カニクイザルによる変形性膝関節症モデルの開発と薬理学的評価

小川 真弥, 夏目 貴弘, 高松 宏幸

要約: 変形性膝関節症 (knee osteoarthritis: 膝 OA) は様々な要因により膝関節の軟骨が変性及び消失し, 痛みを引き起こす病態である。患者数は増加の一途をたどっているが, 発症の根本的な原因解明や手術以外の治療法は確立されていない。そのため様々な作用機序を有する化合物の臨床試験が実施されたが, 臨床での有効性の問題あるいは副作用の問題から新規医薬品の創出には至っていない。これは, げっ歯類モデルでは臨床での有効性を予測することは困難であることを意味している。病態モデルは「ヒトの病態に類似している」ことが重要であり, 非ヒト霊長類 (non-human primate: NHP) は生物学的及び構造学的にヒトに類似している点で非常に有用である。そこで著者らは NHP を用いた膝 OA モデルの作製を試みた。実験には 8 歳齢の雌性カニクイザル 9 頭を用い, 右膝半月板摘出手術 (medial meniscectomy: MMx) を行った。MMx 処置後, 運動負荷を実施することで膝関節の軟骨をすり減らし, 疼痛症状を惹起した。疼痛の評価には weight bearing test 及び knee pressure test を用いた。十分な疼痛症状を示した状態で, ジクロフェナク, アプレピタント, デュロキセチン, モルヒネ, プレガバリンの 5 つの薬剤について薬効評価を実施した。その結果, ジクロフェナク, デュロキセチン及びモルヒネは有効性が認められ, アプレピタント及びプレガバリンは認められなかった。この結果は臨床での有効性の結果と一致しており, NHP モデルはより臨床予測性の高い病態モデルであると考えられた。

1. はじめに

変形性膝関節症 (knee osteoarthritis: 膝 OA) は加齢, 肥満, 骨折や半月板損傷など多くの原因によって関節の軟骨が変性, 消失し, 痛みや腫れ, 可動域の低下, 歩行障害等を引き起こす病態である。高齢化に伴

い患者数は増加の一途をたどり, 本邦において, 自覚症状のある患者で約 1000 万人, 潜在的な患者は約 3300 万人と推定されているが(1), その発症の根本的な原因解明や手術以外の治療法は確立されていない。OA の一番の愁訴は痛みであり, 痛みは滑膜, 軟骨下骨が主で, 腱, 靱帯, 筋肉などからも生じる。治療薬としては国際的な治療ガイドライン(2)に沿い, 抗炎症及び鎮痛作用を目的に非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs), ステロイド, アセトアミノフェン, 弱オピオイドなど, また関節保護を目的に硫酸グルコサミン, ヒアルロン酸, コンドロイチンなどが処方されている(3)。薬物治療として主に用いられる NSAIDs は中等度以上の身体性疼痛での疼痛コントロールは難しく, オピオイド系鎮痛薬を使用しないと効果が得られないことが多い。しかしオピオイドは, 便秘や吐き気等の副作用が問題となることから, 同等の効果を有し副作用の少ない新規治療薬の開発が望まれている。

これまで OA の治療薬の開発は積極的に行われているにも関わらず, 動物モデルでは有効性を示したものの, 臨床試験では有効性が認められない, また副作用が認められる等の観点から開発を断念している例が多数存在している。臨床での有効性が期待された薬剤が上市しない原因の一つとして, ヒト病態に類似したモデルでの薬効評価が実施できていないことが考えられる。膝 OA の治療薬開発のために用いられる病態モデルは, げっ歯類が主流であり, その他ウサギ, ブタ, 犬等も用いられるが, いずれの動物種も遺伝学的, 構造学的にヒトとの相同性が低いため, ヒトへの外挿性が問題となる。一方で, 非ヒト霊長類 (non-human primate: NHP) であるカニクイザルはヒトとの類似点が多く, ヒトを模した病態モデルとして非常に有用であると考えられる。しかし, NHP は高等生物であるがゆえにモデル開発に使用できる動物数が限られている

ことや、NHP を扱う研究施設、研究者も少ないことから、膝 OA に限らず、NHP を用いた病態モデルの開発が発展途上であることが現状である。

カニクイザル膝 OA モデルを用いた薬効評価こそ、これらの状況を打破し、膝 OA の新薬開発の重要な橋渡しになり得ると考え、著者らはカニクイザル膝 OA モデルの作製に取り組んだ。本稿では本モデルの開発及び薬効評価の結果について紹介したい。

2. カニクイザル膝 OA モデルの開発

1) 既存の膝 OA 病態モデルの問題点

げっ歯類の病態モデルとして、mono-iodoacetate の膝関節内投与による化学的損傷モデルや、半月板/前十字靱帯切断による外科的損傷モデルが汎用されている(4, 5)。病態として両モデルとも初期は炎症を伴うが、前者は2週間目以降で軟骨下骨の損傷や関節裂隙の狭小化、骨棘の形成へと進行する。後者は4~5週間以降から同様の病態へと進行し、病態発症程度に差がみられる(3)。薬効評価には weight bearing test, Randall-Selitto, knee-bending, Cat Walk, von Frey filaments による痛覚過敏やアロディニアなど疼痛関連行動が指標とされている。しかしながら、ヒトとげっ歯類では疼痛関連因子の機能やそれによる疼痛症状発現の関連性が異なり(6)、また2足歩行と4足歩行という構造学的にも大きな違いがあることから、ヒトの痛みを再現するにはげっ歯類モデルでは不十分である(7)。

2) カニクイザル膝 OA モデルの作製方法

著者らはカニクイザル膝 OA モデルを開発するにあたり、化学的損傷モデル又は外科的損傷モデルのどちらの方法を選択すべきかを考え、よりヒトの病態発症に近い方を選択しようと考えた。すなわち、ヒトでは薬剤により化学的に軟骨破壊が起こることは考えにくいいため、外科的な処置により半月板を摘出し、軟骨を損傷させる方法を選択した。

8歳齢の雌性カニクイザル9頭を用い、外科的に右膝半月板摘出手術 (medial meniscectomy: MMx) を行った。右膝の創口が完治するまで待った後、運動負荷 (一定の間隔に配置した台の上を跳躍させる) を開始し、軟骨損傷を促進することで疼痛症状の発症を惹起した。本モデルの特徴の一つとして、MMx 処置後の運動負荷実施が必須であるという事が挙げられる。筆者らはこれまでに、MMx 処置後、運動負荷を実施しないと疼痛症状が発症しないことを報告してきた(8, 9)。げっ歯類では半月板損傷 (あるいは摘出) 手術のみで十分に軟骨損傷が進行していき、病態が発症す

ることが報告されている(10)。しかし、NHP モデルでは手術のみでは病態が発症しないことは非常に興味深く、構造学的にもヒトとの類似性が高いことが一つの要因であると考えられる。

3) 評価方法

(1) Weight bearing test

動物を当社で開発したモンキーウォーカー (サル用歩行器、特許出願番号: 2015-042503) に保定し、両足の下に体重計を設置することで、左右の足の荷重値を測定し、処置側 (右足) と健側 (左足) どちらの足により荷重がかかっているかを以下の式により算出した。

処置側後肢への荷重比率 (%) =

$$\frac{\text{処置側後肢への荷重 (kg)} \times 100}{(\text{処置側後肢への荷重 (kg)} + \text{健側後肢への荷重 (kg)})}$$

Weight bearing test はげっ歯類の疼痛評価の際も汎用されている方法であり(10)、NHP モデルでも同様の評価が実施可能と考え、指標の一つとした (図 1A)。

(2) Knee pressure test

動物をモンキーウォーカーに保定し、右膝及び左膝に対し圧痛計をゆっくりと押していき、動物が痛みの表情 (前頭筋の軽度の収縮あるいは皺眉筋が収縮し、眉弓筋が前へ倒れる) を示した時点の圧力 (3 kg をカットオフとする) を圧痛閾値とした。健側 (左膝) に対して処置側 (右膝) の閾値がどの程度低下しているかを、左右の圧痛閾値を用いて以下の計算式により算出した。

左膝に対する右膝の圧痛閾値の比率 (%) =

$$\frac{\text{右膝の圧痛閾値 (kg)} \times 100}{\text{左膝の圧痛閾値 (kg)}}$$

臨床においてリウマチ患者に対して用いられる Ritchie Articular Index という関節痛評価法がある(11)。この評価方法では各関節の圧痛を0から3までの4段階で評価しているが、4段階の一部、例えば2では「触ると痛い、かつ痛みで顔をしかめたり、表情を曇らせる」とある(12)。顔の表情を観察して痛みを評価する方法は、臨床においても、例えば言葉で上手く表現できない幼児や認知症患者などには特に有効である(13)。顔の表情を観察することは、げっ歯類では決して行うことができず、ヒト同様に表情豊かである NHP でこそ実施できる特有の方法であると考え、臨床を模した疼痛評価の一つとして実施した (図 1B)。

(3) Magnetic Resonance Imaging (MRI)

臨床において膝 OA は問診・触診に加え、X線検査によって骨棘形成、関節裂隙の狭小化、軟骨下骨の硬化、関節裂隙の消失などを評価する。しかし、X線画

図1 MMx 処置後の運動負荷による疼痛症状の発症

(A) MMx 処置後の weight bearing test の測定結果. 運動負荷実施により測定値は徐々に下がり, 35%前後で安定するように運動負荷の量を調節した. (B) MMx 処置後の knee pressure test の測定結果. 運動負荷実施により測定値は徐々に下がり, 60%前後で安定するように運動負荷の量を調節した. データは平均値±標準誤差 (N=9).

Contralateral knee (Left)

MMx knee (Right)

図2 MMx 処置10週間後におけるT2マッピング例

半月板摘出手術を実施した膝関節内側の矢印で示した部分では他の軟骨部と比較してT2緩和時間が延長していることが認められ, 軟骨変性を反映している。

像での所見と関節痛との間にはしばしば乖離が認められ, 関節軟骨や滑膜の評価を得意とするMRIが精査に用いられている. げっ歯類では膝関節が小さいために特殊な超高磁場MRI装置や臨床とは乖離した撮影条件での収集が必要となるが, NHPモデルでは臨床と同条件での評価が可能である. 著者らはNHPモデルの膝関節軟骨評価にMRIを利用し, 臨床と同じ下記のシーケンスを利用している.

①関節軟骨の形態評価: 3次元T2強調画像・脂肪抑制プロトン密度強調画像

②関節軟骨の質的評価: T2マッピング (図2)

上記の3次元T2強調画像や脂肪抑制プロトン密度強調画像では関節軟骨を高分解能かつ3次元的に評価することが可能であり, 厚さや容積を測定可能である. また, T2マッピングでは軟骨変性に伴ってコラーゲン配列の不整化や水分含有量の増加が進行すると関節軟骨のT2緩和時間が延長することを利用し, T2緩和時間を画像化することによって軟骨変性を定量評価することが可能である (図3).

図3 T2マッピングによる膝関節軟骨の厚さと性状評価

大腿骨頭の膝関節軟骨は内側・外側ともに経時的に変化を生じていなかったが、脛骨側の膝関節軟骨においては、半月板摘出手術を実施した内側において図中の矢印部のように術後10週で軟骨の菲薄化が認められた。また同部位のT2緩和時間は術後8週から上昇を認めており、菲薄化よりも早期に軟骨変性を検出可能である。

3. カニクイザル膝OAモデルを用いた薬効評価

近年、OA治療ガイドライン(2)で推奨されている薬剤の効果の持続、副作用の軽減を目的に、ブプレノルフィンの経皮剤、オピオイドとノルアドレナリンやセロトニン取り込み阻害作用の2種の作用機序をもつ薬剤の徐放製剤、ヒアルロン酸とステロイドなど作用

の異なる薬剤の配合剤、またヒアルロン酸単剤では分子の異なる製剤による開発も行われている(3)。さらにデュロキセチンがNSAIDsの補助療法として承認され、OAの治療範囲も広まった(14)。一方、アプレビタントはげっ歯類モデルでは有効性を示したが、臨床試験では有効性が認められず開発が断念されている(15)。

図4 ジクロフェナクの連続投与による疼痛症状の改善

ジクロフェナクの連続投与により weight bearing test 測定値 (A) 及び knee pressure test 測定値 (B) は徐々に上がり、媒体投与群に比べ投与1日後から5日後まで有意に改善した。一方でアプレピタント投与群は改善効果が認められなかった。データは平均値±標準誤差。

* $P < 0.05$ vs. Vehicle, ** $P < 0.01$ vs. Vehicle (Dunnett's test) (N=9)。

今回、著者らはジクロフェナク、アプレピタント、デュロキセチン、モルヒネ及びプレガバリンの5つの薬剤について薬効評価を行った。げっ歯類モデルにおいては、セレコキシブ (NSAIDs) 投与により weight bearing test の改善が認められるには連続投与が必要であることから(16)、ジクロフェナク及びアプレピタントの評価は連続投与により行い、デュロキセチン、モルヒネ及びプレガバリンの評価は単回投与により行うこととした。

1) ジクロフェナク及びアプレピタントの評価

MMx 処置 67 日後に9頭を媒体投与群、ジクロフェナク投与群、アプレピタント投与群の3群に分け、5日間の連続投与を行い、疼痛症状の改善効果を検証した。その後、約10日間の休薬期間を経て、クロスオーバー試験により各群9例となるように実験を繰り返した結果、ジクロフェナク投与群では疼痛症状の有意な改善効果が認められ、一方でアプレピタント投与群では改善効果を示さなかった(図4)。

2) デュロキセチン、モルヒネ及びプレガバリンの評価

MMx 処置 135~161 日後に9頭に対しデュロキセチン、モルヒネ及びプレガバリンをそれぞれ単回投与し、疼痛症状の改善効果を検証した。それぞれの薬剤の投与後3日以上の間隔をあげ、クロスオーバー試験により各群9例となるように実験を繰り返した結果、デュロキセチン及びモルヒネ投与群では疼痛症状の有意な改善効果が認められ、一方でプレガバリン投与群では改善効果を示さなかった(図5)。

3) まとめ

各種薬効評価を行った結果、ジクロフェナク、デュロキセチン及びモルヒネはげっ歯類モデル及び臨床試験同様に NHP モデルにおいても有効性が認められた

(表1)。一方で、アプレピタント及びプレガバリンはげっ歯類モデルでは有効性が認められたものの臨床試験では認められておらず、NHP モデルにおいても認められなかった(表1)。アプレピタントやプレガバリンのように、げっ歯類モデルでは薬効を示し、NHP モデルでは薬効を示さなかった薬剤は、臨床試験へ移る前に開発を断念する判断を下すことが可能であることから、創薬における無駄な費用や時間を削減できることも NHP モデルを用いることの利点の一つと言える。

4. おわりに

創薬において動物の病態モデルを用いた薬効試験は必須であり、その病態モデルは膝 OA に限らず、「ヒトの病態に類似している」、さらに「ヒトへの外挿が可能である」ことが望まれる。膝 OA 治療薬のげっ歯類モデル及び臨床試験における薬効をそれぞれ比較してみると、げっ歯類モデルでは薬効が認められたものの、臨床試験では薬効が得られなかった薬剤が多数存在することが分かる(表1)。一方で、NHP モデルにおいて、本研究で薬効評価を実施した5つの薬剤は、全て臨床試験の結果と一致した。もちろん NHP のような高等種を用いずとも臨床予測のできる病態も存在するが、膝 OA に関して言えば、げっ歯類モデルのみの結果では臨床予測を行うことは困難であり、NHP モデルの必要性は明らかである。本研究において、膝 OA の NHP モデルが新たに完成し、従来の病態モデルと比べ、より臨床を予測しやすくなったと言える。本モデルが新たな創薬の一端を担うことを期待したい。

図5 デュロキセチン及びモルヒネの単回投与による疼痛症状の改善

デュロキセチン 20 mg/kg 及び 30 mg/kg の投与により weight bearing test 測定値及び knee pressure test 測定値は、投与前に比べ用量依存的に有意に改善した (A)。またモルヒネ 3 mg/kg の投与により knee pressure test 測定値は、投与前に比べ有意に改善し、モルヒネ 6 mg/kg の投与により weight bearing test 測定値及び knee pressure test 測定値は、投与前に比べ有意に改善した (B)。一方でプレガバリン投与群は改善効果が認められなかった。データは平均値±標準誤差。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. Pre (t-test) (N=9)。

表1 げっ歯類モデル, NHP モデル, 臨床試験における各薬剤の有効性の比較 (文献 10, 15, 17-37 より)

薬剤 / 作用機序	げっ歯類モデル	NHP モデル	臨床試験
Morphine/ μ -opioid receptor	有効	有効	有効
Diclofenac/COX-2	有効	有効	有効
Aprepitant/NK1 receptor antagonist	有効	無効	無効
Duloxetine/serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor	有効	有効	有効
Pregabalin/ $\alpha 2\delta$ ligand	有効	無効	無効
Fatty acid amide hydrolase inhibitor	有効	?	無効
TRPV1 antagonist	有効	?	無効
Dopamine receptor (D3) agonist	有効	?	無効
δ -opioid receptor agonist	有効	?	無効
Matrix metalloproteinase inhibitor (nonselective)	有効	?	無効

著者の利益相反：小川真弥, 夏目貴弘, 高松宏幸（株式会社浜松ファーマリサーチ）。

文 献

- 1) 厚生労働省 介護予防の推進に向けた運動器疾患対策に関する検討会. 今後の調査研究の在り方について. 平成 19 年 8 月.
- 2) Zhang W, et al. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18:476-499.
- 3) 砥出勝雄, 他. 日本運動器疼痛学会誌. 2014;6:30-35.
- 4) Fernihough J, et al. Pain. 2004;112:83-93.
- 5) Hayami T, et al. Bone. 2006;38:234-243.
- 6) Chen J, et al. Nat Commun. 2013;4:2501.
- 7) Chu CR, et al. Am J Sports Med. 2011;39:1569-1578.
- 8) Ogawa S, et al. Osteoarthritis Cartilage. 2016;24:1190-1199.
- 9) Ogawa S, et al. Eur J Pharmacol. 2016;786:179-185.
- 10) Fernihough J, et al. Pain. 2004;112:83-93.
- 11) Doyle DV, et al. Ann Rheum Dis. 1981;40:75-78.
- 12) Ritchie DM, et al. QJ Med. 1968;147:393-399.
- 13) Prkachin KM. Pain Res Manag. 2009;14:53-58.
- 14) Hochberg M. Osteoarthritis Cartilage. 2012;20:1465-1469.
- 15) Goldstein DJ, et al. Clin Pharmacol Ther. 2000;67:419-426.
- 16) Pomonis JD, et al. Pain. 2005;114:339-346.
- 17) Knight CB, et al. Pain. 2012;153:281-292.
- 18) Nelson AE, et al. Semin Arthritis Rheum. 2014;43:701-712.
- 19) Pavelka K. Curr Med Res Opin. 2012;28:163-178.
- 20) Kim T, et al. Soc Neurosci Ann Meeting. 2015;693:627.
- 21) Castro AR, et al. Neuroscience. 2006;141:2087-2095.
- 22) Chandran P, et al. Eur J Pharmacol. 2009;613:39-45.
- 23) Skljarevski V, et al. Curr Drug Ther. 2011;6:296-303.
- 24) Rahman W, et al. Mol Pain. 2009;5:45-62.
- 25) Maciel IS, et al. PLoS One. 2013;8:e77227.
- 26) Ohtori S, et al. Yonsei Med J. 2013;54:1253-1258.
- 27) Ahn K, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2011;338:114-124.
- 28) Huggins JP, et al. Pain. 2012;153:1837-1846.
- 29) Chu KL, et al. Brain Res. 2011;1369:158-166.
- 30) Cui M. J Neurosci. 2006;26:9385-9393.
- 31) Miller F, et al. Contemp Clin Trials. 2014;37:189-199.
- 32) Morgan P, et al. Drug Disc Today. 2012;17:419-424.
- 33) Nozali C, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2012;342:799-807.
- 34) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT00979953?term=ADL5859&rank=3>
- 35) Janusz MJ, et al. Osteoarthritis Cartilage. 2002;10:785-791.
- 36) Janusz MJ, et al. Osteoarthritis Cartilage. 2001;9:751-760.
- 37) Krzeski P, et al. Arthritis Res Ther. 2007;9:R109.

Pharmacological profile of a novel nonhuman primate model of knee osteoarthritis

Shinya Ogawa, Takahiro Natsume, Hiroyuki Takamatsu

Pharmacology Group, Hamamatsu Pharma Research, Inc.

Abstract. A number of promising compounds developed in rodent arthritis models lack efficacy in clinical osteoarthritis (OA) pain. To enhance successful translation of preclinical findings, a nonhuman primate (NHP) model of knee OA was developed and characterized using behavioral assessments designed for use in the NHP. A unilateral medial meniscectomy (MMx) was performed and animals underwent an exercise regimen. Decreased ipsilateral knee pressure threshold, pressure “hyperalgesia”, and decreased ipsilateral weight bearing, suggestive of pain at rest were observed. The sensitivity of the pain-related behaviors to pharmacological manipulation was evaluated. A single dose of the opioid morphine reduced pain-related behaviors. Likewise, the serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor duloxetine reduced pain-related behavior, and efficacy was similar to that of morphine. By contrast, the anticonvulsant pregabalin did not significantly affect pain-related behavior. Repeated dosing with the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac reduced pain-related behaviors whereas repeated dosing with the NK₁ receptor antagonist aprepitant did not. The drug effects observed in the NHP OA model mirror the efficacy observed clinically.