

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09407

研究課題名（和文）細胞膜イオンチャネルの網羅的解析による関節変性疾患診断法および抑制療法の開発

研究課題名（英文）Development of diagnostic methods and inhibitory therapies for degenerative joint diseases through comprehensive analysis of cell membrane ion channels

研究代表者

熊谷 康佑（Kumagai, Kosuke）

滋賀医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：50649366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：関節滑膜、軟骨の恒常性維持に関与する標的細胞膜イオンチャネルの分子実体の解明、疾患特異的に関与する因子の同定と解析について検討を行ってきた。滑膜を利用しOAとRAにおける炎症の特徴について比較検討を進め、炎症性OA等RAとの類似点の解析結果からいくつかの細胞膜イオンチャネルに標的を絞り、最も注目すべきチャネルとしてLRRC8 familyを関節滑膜において同定する事が出来た。現在も継続して当院通院加療中のOAおよびRA患者よりサンプル採取を追加し、個体差の標準化に努めている。さらには、疾患修飾因子の検討のため年齢や合併疾患による患者特徴と治療薬について統計解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、細胞の恒常性維持に関わるイオンチャネルを遺伝子レベルから網羅的に扱い、その分子機構・機能解析を客観的かつ定量的に行う点にある。今回の結果より細胞膜イオンチャネルを経路とした関節変性疾患の発症機序の解明、早期診断ならびにその予防といった臨床的応用、治療法の確立の一助となる知見を得ることが出来た。今後更に解析を進めることにより、関節症発症のリスク管理や患者の訴えが関節変形を認めず疼痛のみの初期症状の際に、正確な診断を得ることが可能となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have been investigating the molecular entities of target cell membrane ion channels involved in maintaining the homeostasis of synovial membranes and cartilage, as well as identifying and analyzing disease-specific factors. By utilizing synovial membranes, we have compared the characteristics of inflammation in OA and RA, and based on the analysis of similarities between inflammatory OA and RA, we focused on several cell membrane ion channels. As a result, we identified the LRRC8 family as the most noteworthy channel in the synovial membrane. Currently, we continue to collect additional samples from OA and RA patients who are undergoing treatment at our hospital, striving to standardize individual differences. Furthermore, to examine disease-modifying factors, we are continuing statistical analysis on patient characteristics and medications based on age and comorbidities.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節リウマチ 変形性関節症 細胞膜イオンチャネル 網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

先進国において共通の問題である高齢化社会を迎え、関節の機能破綻による関節変性疾患は関節の強い痛みと運動制限により罹患者の QOL (Quality of Life) を著しく損なっている。全世界においておよそ 2 億人の人々がこの疾患群に苦しんでおり、世界保健機関 (WHO) でも重点戦略項目とされ、多くの大学や研究機関、製薬会社が多大な投資の元に疾患予防・治療薬開発にしのぎを削っている。しかしながら、骨関節領域は学術的に未だ発展途上の分野であり、診断法の開発や革新的創薬には至っていない。そのため、基礎研究の充実と知見の蓄積が重要であり、原因・病態のさらなる理解に基づいた新たな診断方法、治療方法の確立が求められている。現在の OA の治療戦略として、変性軟骨組織の修復と発症の予防という大きく 2 つのアプローチが肝要である。前者に関しては、再生医療を中心とした研究が盛んに行われており、多血小板血漿治療 (Platelet-rich plasma: PRP) 等一部は既に臨床応用されているものの、その有効性については未だ結論が得られていない。また、2013 年からは自家培養軟骨移植術も保険適応となっているが、その適応症例は限られている状況である。一方後者は、疾患の本来の意味での医学的克服を目指す上で重要なテーマであるが、OA 発症メカニズムが明らかにされていないため、予防的な介入への戦略さえも不十分なのが現状である。そのため、この学術的「問い」に対する答えとして関節構成成分である軟骨組織や滑膜組織自体の生理的機能を解明と、その恒常性維持機構を備えた詳細モデルの構築が、疾患の予防や超早期での診断、さらには新規治療法開発のための基盤形成を行う上で重要な位置付けとなる。

2. 研究の目的

本研究の特色は、軟骨細胞の恒常性維持に関わるイオンチャネルを遺伝子レベルから網羅的に扱い、その分子機構・機能解析を客観的かつ定量的に行う点にある。その結果として細胞膜イオンチャネルを経路とした OA の発症機序の解明による疾患の早期診断ならびにその予防といった臨床的応用、治療法の確立を目的とする。また近年の抗 TNF α 製剤を中心とした生物学的製剤の登場により RA の治療法に目覚ましい進歩があり、まだ研究段階ではあるが一部の OA 症例に関してもこの種の薬剤の効果が認められている。この事は OA が RA と全く別の病態であるという従来の考え方とは異なり、OA と RA の病態が軟骨や滑膜において細胞レベルで関連がある事を示唆する結果となっている。そのため、OA/RA 両者での比較によりその病態・病因の本質により近づけるのではないかと考えられる。

上記比較のみにおいてもすでに解析・評価を行う必要のある細胞膜イオンチャネルは多岐にわたっており、その相互作用を確認するだけでも新規性・独創性が高い。現時点で軟骨/滑膜細胞とイオンチャネルの研究では 10 数種類の論文が発表されているが、それぞれ使用する動物種や細胞外環境条件は様々であり、それらを文献的考察のみで評価することは困難であると考えられる。そのため、同一条件で細胞容積変化に関わる細胞膜イオンチャネルを評価し、しかも OA および RA の軟骨や滑膜細胞といった関節構成成分についての分子生物学的考察も加えた詳細な細胞解析・モデル作成は、本研究が初めてであり極めて独自性が高い。さらにその細胞モデルを通じて関節変性疾患の病態解析を行う試みはこれまでに無く、高齢化社会をむかえた現在において非常に意欲的かつ挑戦的なものであると考えられる。また miRNA に関しては主に悪性腫瘍の分野において極めて早期での診断や再発兆候をいち早く捉える新しいバイオマーカーとして期待がされている。2014 年より NEDO (新エネルギー・産業技術総合開発機構) において、国立がん研究センター等と共同で、多種類の悪性腫瘍等を簡便に診断できる検査機器/システムの開発に着手しており、体液中の miRNA の発現状態についてのデータベースを構築し、網羅的に解析する計画を発表している。この手法を応用し関節構成成分において細胞恒常性維持に関わるイオンチャネルの発現を制御する miRNA を同定することができれば、我々が目指す関節変性疾患の超初期での診断が容易となるのではないかと考えられる。また従来の診察所見や画像所見からの診断といった医療者の経験や技量の差に依存することなく定量的な診断が可能となることが期待される。

3. 研究の方法

- 1) 膝関節変性疾患 (OA/RA)、正常群 (半月板損傷や骨壊死等) の手術時に採取した軟骨・滑膜組織を対象とする。採取組織より培養細胞を作成し、3 継代培養後実験に用いる。
- 2) 上記で得られた培養細胞に対して、網羅的 miRNA 発現プロファイリングを行う。
- 3) ケモカイン、サイトカイン、成長因子の発現解析
- 4) 2)・3) で明らかとなった細胞膜イオンチャネル遺伝子ターゲットに対し、浸透圧変化等特定の条件下に培養を行い、miRNA、サイトカインの発現変化を観察し OA/RA に特異性の高い因子についてさらに検討をすすめる。
- 5) 得られた結果よりターゲットとなる細胞膜イオンチャネルの選定を行い、パッチクランプ実験によりそれぞれのイオンチャネルを介したリアルタイムの細胞変化・電流変化の確認・機能解析を行う。また、その解析を通じて、複合分子を含む分子実体を明らかにする。

- 6) 上記結果より各種細胞膜イオンチャネルの外的要因変化(薬剤暴露や浸透圧変化)に対する反応結果の数値化を行い、客観的かつ定量的に評価し OA/RA といった疾患別(シミュレーション)モデル構築を目指す。

4. 研究成果

我々は細胞膜イオンチャネルについて研究考察を継続し、関節構成成分である関節滑膜、軟骨の恒常性維持に関与する標的チャネルの分子実体の解明、疾患特異的に関与する因子の同定と解析について検討を行ってきた。これらの解析結果を踏まえて、最終的には関節変性疾患の病態解析システムを構築し、最終的に遺伝子・細胞レベルでの新しい診断法および治療法の開発を目標としている。

現時点では滑膜に関して ELISA 法によるサイトカイン解析を通じて OA と RA における炎症の特徴について比較を行い、炎症性 OA 等 RA との類似点の解析を進め、その結果からいくつかの細胞膜イオンチャネルに標的を絞り、PCR 法にて発現解析を継続して行っているところである。最も注目すべきチャネルとして LRRRC8 family を関節滑膜において同定した。今後も当院通院加療中の OA および RA 患者よりサンプル採取を追加し、継続してサイトカイン解析、PCR 等を行い、個体差の標準化に努めていく。さらには、疾患修飾因子の検討のため年齢や合併疾患による患者特徴と治療薬について統計解析を継続している。以上に関しては今後の研究課題として引き続き解析を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kubo Mitsuhiko, Maeda Tsutomu, Kumagai Kosuke, Amano Yasutaka, Fujikawa Hitomi, Isoya Eiji, Imai Shinji	4. 巻 21
2. 論文標題 Phenotypic classification of knee osteoarthritis according to pain mechanisms; a clinical observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 123-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2021.03.006	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 Kumagai Kosuke, Okumura Noriaki, Amano Yasutaka, Yayama Takafumi, Mimura Tomohiro, Maeda Tsutomu, Kubo Mitsuhiko, Mori Kanji, Barrett-Jolley Richard, Imai Shinji	4. 巻 31
2. 論文標題 Consideration of differences in drug usage between young-onset and elderly-onset rheumatoid arthritis with target of low disease activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1094-1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2021.1883251	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 Kubo Mitsuhiko, Maeda Tsutomu, Kumagai Kosuke, Amano Yasutaka, Kawasaki Taku, Imai Shinji	4. 巻 36
2. 論文標題 Good Postoperative Flexion Angle Improves Knee Function and Improvement of Flexion Angle Increases Patient Satisfaction After Total Knee Arthroplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Arthroplasty	6. 最初と最後の頁 3137-3140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.arth.2021.04.040	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 Kumagai Kosuke, Takemura Yoshinori, Okumura Noriaki, Amano Yasutaka, Yayama Takafumi, Mimura Tomohiro, Mori Kanji, Barrett-Jolley Richard, Imai Shinji	4. 巻 Nov 18
2. 論文標題 Surgical treatment of wrist joint dysfunction in rheumatoid arthritis: A report of two cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mrcr/rxab044	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 Okumura Noriaki, Kawasaki Taku, Kubo Mitsuhiko, Yayama Takafumi, Mimura Tomohiro, Kumagai Kosuke, Maeda Tsutomu, Imai Shinji	4. 巻 28
2. 論文標題 Effects of malalignment and disease activity on osteophyte formation in knees of rheumatoid arthritis patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Surgery	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2309499020911852	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 熊谷康佑 奥村法昭 天野泰孝 三村朋大 彌山峰史 前田勉 久保充彦 森幹士 川崎拓 今井晋二
2. 発表標題 高齢発症関節リウマチ(EORA)ならびに若年発症関節リウマチ(YORA) における低疾患活動性獲得の際の薬剤使用量の比較
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷康佑, 奥村法昭, 天野泰孝, 彌山峰史, 川崎拓, 今井晋二
2. 発表標題 手関節機能障害を主訴とした関節リウマチ患者に対し外科的治療が奏効した2例
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷康佑, 豊田 太, 奥村法昭, 前田 勉, 谷川仁士, 三村朋大, 彌山峰史, 斎藤英貴, 天野泰孝, 久保充彦, 今井晋二
2. 発表標題 膝関節滑膜線維芽細胞を用いた変形性関節症および関節リウマチにおける疾患別サイトカイン発現解析
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊谷康佑, 奥村法昭, 豊田 太, 前田 勉, 谷川仁士, 彌山峰史, 久保充彦, 三村朋大, 斎藤英貴, 今井晋二.
2. 発表標題 変形性関節症および関節リウマチにおける膝関節滑膜線維芽細胞でのサイトカイン発現解析
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

COVID-19対策もあり、当大学でも一時実験の制限が発生し、期間延長を行い、研究継続を行ってきた。

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	今井 晋二 (Imai Shinji) (90283556)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究分担者	豊田 太 (Toyoda Futoshi) (90324574)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	

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