

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16690

研究課題名(和文) ヒト滑膜・軟骨細胞における細胞膜イオンチャンネルを介した関節症疾患治療戦略の構築

研究課題名(英文) Construction of therapeutic strategies for arthritis via ion channels in human synovial and chondrocytes.

研究代表者

熊谷 康佑 (Kumagai, Kosuke)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50649366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は関節変性疾患の発症予防の観点から細胞の恒常性維持機構に着目し、イオンチャンネルを軸とした解析を行ってきた。培養滑膜細胞から網羅的miRNA発現プロファイリングを行った。その結果から、疾患特異的なmiRNAを同定、検証し、これに関連する滑膜増殖能についてサスペンションアレイシステムによるサイトカイン、成長因子、転写因子の網羅的解析を行った。以上よりいくつかのイオンチャンネルに標的を絞るところまでは到達することが出来たが、ヒトの細胞を扱うという点から個体差が大きく、未だ確実な結果を得るところまでは至っていない。そのため、今後の研究課題として登録/検索症例数の更なる増加が必要と考えられる。

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ン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ン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。現時点でいくつかのイオンチャンネルに標的候補を絞るところまでは到達することが出来たため、今後更なる解析が進めば、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 focused on the homeostasis maintenance mechanism of cells from the viewpoint of preventing the onset of joint degenerative diseases, and has conducted analysis centered on ion channels. Comprehensive miRNA expression profiling was performed from cultured synovial cells. From the results, disease-specific miRNAs were identified and verified, and related synovial proliferative potential was comprehensively analyzed for cytokines, growth factors, and transcription factors by the suspension array system. From the above, we were able to reach the point of narrowing down the target to some ion channels, but human cells have large individual differences and have not yet reached the point where reliable results can be obtained. Therefore, it is considered necessary to further increase the number of cases as a future research subject.

研究分野：整形外科

キーワード：変形性関節症 関節リウマチ 滑膜細胞 炎症性サイトカイン 細胞膜イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

先進国に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 (**Osteoarthritis; OA**) 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のために苦しんでおり、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、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治療方法の確立が望まれる。

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、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。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不十分なのが現状である。また近年の抗 **TNF** 製剤を中心とした生物学的製剤の登場により関節リウマチ (**Rheumatoid arthritis, 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。そのため、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し、その恒常性維持機構を備えた詳細モデルの構築は、疾患の予防や軟骨再生医療を軸とした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にある。

2. 研究の目的

膝関節を中心とした関節変性疾患 (**OA** や **RA**) は罹患者の生活の質を著しく損なっている。軟骨再生治療や **RA** の病因解明については多くのアプローチにより研究がなされているが、その方法や原因は未だ確立・解明されていない。申請者らは、関節変性疾患の病態には軟骨や滑膜といった関節構成成分の機能破綻の寄与が大きく、その原因究明には恒常性維持機構の解析が急務であると考え。本研究では、以前より解析を進めてきた細胞膜イオンチャンネルに着目し、関節構成成分の恒常性維持に関与する標的チャンネルの分子実体の解明、疾患特異的に関与する **microRNA (miRNA)** の同定と解析を行う。同時にチャンネル・シミュレーションモデル構築についても解析を進める。以上の解析結果を踏まえて、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する。

現時点で軟骨/滑膜細胞とイオンチャンネルの研究だけでもすでに 10 数種類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。同一条件で細胞容積変化に関わるイオンチャンネルを評価し、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、本研究が初めてのものである。さらにその細胞モデルを通じて (**OA/RA** を含む) 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。

3. 研究の方法

本研究では、滋賀医科大学付属病院より臨床研究許可を得た上で手術時臨床標本からの関節軟骨/滑膜から酵素処理により細胞単離を行い培養細胞作成後以下の項目について検討を行う。それぞれ正常組織 (コントロール群)、**OA** 群および **RA** 群で比較を行う。

- 1) 手術時に採取したヒト膝関節軟骨/滑膜から培養細胞を作成し実験に使用する。網羅的 **miRNA** 発現プロファイリングの結果から、疾患特異的な **miRNA** を同定、検証する。これに関連する培養細胞の軟骨増生機能や滑膜増殖能についてサスペンションアレイシステムによるサイトカイン、成長因子、転写因子の網羅的解析を行う。
- 2) **miRNA** の結果から相関する細胞膜イオンチャンネルを同定しパッチクランプ実験を用いた電気生理学的検討を行う。これらの結果より **OA/RA** の外部刺激に対する反応を確認し、病因・病態解析システムを確立する。
- 3) 疾患コントロールのシミュレーションモデルシステムの構築・臨床応用を目指し、**NSAIDs** 等薬剤を利用しその効果についても並行して研究・解析を行う。

以上より、膜イオンチャンネルと疾患特異的な **miRNA** を介した膝関節病態モデル構築を目指す。実験計画については最終的に臨床応用へとつながるよう当大学整形外科科学講座今井教授の協力の下、実験結果に合わせて適宜修正を行い、より良い結果を求めていく。

実際の実験自体は申請者本人と同講座膝関節グループとで行う。また、組織の保存や管理についてはヒト由来の細胞を扱う以上、個人情報管理および組織の少しのロスも出さないように当

講座実験助手および大学院生の協力を頂き、慎重に行っていく。その際研究結果に影響が出ないよう、手技的な問題を回避するために同大学細胞機能生理学講座の協力を得た上で遂行していく。

4. 研究成果

培養細胞から網羅的 **miRNA** 発現プロファイリングを行い、その結果から、疾患特異的な **miRNA** を同定、検証を行った。これに関連する培養細胞の軟骨増生機能や滑膜増殖能についてサスペンションアレイシステムによるサイトカイン、成長因子、転写因子の網羅的解析を行った。本研究では滑膜に関してマイクロアレイ・**ELISA** 解析を行い、その結果よりいくつかのイオンチャンネルに標的を絞るところまでは到達することが出来たが、ヒトの細胞を扱うという点から個体差が大きく、未だ確実な結果を得るところまでは至っていない。そのため、今後も登録/検索症例数の更なる増加が必要と考えられる。疾患修飾因子の検討のため、現在当院にて加療中の **RA** 患者に関しては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行い、雑誌 **Modern Rheumatology** (<https://doi.org/10.1080/14397595.2021.1883251>) に発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kumagai Kosuke, Okumura Noriaki, Amano Yasutaka, Yayama Takafumi, Mimura Tomohiro, Maeda Tsutomu, Kubo Mitsuhiro, Mori Kanji, Barrett-Jolley Richard, Imai Shinji	4. 巻 online
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 1~10
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 Okumura Noriaki, Kawasaki Taku, Kubo Mitsuhiro, 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 -
1. 著者名 Haidar Omar, O'Neill Nathanael, Staunton Caroline A., Bavan Selvan, O'Brien Fiona, Zouggar Sarah, Sharif Umar, Mobasheri Ali, Kumagai Kosuke, Barrett-Jolley Richard	4. 巻 11
2. 論文標題 Pro-inflammatory Cytokines Drive Deregulation of Potassium Channel Expression in Primary Synovial Fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1, 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.00226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Mimura Tomohiro, Shibata Kohei, Tamura Sho, Okumura Noriaki, Kumagai Kosuke, Maeda Tsutomu, Mori Kanji, Imai Shinji	4. 巻 x
2. 論文標題 Ischiofemoral impingement between the ischium and the posterior facet of the greater trochanter: A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 x
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jos.2018.08.029	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 Tanigawa Hitoshi, Toyoda Futoshi, Kumagai Kosuke, Okumura Noriaki, Maeda Tsutomu, Matsuura Hiroshi, Imai Shinji	4. 巻 14
2. 論文標題 P2X7 ionotropic receptor is functionally expressed in rabbit articular chondrocytes and mediates extracellular ATP cytotoxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Purinergic Signalling	6. 最初と最後の頁 245 ~ 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11302-018-9611-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yayama Takafumi, Mori Kanji, Okumura Noriaki, Nishizawa Kazuya, Kumagai Kosuke, Nakamura Akira, Imai Shinji	4. 巻 23
2. 論文標題 Wnt signaling pathway correlates with ossification of the spinal ligament: A microRNA array and immunohistochemical study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 26 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2017.09.024	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22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 14件)

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

1. 発表者名 Kosuke Kumagai, Noriaki Okumura, Takafumi Yayama, Tomohiro Mimura, Yuki Furuya, Tsutomu Maeda, Mitsuhiro Kubo, Taku Kawasaki, Shinji Imai
2. 発表標題 Differences in drug usage between EORA and YORA patients with target of low disease activity
3. 学会等名 EULAR 2019 Annual European Congress of Rheumatology coverage (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Kumagai, Futoshi Toyoda, Caroline Staunton, Tsutomu Maeda, Hitoshi Tanigawa, Noriaki Okumura, Shinji Imai, Richard Barrett-Jolley
2. 発表標題 Anion channel activity in chondrocytes analyzed using in vitro osteoarthritis model.
3. 学会等名 ICRS 2019 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Kumagai, Futoshi Toyoda, Mitsuhiro Kubo, Tsutomu Maeda, Hitoshi Tanigawa, Noriaki Okumura, Tomohiro Mimura, Takafumi Yayama, Hiroshi Matsuura, Shinji Imai
2. 発表標題 Cytokine-induced apoptosis in rabbit articular chondrocytes inhibited by COX-2 blocker via anion channel inactivation
3. 学会等名 ICRS 2019 World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷康佑 久保充彦 前田勉 上中一泰 荒木勸 藤川ひとみ 奥村法昭 三村朋大 川崎拓 松末吉隆 今井晋二
2. 発表標題 Navigation使用下Journey II BCSの術後短期臨床成績, 既存評価項目とキネマティクスの相関
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷康佑 豊田太 前田勉 奥村法昭 谷川仁士 久保充彦 彌山峰史 松浦博 松末吉隆 今井晋二
2. 発表標題 家兔変形性関節症モデルにおける肉眼的軟骨病変形成以前の容積感受性Cl ⁻ チャンネルの役割とその分子実体の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷康佑 久保充彦 前田勉 天野泰孝 上中一泰 荒木勸 藤川ひとみ 三村朋大 奥村法昭 川崎拓 松末吉隆 今井晋二
2. 発表標題 術中Navigation使用下Journey II BCS症例における術後1年経過時の臨床成績
3. 学会等名 第50回日本人工関節学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 N. Okumura, T. Kawasaki, T. Yayama, K. Kumagai, S. Imai
2. 発表標題 Reduction rate of rheumatoid factor reflects disease activity of rheumatoid arthritis
3. 学会等名 Annual European Congress of Rheumatology, EULAR 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Maeda, M. Kubo, K. Kumagai, K. Uenaka, S. Araki, H. Fujikawa, S. Imai, Y. Matsusue
2. 発表標題 Efficacy of the Japanese forgotten joint score-12 as an outcome measure for total knee arthroplasty in a Japanese population
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kumagai, F. Toyoda, C. Staunton, U. Sharif, R. Lewis, T. Maeda, H. Tanigawa, A. Mobasheri, R. Barrett-Jolley.
2. 発表標題 Analysis of anion channel activity in chondrocytes in vitro model of osteoarthritis
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kumagai, F. Toyoda, M. Kubo, T. Maeda, H. Tanigawa, N. Okumura, T. Yayama, H. Matsuura, S. Imai
2. 発表標題 The COX-2 selective blocker inhibit cytokine-induced apoptosis in isolated articular chondrocytes
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Tanigawa, T. Maeda, K. Kumagai, S. Imai
2. 発表標題 Effect of denosumab on bone formation marker P1NP
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Kubo, T. Maeda, K. Kumagai, S. Imai
2. 発表標題 The effect of coronal alignment on the docotr-derived outcome, patient-reported outcome, and the patient satisfaction after total knee arthroplasty
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷川 仁士, 熊谷 康佑, 前田 勉, 奥村 法昭, 豊田 太, 松浦 博, 今井 晋二
2. 発表標題 ウサギ軟骨細胞におけるATP受容体サブタイプP2X7の機能的発現 P2X7活性化を介したATP誘発性軟骨細胞障害の検討
3. 学会等名 第33回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷 康佑, 豊田 太, 前田 勉, 奥村 法昭, 谷川 仁士, 久保 充彦, 彌山 峰史, 松浦 博, 松末 吉隆, 今井 晋二
2. 発表標題 変形性関節症モデルにおける疾患発症因子としての容積感受性Cl ⁻ チャネルの役割とその分子実体の検討
3. 学会等名 第33回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kumagai, F. Toyoda, C. Staunton, U. Sharif, R. Lewis, T. Maeda, H. Tanigawa, A. Mobasher, R. Barrett-Jolley.
2. 発表標題 ANALYSIS OF ANION CHANNEL ACTIVITY IN CHONDROCYTES IN VITRO MODEL OF OSTEOARTHRITIS.
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Kumagai, F. Toyoda, M. Kubo, T. Maeda, H. Tanigawa, N. Okumura, T. Yayama, H. Matsuura, S. Imai
2. 発表標題 THE COX-2 SELECTIVE BLOCKER INHIBIT CYTOKINE-INDUCED APOPTOSIS IN ISOLATED ARTICULAR CHONDROCYTES.
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Maeda, M. Kubo, K. Kumagai, K. Uenaka, S. Araki, H. Fujikawa, S. Imai, Y. Matsusue
2. 発表標題 EFFICACY OF THE JAPANESE FORGOTTEN JOINT SCORE-12 AS AN OUTCOME MEASURE FOR TOTAL KNEE ARTHROPLASTY IN A JAPANESE POPULATION
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Kubo, T. Maeda, K. Kumagai, S. Imai
2. 発表標題 THE EFFECT OF CORONAL ALIGNMENT ON THE DOCOTR-DERIVED OUTCOME, PATIENT-REPORTED OUTCOME, AND THE PATIENT STISFACTION AFTER TOTAL KNEE ARTHROPLASTY
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Tanigawa, T. Maeda, K. Kumagai, S. Imai
2. 発表標題 EFFECT OF DENOSUMAB ON BONE FORMATION MARKER P1NP
3. 学会等名 OARSI 2018 World Congress in Osteoarthritis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷康佑 豊田太 前田勉 奥村法昭 谷川仁士 久保充彦 松浦博 松末吉隆 今井晋二
2. 発表標題 ウサギ変形性関節症モデルにおける疾患発症因子としての容積感受性CI - チャネルの役割の検討
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 K. Kumagai, F. Toyoda, T. Maeda, H. Tanigawa, N. Okumura, H. Matsuura, S. Imai
2. 発表標題 Early activation of volume-sensitive Cl ⁻ current in the rabbit knee anterior cruciate ligament transection
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

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