, LM. (2009) Evaluation of a Collagenase Generated Osteoarthritis Biomarker in Naturally Occurring Canine Cruciate Disease. *Vet Surg.* 38(1):117-121.

Hercocock, CA., Pinchbeck, G., Giejda, A., Clegg, PD., Innes, JF. (2009) Validation of a client-based clinical metrology instrument for the evaluation of canine elbow osteoarthritis. *J Small Anim Pract.* 50(6):266-271.

Hielm-Björkman, AK., Rita, H., Tulamo, RM. (2009) Psychometric testing of the Helsinki chronic pain index by completion of a questionnaire in Finnish by owners of dogs with chronic signs of pain caused by osteoarthritis. *Am J Vet Res.* 70(6):727-734.

Innes, JF. Arthritis, p.1078-1111, In: Tobias, KM., Johnston, SA. ed. (2012) *Veterinary Surgery: Small Animal, Vol,1.* St. Louis: Elsevier, U.S.A.

Johnston, SA. (1997) Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathology. *Vet Clin*

*North Am Small Anim Pract.*, 27(4):699-723.

Kato, T., Miyaki, S., Ishitobi, H., Nakamura, Y., Nakasa, T., Lotz, MK., Ochi, M. (2014) Exosomes from IL-1 $\beta$  stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 16(4):R163. doi: 10.1186/ar4679.

Klinck, MP., Gruen, ME., Del Castillo, JR., Guillot, M., Thomson, AE., Heit, M., Lascelles, BD., Troncy, E. (2018) Development and preliminary validity and reliability of the Montreal instrument for cat arthritis testing, for use by caretaker/owner, MI-CAT(C), via a randomized clinical trial. *Appl Anim Behav Sci.* 200:96-105.

Klinck, MP., Monteiro, BP., Lussier, B., Guillot, M., Moreau, M., Otis, C., Steagall, PV., Frank, D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, JP., Del Castillo, JR., Troncy, E. (2018) Refinement of the Montreal Instrument for Cat Arthritis Testing, for Use by Veterinarians: detection of naturally occurring osteoarthritis in laboratory cats. *J Feline Med Surg.* 20(8):728-740.

Knazovicky, D., Tomas, A., Motsinger-Reif, A., Lascelles, BD. (2015) Initial evaluation

of nighttime restlessness in a naturally occurring canine model of osteoarthritis pain.

*PeerJ*. 3:e772. doi:10.7717/peerj.772.

Kobayashi, M., Saito, A., Tanaka, Y., Michishita, M., Kobayashi, M., Irimajiri, M., Kaneda, T., Ochiai, K., Bonkobara, M., Takahashi, K., Hori, T., Kawakami, E. (2017) MicroRNA expression profiling in canine prostate cancer. *J Vet Med Sci*. 79(4):719-725.

Kolhe, R., Hunter, M., Liu, S., Jadeja, RN., Pundkar, C., Mondal, AK., Mendhe, B., Drewry, M., Rojiani, MV., Liu, Y., Isales, CM., Guldberg, RE., Hamrick, MW., Fulzele, S. (2017) Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Sci Rep*. 7(1):2029. doi: 10.1038/s41598-017-01905-y.

Kopańska, M., Szala, D., Czech, J., Gabło, N., Gargas, K., Trzeciak, M., Zawlik, I., Snela, S. (2017) MiRNA expression in the cartilage of patients with osteoarthritis. *J Orthop Surg Res*. 12(1):51. doi: 10.1186/s13018-017-0542-y.

Kung, LHW., Ravi, V., Rowley, L., Bell, KM., Little, CB., Bateman, JF. (2017) Comprehensive Expression Analysis of microRNAs and mRNAs in Synovial Tissue from

a Mouse Model of Early Post-Traumatic Osteoarthritis. *Sci Rep.* 7(1):17701.

Kurihara, H., Ning, L., Xu, Z., Ikeda, H., Takazawa, Y., Saita, Y., Kimura, Y., Xu, S., Kaneko, K., Kurosawa, H. (2010) Correlation between synovitis detected on enhanced-magnetic resonance imaging and a histological analysis with a patient-oriented outcome measure for Japanese patients with end-stage knee osteoarthritis receiving joint replacement surgery. *Clin Rheumatol.* 29(10):1185-1190.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., Salzberg, SL. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10(3):R25. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.

Lascalles, BD., Hansen, BD., Roe, S., DePuy, V., Thomson, A., Pierce, CC., Smith, ES., Rowinski, E. (2007) Evaluation of client-specific outcome measures and activity monitoring to measure pain relief in cats with osteoarthritis. *J Vet Intern Med.* 21(3):410-416.

Lascalles, BD., Hansen, BD., Thomson, A., Pierce, CC., Boland, E., Smith, ES. (2008)



Evaluation of a digitally integrated accelerometer-based activity monitor for the measurement of activity in cats. *Vet Anaesth Analg.* 35(2):173-183.

Lascalles, BD., Robertson, SA. (2010) DJD-associated pain in cats: what can we do to promote patient comfort? *J Feline Med Surg.* 12(3):200-212.

Lascalles, BD., Henry, JB 3<sup>rd</sup>., Brown, J., Robertson, I., Sumrell, AT., Simpson, W., Wheeler, S., Hansen, BD., Zamprogno, H., Freire, M., Pease, A. (2010) *Vet Surg.* 39(5):535-544.

Leung, YY., Huebner, JL., Haaland, B., Wong, SBS., Kraus, VB. (2017) Synovial fluid pro-inflammatory profile differs according to the characteristics of knee pain. *Osteoarthritis Cartilage.* 25(9):1420-1427.

Li, J., Dong, G., Wang, B., Gao, W., Yang, Q. (2016) miR-543 promotes gastric cancer cell proliferation by targeting SIRT1. *Biochem Biophys Res Commun.* 469(1):15-21.

Li, X., Gibson, G., Kim, JS., Kroin, J., Xu, S., van Wijnen, AJ., Im, HJ. (2011) MicroRNA-146a is linked to pain-related pathophysiology of osteoarthritis. *Gene.* 480

(1-2):34-41.

Maccoux, LJ., Salway, F., Day, PJ., Clements, DN. (2007) Expression profiling of select cytokines in canine osteoarthritis tissues. *Vet Immunol Immunopathol.* 118(1-2):59-67.

Matyas, JR., Atley, L., Ionescu, M., Eyre, DR., Poole, AR. (2004) Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 50(2):543-552.

Millis, DL., Mankin, J. Orthopedic and Neurologic Evaluation, p.181-183, In: Millis, DL., Levine, D. ed. (2014) *Canine Rehabilitation and Physical Therapy.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, U.S.A.

Mosier, JE. (1989) Effect of Aging on Body Systems of the Dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 19(1):1-12.

Moskowitz, RW., Altman, RD., Buckwalter, JA., Goldberg, VM., Hochberg, MC. Section II: General Aspects of Diagnosis, p.216-219 (2006) In: *Osteoarthritis: Diagnosis and*

Medical/Surgical Management Fourth Edition. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, U.S.A.

Munjal, A., Bapat, S., Hubbard, D., Hunter, M., Kolhe, R., Fulzele, S. (2019) Advances in Molecular biomarker for early diagnosis of Osteoarthritis. *Biomol Concepts*. 10(1):111-119.

Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., Nakamura, T. (2010) Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 12(3):R86. doi: 10.1186/ar3013.

Ntoumou, E., Tzetis, M., Braoudaki, M., Lambrou, G., Poulou, M., Malizos, K., Stefanou, N., Anastasopoulou, L., Tsezou, A. (2017) Serum microRNA array analysis identifies miR-140-3p, miR-33b-3p and miR-671-3p as potential osteoarthritis biomarkers involved in metabolic processes. *Clin Epigenetics*. 9:127. doi: 10.1186/s13148-017-0428-1.

Nugent, M. (2016) MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis. *Osteoarthritis*

*Cartilage.*, 24(4):573-580.

Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S., Yamaguchi, K., Mochizuki, T. (2010) *PLoS One*. 5(10):e13247. doi:10.1371/journal.pone.0013247.

Oliviero, A., Della Porta, G., Peretti, GM., Maffulli, N. (2019) MicroRNA in osteoarthritis: physiopathology, diagnosis and therapeutic challenge. *Br Med Bull*. 130(1):137-147.

Park, SJ., Cheon, EJ., Lee, MH., Kim, HA. (2013) MicroRNA-127-5p regulates matrix metalloproteinase 13 expression and interleukin-1 $\beta$ -induced catabolic effects in human chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 65(12):3141-3152.

Pigati, L., Yaddanapudi, SC., Iyengar, R., Kim, DJ., Hearn, SA., Danforth, D., Hastings, ML., Duelli, DM. (2010) *PLoS One*. 5(10):e13515. doi:10.1371/journal.pone.0013515.

Poole, AR. (1994) Immunochemical markers of joint inflammation, skeletal damage and

repair: where are we now? *Ann Rheum Dis.* 53(1):3-5.

Rose, B.J., Kooyman, DL. (2016) A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology. *Dis Markers.* 2016:4895050. doi: 10.1155/2016/4895050.

Saberi Hosnijeh, F., Bierma-Zeinstra, S M., Bay-Jensen, A C. (2019) Osteoarthritis year in review 2018: biomarkers (biochemical markers). *Osteoarthritis Cartilage.*, 27(3):412-423.

Sellam, J., Berenbaum, F. (2010) The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 6(11):625-635.

Shahid, M., Manchi, G., Slunsky, P., Naseer, O., Fatima, A., Leo, B., Raila, J. (2017) A systemic review of existing serological possibilities to diagnose canine osteoarthritis with a particular focus on extracellular matrix proteoglycans and protein. *Pol J Vet Sci.* 20(1):189-201.

Tanishi, N., Yamagiwa, H., Hayami, T., Mera, H., Koga, Y., Omori, G., Endo, N. (2014) Usefulness of urinary CTX-II and NTX-I in evaluating radiological knee osteoarthritis: the Matsudai knee osteoarthritis survey. *J Orthop Sci.* 19(3):429-436

Tavallae, G., Rockel, JS., Lively, S., Kapoor, M. (2020) MicroRNAs in Synovial Pathology Associated With Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne).* 7:376. doi: 10.3389/fmed.2020.00376.

Vicente, R., Noël, D., Pers, YM., Apparailly, F., Jorgensen, C. (2016) Deregulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 12(4):211-220.

Wagner, S., Willenbrock, S., Nolte, I., Murua Escobar, H. (2013) Comparison of non-coding RNAs in human and canine cancer. *Front Genet.* 4:46. doi: 10.3389/fgene.2013.00046.

Wang, JH., Shih, KS., Wu, YW., Wang, AW., Yang, CR. (2013) Histone deacetylase inhibitors increase microRNA-146a expression and enhance negative regulation of

interleukin-1 $\beta$  signaling in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 21(12):1987-1996.

Wiseman-Orr, ML., Nolan, AM., Reid, J., Scott, EM. (2004) Development of a questionnaire to measure the effects of chronic pain on health-related quality of life in dogs. *Am J Vet Res*. 65(8):1077-1084.

Woolhead, G., Gooberman-Hill, R., Dieppe, P., Hawker, G. (2010) Night pain in hip and knee osteoarthritis: a focus group study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 62(7):944-949.

Xia S., Yan K., Wang Y. (2016) Increased miR-381a-3p Contributes to Osteoarthritis by Targeting IkBa. *Ann Clin Lab Sci*. 46(3):247-253.

Yoshimura, N., Muraki, S., Oka, H., Mabuchi, A., En-Yo, Y., Yoshida, M., Saika, A., Yoshida, H., Suzuki, T., Yamamoto, S., Ishibashi, H., Kawaguchi, H., Nakamura, K., Akune, T. (2009) Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab.*, 27(5):620-628.

Yu, L., Zhou, L., Cheng, Y., Sun, L., Fan, J., Liang, J., Guo, M., Liu, N., Zhu, L. (2014) MicroRNA-543 acts as an oncogene by targeting PAQR3 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res.* 4(6):897-906.

Zamprogno, H., Hansen, BD., Bondell, HD., Sumrell, AT., Simpson, W., Robertson, ID., Brown, J., Pease, AP., Roe, SC., Hardie, EM., Wheeler, SJ., Lascelles, BD. (2010) Item generation and design testing of a questionnaire to assess degenerative joint disease-associated pain in cats. *Am J Vet Res.* 71(12):1417-1424.

Zhang, Q., Zhao, S., Pang, X., Chi, B. (2016) MicroRNA-381 suppresses cell growth and invasion by targeting the liver receptor homolog-1 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 35(3):1831-1840.

岸田滋史, 兵藤未来, 菊地了, 三枝亮太, 井部邦彦, 井関智英子, 石原玄基, 大橋健, 河本光祐, 亀井達彦. (2019) アニコム家庭どうぶつ白書 2019. アニコム ホールディングス株式会社.

左近允巖, 浅川誠, 今井彩子, 枝村一弥, 奥村正裕, 佐野忠士, 永延清和, 西村亮



平, 山下和人, 高島一昭, 山根義久. (2012) 慢性痛：前十字靭帯断裂 –犬の慢性痛評価基準の作成（最終報告） – 動物のいたみ研究会シンポジウム 1-3.