

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861185

研究課題名(和文)細胞膜イオンチャネルを介した軟骨細胞レベルからの変形性関節症治療戦略の構築

研究課題名(英文)Analysis of single anion channel activity in chondrocytes in vitro

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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者のグループでは変形性関節症の発症予防の観点から軟骨細胞の恒常性維持機構に着目し、イオンチャネルを軸とした解析を行ってきた。また研究期間を通じて細胞のアポトーシス誘導物質である炎症性サイトカイン(TNF-alphaとIL-1beta)を併用し疑似OAモデルを作成する事により実験を行ってきた。結果として細胞容積感受性に関わる陰イオンチャネル(特にClイオンチャネル群)についてはいくつかのチャネル分子の複合体である事が明らかとなり、今後は未だ構築途中である細胞シミュレーションモデル完成に向け更なる研究継続を行っていく。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of physiological function and construction of detailed cartilage models, including chondrocyte homeostatic maintenance mechanisms may facilitate future OA preventative treatments.

It is clear that mechanical activity of joints couples to chondrocyte metabolic activity, but the role of this coupling in OA is unknown. A simple way to mechanically disturb chondrocytes whilst simultaneously making electrophysiology from chondrocytes is to use osmotic shock. This study aimed to investigate the effects of inflammatory cytokines on functional expression of anion channels in chondrocytes. In this simple model of inflammatory OA we have discovered that an additional phenotype of ion channel becomes evident following cytokine treatment. The identity of these molecular markers is currently unknown and future experiments will use a combination of physiological, pharmacological and molecular biological techniques to identify putative changes in underlying anion channel gene expression.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 軟骨細胞 イオンチャネル 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

先進国の共通の問題である高齢化社会を迎え、関節軟骨の機能破綻による変形性関節症 (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が重要であり、新たな治療方法の確立が望まれている。

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った大きく 2 つのアプローチが存在する。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、疾患の根幹を語る上で非常に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、ほとんどの研究でその存在が無視されているのが現状である。そのため、軟骨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急務である。

なかでも、我々が以前より研究を行ってきたイオンチャンネルに着目を行い、恒常性維持シミュレーションモデル構築を行う。さらにはこの研究の結果を踏まえて関節軟骨変性疾患の病態解析システムを構築することを目標とした。

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ンネルを網羅的に扱い、その機能解析を客観的かつ定量的に行う点にある。解析・評価を行うイオンチャンネルも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。軟骨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 軟骨の解析も加えた詳細細胞解析・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 を含む) 軟骨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。

さらに当該研究は、軟骨変性疾患を扱う分

野で医学生理学と情報工学との橋渡しを行う意義を持つ。近年における情報処理分野の加速度的な発展により、どうしても狭い分野に陥りがちな実験科学と、それだけでは理論値だけが先行しがちな生体情報工学とを結びつけることで、単に軟骨の生理状態を再現するだけではなく、疾患における病態発症誘因の解析・予測を可能とする機能モデルが誕生する。国内では申請者の属する滋賀医科大学を含む様々な大学において軟骨再生の研究を i) 足場 (Scaffold (吸収性 / 非吸収性))、ii) 細胞 (幹細胞 / 軟骨細胞)、iii) 分化・成長因子 (液性因子 / 環境因子) と様々なアプローチで行っているが、いずれのグループにおいても軟骨変性疾患の病態まで十分に解析できていないのが現状である。そのため、これまで軟骨細胞の容積調節能について申請者も国内外の学会において発表・議論を重ねてきた。

軟骨細胞における恒常性維持に関わるイオンチャンネル解析、それを踏まえた細胞モデルが完成すると、臨床の現場において患者情報を自らの経験やエビデンスに基づいて行うしかほかなかった疾患予後予測や、すでに発症してしまった OA についての対症療法しか手がなかった分野に対し、定量的に病態の解析を行うことが可能となり、患者啓蒙活動や高齢化社会における QOL 確保において有用なものになると考えられる。将来的にはこの機能解析が分子レベルでの様々な研究成果を診療現場や再生医療への応用へと結びつけるのに橋渡しとして不可欠な役割を担うようになることが期待される。

3. 研究の方法

- 1) 現在までに我々が明らかにした $I_{Cl,vol}$ に加えて、国内外の大学で研究がなされており、すでに細胞の volume regulation に一部関与していると考えられている Stretch-Activated Potassium channel との相互作用についてパッチクランプ法を用いた電気生理学的検討を行う。
- 2) 上記チャンネル以外に volume regulation に関わっているとされる Aquaporins や未だ詳細が不明な TRP channel についても検討を行い、それぞれの相互作用、さらには OA モデルにおける発現の差の有無等についても検討を行う。
- 3) 軟骨細胞における恒常性維持イオンチャンネルシミュレーションモデル構築を行う。OA モデルから得られたパラメータの実装を行い、病態解析システムを確立する。

4. 研究成果

申請者のグループでは軟骨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。特に本研究では細胞のアポトーシス誘導物質である炎症性サイトカイン (TNF-alpha と IL-1beta) を併用し

疑似 OA モデルを作成する事により実験を行ってきた。研究におけるターゲットとして軟骨細胞のみならず関節構成組織である線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synoviocyte: FLS) をも利用し電気生理学アプローチだけではなく関与イオンチャネルの分子実体を明らかとする為に細胞容積変化や PCR、ELISA を併用し機能解析を行ってきた。結果として細胞容積感受性に関わる陰イオンチャネル (特に Cl⁻ イオンチャネル群) についてはいくつかのチャネル分子の複合体である事が明らかとなった

今回の研究を通じて陰イオンチャネル (特に Cl⁻ イオンチャネル群) については電流変化を中心に低浸透圧環境暴露により炎症性サイトカイン群と非暴露群 (コントロール群) 間で有意差を認めており、現時点ではさらに研究対象を軟骨細胞のみから FLS にまで拡大し、陽イオンチャネルも含め (特に TRP-family や BK チャネルを中心に) 解析を行ってきた。すでに陽イオンチャネルにおいても電流増大や遺伝子/タンパク質発現量に一部有意差を認めており、これらが OA 初期の段階で (画像所見上関節変形が確認出来ない段階で) 実際のところどのように相関しているかをリアルタイムで計測出来ないかとその実験手法について思案中である。一部実験に関しては文献を参考に siRNA の使用や各種イオンチャネル阻害剤を用いて細胞容積変化を中心に測定をする方法を検討中である。また今後は未だ構築途中である細胞シミュレーションモデル作成に関し更なる研究継続を行っていく。細胞シミュレーションモデルに関しては英国リバプール大学の Richard Barrett-Jolley 博士と協力を行い、File Maker プラットフォームを用いたイオンチャネル解析データの登録システムの立ち上げを行っている (*現在は私および英国を中心とした幾つかの大学の研究者内で試験中である)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件 査読あり)

1) Kumagai K, Toyoda F, Staunton CA, Barrett-Jolley R (9人中1番目): Activation of a chondrocyte volume-sensitive Cl⁻ conductance prior to macroscopic cartilage lesion formation in the rabbit knee anterior cruciate ligament transection osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016 Oct; 24(10): 1786-94. DOI: 10.1016/j.joca.2016.05.019.

2) Maeda T, Toyoda F, Imai S, Tanigawa H, Kumagai K, Matsuura H, Matsusue Y: Lidocaine induces ROCK-dependent membrane blebbing and subsequent cell

death in rabbit articular chondrocytes. *J Orthop Res*. 2016 May; 34(5): 754-62. DOI: 10.1002/jor.23092.

3) Araki S, Imai S, Ishigaki H, Mimura T, Nishizawa K, Ueba H, Kumagai K, Kubo M, Mori K, Ogasawara K, Matsusue Y: Improved quality of cartilage repair by bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of an osteochondral defect in a cynomolgus macaque model. *Acta Orthop*. 2015 Feb; 86(1): 119-26. DOI: 10.3109/17453674.2014.958807.

4) Shioji S, Imai S, Ando K, Kumagai K, Matsusue Y: Extracellular and intracellular mechanisms of mechanotransduction in three dimensionally embedded rat chondrocytes. *PLoS One*. 2014 Dec 5; 9(12): e114327. DOI: 10.1371/journal.pone.0114327.

[学会発表](計4件)

1) Staunton CA, Kumagai K, Thippeswamy T, Djourhi L, Barrett-Jolley R: Effects of TNF α Challenge on Sensory Neuron Ion Channel Expression and Temperature Sensitivity. *Experimental Biology San Diego*, San Diego USA, April 2016.

2) Kumagai K, Barrett-Jolley R (6人中1番目): Analysis of single anion channel activity in chondrocytes in vitro. *OARSI World Congress on Osteoarthritis*, Seattle, USA, April 2015.

3) Maeda T, Kumagai K, Matsusue Y (7人中5番目): Lidocaine induces rock dependent membrane blebbing and cell death in rabbit articular chondrocyte. *OARSI World Congress on Osteoarthritis*, Seattle, USA, April 2015.

4) Okumura N, Kawasaki T, Imai S, Kumagai K, Oda K, Matsusue Y: Reduction in Complement C3 and C4 Levels Greater with Tocilizumab as Compared to Anti-TNF in Patients with Rheumatoid Arthritis. *EULAR 2015 Rome*, Italy, June 2015.

[図書](計1件)

熊谷康佑: 機械的刺激-軟骨下組織および腱に及ぼす影響-軟骨細胞におけるイオンチャネル解析を介した細胞恒常性維持機構の解明-. *リウマチ病セミナーXXV p145-p152* 永井書店 2014年12月

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
現時点では掲載無し

6．研究組織

(1)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

(2)研究協力者

今井 晋二 (IMAI Shinji)
松浦 博 (MATSUURA Hiroshi)
豊田 太 (TOYODA Futoshi)
前田 勉 (MAEDA Tsutomu)
浦谷 洋子 (URATANI Yoko)