

<研究課題>Ca²⁺マイクロドメイン構成分子群を標的とした変形性関節症の新規治療法の開発

代表研究者 名古屋市立大学大学院薬学研究科 講師 鈴木 良明
共同研究者 名古屋市立大学大学院薬学研究科 教授 山村 寿男
名古屋市立大学大学院薬学研究科 大学院生 楯野 真也

【まとめ】

変形性関節症(OA)時の軟骨細胞では、細胞内Ca²⁺シグナル異常により軟骨変性が起こるが、その原因は不明である。本研究ではOAモデル軟骨細胞において電位依存性K⁺チャンネルの機能が有意に減少して膜電位が脱分極すること、これにより細胞内Ca²⁺濃度上昇を介した基質産生低下やOAマーカー発現上昇を引き起こされることを明らかにした。本研究成果はイオンチャンネルを標的とした新規OA治療薬の開発につながりうる。

1. 研究の目的

変形性関節症(OA)は最も一般的な関節の疾患である。関節の変形により激しい痛みを伴い、患者のQOLを著しく低下させる。国内患者数は自覚症状がある患者数は約1,000万人、自覚症状がない患者数も含めると約3,000万人と推定される。年齢とともに罹患率が上昇し、世界的に高齢化が進む中、WHOの予測では2050年までに世界中で13億人がOAに罹患するとされている。OAの主な治療法は消炎鎮痛薬などの薬物療法、人工関節置換手術、再生医療である。しかし、薬物療法は対症療法であり、手術や再生医療は失敗の危険性を伴う。そのため、薬剤による根本的な治療法の開発が求められている。

Ca²⁺は細胞死や分泌などの様々な生理機能を調節する重要なセカンドメッセンジャーである。細胞膜や細胞内小器官の膜上に発現するイオンチャンネルなどを介して細胞質内へCa²⁺が流入することで細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)が増加し、シグナル伝達が成立する。細胞膜に存在するイオンチャンネルからのCa²⁺流入には膜電位変化が重要な役割を担っている。電位依存性Ca²⁺チャンネルは細胞膜の脱分極により活性化され、細胞内へCa²⁺を流入させる。一方、TRPチャンネルなどの電位非依存性Ca²⁺チャンネルでは、細胞膜の過分極による電気化学的駆動力の増大により、細胞内へのCa²⁺流入が増加する(1)。

我々はヒト軟骨細胞株(OUMS-27)を用いた実験から、局所的なCa²⁺シグナル領域(Ca²⁺

マイクロドメイン)を形成するCa²⁺活性化K⁺チャンネルや電位非依存性Ca²⁺チャンネルの一種であるストア作動性Ca²⁺チャンネルが軟骨細胞内Ca²⁺シグナルを正に制御することを明らかにしてきた(2,3)。一方、OA時の軟骨細胞においては、脱分極により[Ca²⁺]_iを増加させる電位依存性Ca²⁺チャンネルが病態を悪化させるという報告(4-6)と、過分極により[Ca²⁺]_iを増加させる電位非依存性Ca²⁺チャンネルが病態を悪化させる(7,8)という相反する2つの報告が存在し、議論が分かれている。そこで、OAを模倣したマウス軟骨細胞において、膜電位を制御するK⁺チャンネルに着目し、OA時の膜電位変化と[Ca²⁺]_iの関係性について解明することを目指した。

2. 研究方法と経過

2-1 使用動物及びヒト組織

C57BL/6マウス(3~5週齢、雄または雌)の大腿骨頭より初代培養したマウス単離軟骨細胞を調整した。軟骨細胞は10% FBS、100 units/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを含有したD-MEM中で7~10日培養し、継代して48時間後に実験に使用した。

2-2 ヒト組織

ヒト組織はアメリカ・スクリプス研究所およびリトアニア・State Research Institute Center for Innovative Medicineより提供を受けた。

2-3 定量的リアルタイムPCR法

AGP法を用いてマウスまたはヒト軟骨細胞から総RNAを抽出した。総RNAからReverTra Ace qPCR Master Mix with gDNA remover (TOYOBO)を用いてcDNAを合成した。SYBR Green法とLightCycler 96 (Roche)を用いて定量的リアルタイムPCR解析を行った。

2-4 [Ca²⁺]_i測定法

軟骨細胞にCa²⁺蛍光指示薬であるfura2-AMあるいはfluo4-AMを導入してCa²⁺

濃度変化を観察した。Fura2の蛍光測定には、高速冷却 CCD カメラ蛍光イメージングシステム ARGUS/HiSCA (Hamamatsu Photonics) を、fluo4の蛍光測定には、共焦点蛍光顕微鏡 (A1R ; Nikon) を用いた。

2-5 ホールセルパッチクランプ法

軟骨細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、細胞膜電流および細胞膜電位を測定した。使用した溶液の組成は以下の通りである。
細胞内液 (mM) : 2 Na₂ATP, 140 KCl, 4 MgCl₂, 10 HEPES, 0.05 EGTA, pH 7.2 with KOH
細胞外液 (mM) : 137 NaCl, 5.9 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, 14 Glucose, pH 7.4 with NaOH

2-6 免疫染色

軟骨細胞を 4 % パラホルムアルデヒドで固定した。Kv1.6 抗体 (1:200; ab21089, Alomone)、0.2 % Triton X-100、1 % Bovine serum albumin を含有した PBS 溶液中で一晩処置した (4°C)。洗浄後、Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (1:1000; A11008, Invitrogen) で 1 時間処置した (室温)。洗浄後、共焦点蛍光顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した。

広島大学 味八木 茂 先生よりマウス膝関節組織切片的の提供を受けた。上記の Kv1.6 抗体および VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit を用いて免疫染色を行った。

2-7 遺伝子導入

マウス心臓の cDNA から Kv1.6 の遺伝子を単離し、pcDNA3.1 にクローニングした。リポフェクタミン 2000 を用いて遺伝子導入を行った。導入マーカーとして mCherry を用いた。遺伝子導入後 48 時間で実験を行った。

2-8 統計解析

実験より得られたデータは、平均値±標準誤差として示した。2 群間の平均値の差の検定には F 検定を用いて等分散を示した後に Student の t 検定を行った。多重比較検定には Tukey の多重比較法を用いた。図中の*や#は危険率 5 %、**や##は危険率 1 %で有意差があることを示した。

3. 研究の成果

OA 環境下の軟骨細胞を模倣するため、OA 時に分泌される 5 ng/mL IL-1βで軟骨細胞を処置した。IL-1βで処置した軟骨細胞では、OA マーカーである IL-6、MMP-13、ADAMTS5

の mRNA 発現量が増加し、OA 軟骨細胞と同様に [Ca²⁺]_i が増加していることから、OA 環境下の軟骨細胞を模倣できたと考えた。

この IL-1βの K⁺チャネル機能発現に対する影響を調べるため、K⁺チャネル非特異的阻害薬であるテトラエチルアンモニウム (TEA) を用いて K⁺電流を測定した (図 1)。その結果 IL-1β処置細胞では、①5 mM TEA 感受性 K⁺電流が減少した、②静止膜電位が脱分極した、③TEA による脱分極も減少した。以上より、IL-1β処置細胞では TEA 感受性 K⁺チャネルの機能的な発現が低下していることが明らかになった。

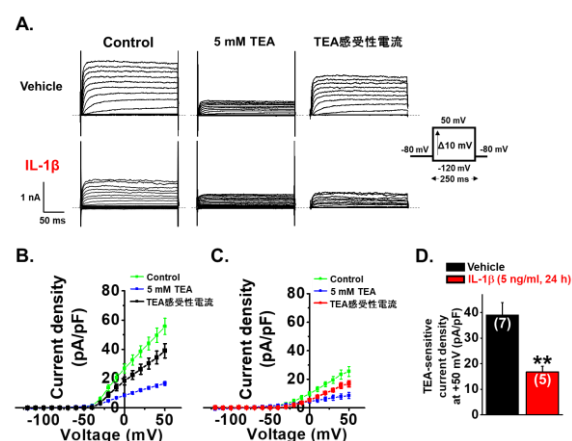


図 1 軟骨細胞の TEA 感受性 K⁺電流解析

A : IL-1β未処置 (Vehicle) 及び IL-1β処置したマウス軟骨細胞における TEA 処置前の電流 (左)、5 mM TEA 処置後の電流 (中央)、5 mM TEA 感受性電流 (右) の電流原図を示した。保持電位 -80 mV より、-120 mV から +50 mV まで 10 mV 間隔で 250 ms の脱分極刺激を 5 s 毎に与え、電流を測定した。B : IL-1β未処置軟骨細胞における TEA 処置前の電流 (緑)、5 mM TEA 処置後の電流 (青)、5 mM TEA 感受性 K⁺電流 (黒) の電流電圧曲線を示した。C : IL-1β処置した軟骨細胞における TEA 処置前の電流 (緑)、5 mM TEA 処置後の電流 (青)、5 mM TEA 感受性 K⁺電流 (赤) の電流電圧曲線を示した。D : IL-1β未処置及び IL-1β処置したマウス軟骨細胞における +50 mV での TEA 感受性 K⁺電流を示した。

次に、TEA 感受性 K⁺チャネルの分子実体を検討するため、電位依存性 K⁺チャネルファミリーの mRNA 発現解析を行ったところ、IL-1β処置細胞では Kv1.6 の mRNA 発現が減少した。また、IL-1β処置細胞では Kv1.6 特異的阻害薬である 10 nM α-デンドロトキシン (DTX) 感受性の電流も減少したことから、TEA 感受性 K⁺チャネルは Kv1.6 が担うことが示唆された。さらに、IL-1β処置細胞に Kv1.6 を過剰発現させたところ、①IL-1β処置により上昇した [Ca²⁺]_i が減少した、②IL-6 の mRNA 発現量が減少した、③IL-1β処置により減少した II 型コラーゲンの mRNA 発現量が増加した。電位依存性 Ca²⁺チャネル阻害薬を用いた実験からも

同様の結果が得られた(図2)。以上より、IL-1 β は軟骨細胞の Kv1.6 発現を減少させ、細胞膜の脱分極を引き起こし、Ca²⁺流入を亢進させることで IL-6 を産生し、II型コラーゲン産生を低下させることが示唆された。

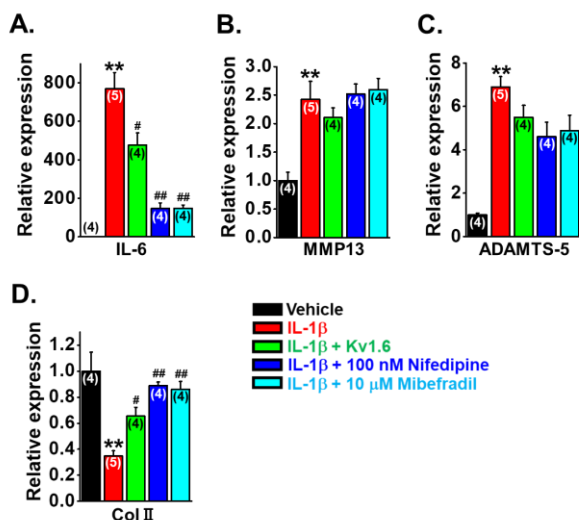


図2 Kv1.6の減少とOAマーカー、Col II発現の関係

A-C: IL-1 β 未処置 (Vehicle)、IL-1 β 処置、IL-1 β 処置+Kv1.6 過剰発現、IL-1 β 処置+100 nM Nifedipine、IL-1 β 処置+10 μ M Mibefradil のマウス軟骨細胞における IL-6、MMP13、ADAMTS-5 の mRNA 発現量を示した (**p<0.01 vs. vehicle、#p<0.05 vs.IL-1 β 、##p<0.01 vs. IL-1 β)。D: IL-1 β 未処置、IL-1 β 処置、IL-1 β 処置+Kv1.6 過剰発現、IL-1 β 処置+100 nM Nifedipine、IL-1 β 処置+10 μ M Mibefradil のマウス軟骨細胞における Col II の mRNA 発現量を示した (**p<0.01 vs. vehicle、#p<0.05 vs.IL-1 β 、##p<0.01 vs.IL-1 β)。

最後に、外科的手術により作製した OA モデルマウスや OA 患者由来の軟骨細胞における Kv1.6 の発現量を測定した結果(図3)、これらの組織・細胞でも Kv1.6 の発現が低下することが明らかになった。

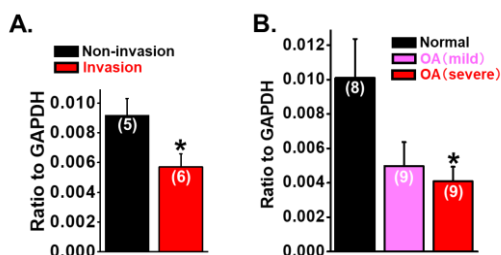


図3 OA患者におけるKv1.6の発現解析

A: OA患者の非侵襲関節軟骨細胞(Non-invasion)及びOA患者の侵襲関節軟骨細胞(Invasion)におけるKv1.6のmRNA発現量を示した。B: 健常者(Normal)、軽度のOA患者(Mild)、重度のOA患者(Severe)の膝関節軟骨細胞におけるKv1.6のmRNA発現量を示した (*p<0.05 vs. normal)。

本研究により、IL-1 β 処置を行うことでOA環境下を模倣した軟骨細胞では、Kv1.6の機能的発現が低下することが明らかになった。Kv1.6の機能低下は、細胞膜を脱分極させるこ

とで電位依存性Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入を促進させる。過剰に流入したCa²⁺はIL-1 β 下流のCa²⁺依存性転写経路(7,9-12)を活性化させ、IL-6産生亢進やII型コラーゲン産生抑制によりOA形成メカニズムの一端を担っていると推測される(図4)。本研究の成果はKv1.6を標的とした新規OA治療薬の開発につながる重要な知見となることが期待される。

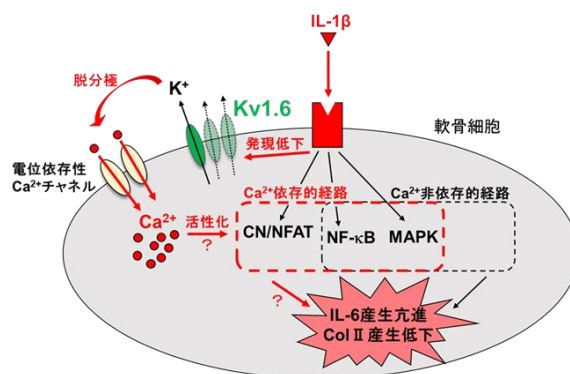


図4 本研究成果のまとめ

IL-1 β によるKv1.6の機能的発現の低下は、①細胞の脱分極⇒②電位依存性Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入の促進⇒③IL-1 β 下流のCa²⁺依存性転写経路の亢進⇒④IL-6転写誘導、Col2転写抑制、などによりOA形成メカニズムの一端を担っていると推測される。

4. 今後の課題

本研究で未解明な点として、①IL-1 β がKv1.6のmRNAを減少させるメカニズム、②IL-1 β による膜脱分極後に[Ca²⁺]_i上昇を引き起こすCa²⁺チャネルの分子実体、③[Ca²⁺]_i上昇がIL-6発現誘導やCol2発現抑制を引き起こすメカニズム、などが挙げられる。今後、Kv1.6発現を回復させる方法の開発およびそのOA治療に対する有用性を細胞・組織・個体レベルで検証する必要がある。また、[Ca²⁺]_i上昇を引き起こすCa²⁺チャネルの阻害薬のOA治療法としての有用性も同時に解明していく必要がある。

5. 研究成果の公表方法

1. 楯野真也、鈴木良明、今泉祐治、山村寿男 「マウス軟骨細胞におけるIL-1 β 誘発性TEA感受性K⁺電流の減少」日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2019、2019年11月10日(愛知) ;H-6
2. Shinya Tateno, Yoshiaki Suzuki, Yuji Imaizumi, Hisao Yamamura "IL-1 β decreases TEA-sensitive potassium channels in mouse articular chondrocytes." The 50th NIPS International Symposium MIRACLES

6. 引用文献

1. Gueguinou, M., Chantome, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., and Potier-Cartereau, M. (2014) K_{Ca} and Ca^{2+} channels: the complex thought. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2322-2333
2. Suzuki, Y., Ohya, S., Yamamura, H., Giles, W. R., and Imaizumi, Y. (2016) A New Splice Variant of Large Conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) Channel alpha Subunit Alters Human Chondrocyte Function. *J Biol Chem* **291**, 24247-24260
3. Inayama, M., Suzuki, Y., Yamada, S., Kurita, T., Yamamura, H., Ohya, S., Giles, W. R., and Imaizumi, Y. (2015) Orai1-Orai2 complex is involved in store-operated calcium entry in chondrocyte cell lines. *Cell Calcium* **57**, 337-347
4. Yao, J., Long, H., Zhao, J., Zhong, G., and Li, J. (2020) Nifedipine inhibits oxidative stress and ameliorates osteoarthritis by activating the nuclear factor erythroid-2-related factor 2 pathway. *Life Sci*, 117292
5. Boileau, C., Martel-Pelletier, J., Brunet, J., Schrier, D., Flory, C., Boily, M., and Pelletier, J. P. (2006) PD-0200347, an $\alpha_2\delta$ ligand of the voltage gated calcium channel, inhibits in vivo activation of the Erk1/2 pathway in osteoarthritic chondrocytes: a $PKC\alpha$ dependent effect. *Ann Rheum Dis* **65**, 573-580
6. Srinivasan, P. P., Parajuli, A., Price, C., Wang, L., Duncan, R. L., and Kirn-Safran, C. B. (2015) Inhibition of T-Type Voltage Sensitive Calcium Channel Reduces Load-Induced OA in Mice and Suppresses the Catabolic Effect of Bone Mechanical Stress on Chondrocytes. *PLoS One* **10**, e0127290
7. Wei, Y., Jin, Z., Zhang, H., Piao, S., Lu, J., and Bai, L. (2018) The Transient Receptor Potential Channel, Vanilloid 5, Induces Chondrocyte Apoptosis via Ca^{2+} $CaMKII$ -Dependent MAPK and Akt/ mTOR Pathways in a Rat Osteoarthritis Model. *Cell Physiol Biochem* **51**, 2309-2323
8. Yin, S., Zhang, L., Ding, L., Huang, Z., Xu, B., Li, X., Wang, P., and Mao, J. (2018) Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) mediates IL-1 β -induced apoptosis in rat chondrocytes via calcium overload and mitochondrial dysfunction. *J Inflamm (Lond)* **15**, 27
9. Sugita, S., Hosaka, Y., Okada, K., Mori, D., Yano, F., Kobayashi, H., Taniguchi, Y., Mori, Y., Okuma, T., Chang, S. H., Kawata, M., Taketomi, S., Chikuda, H., Akiyama, H., Kageyama, R., Chung, U. I., Tanaka, S., Kawaguchi, H., Ohba, S., and Saito, T. (2015) Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 3080-3085
10. Little, C. B., Hughes, C. E., Curtis, C. L., Jones, S. A., Caterson, B., and Flannery, C. R. (2002) Cyclosporin A inhibition of aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Arthritis Rheum* **46**, 124-129
11. Yoo, S. A., Park, B. H., Yoon, H. J., Lee, J. Y., Song, J. H., Kim, H. A., Cho, C. S., and Kim, W. U. (2007) Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **56**, 2299-2311
12. Yao, W., Han, Q., Wang, L., and Niu, Z. (2018) Ropivacaine relieves pain and prevents chondrocyte degradation probably through Calcineurin/NFAT1 signaling pathway in osteoarthritis rats. *Eur J Pharmacol* **818**, 518-524