

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：33802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22890214

研究課題名（和文）新規関節リウマチ治療としての光線力学療法

研究課題名（英文）Photodynamic therapy: A new treatment for rheumatoid arthritis

研究代表者

影山 康德（KAGEYAMA YASUNORI）

浜松大学・保健医療学部理学療法学科・教授

研究者番号：50324348

研究成果の概要（和文）：関節リウマチ(RA)の病像の首座は関節滑膜にあることから、RA の治療において滑膜切除術が行われている。今回、人体への侵襲が比較的少ない治療法である光線力学療法(フォトダイナミックセラピー) (PDT)を RA 患者の滑膜切除へ応用することを目指して基礎研究を行った。PDT を行う際の光感受性物質として ATX-S10(Na)、フォトフリン、5-aminolevurinic acid (5-ALA)を使用し、RA 培養滑膜細胞に PDT を行ったところ、すべての光感受性物質において PDT 効果を認めた。RA の動物モデルであるマウス II 型コラーゲン関節炎モデルにおいて、フォトフリン、5-ALA を投与した後、2～3 時間で関節に 405 nm のレーザー光を照射し、蛍光を測定した結果、関節組織に蛍光は見られたものの、関節炎を発症した部位と発症していない部位における蛍光強度に明らかな差が見られなかった。従って前述の光感受性物質の使用における動物実験では、PDT を滑膜切除に応用するにはまだ解決すべき問題点があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Because the main focus of rheumatoid arthritis (RA) is synovial membranes, synovectomy has been carried out for the treatment of RA. Now we performed basic research to aim to make application of photodynamic therapy (PDT), which is relatively few damage to the human body, to synovectomy in patients with RA. We performed PDT to cultured synovial cells from RA using ATX-S10(Na), Photofrin, and 5-aminolevurinic acid (5-ALA) as photosensitizers. The PDT effect of all photosensitizers was obtained. Type II collagen-induced arthritis of mice is an animal model of RA. In this model, the fluorescence of the joints under the excitation of 405 nm laser was measured at 2-3 hours after administration of Photofrin or 5-ALA. Although the fluorescence was detected in the all joints, the significant difference in fluorescence intensity between in arthritic joints and in non-arthritic joints was not seen. The application of PDT by using Photofrin and 5-ALA to synovectomy in the experimental animal model has been considered to have some problems to solve.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計

2010年度	1,070,000	312,000	1,382,000
2011年度	680,000	204,000	884,000
総計	1,750,000	516,000	2,226,000

研究分野：関節リウマチ

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節リウマチ、光線力学療法、PDT、5-aminolevurinic acid

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) の滑膜は血管増生と種々の細胞浸潤からなる炎症を生じ、関節破壊の主役を演じていることから、従来より RA の治療法として滑膜切除術が行われてきた。しかし、これは手術侵襲を伴い、麻酔困難の患者にとって大きなリスクとなる。近年、生物学的製剤治療 (抗サイトカイン療法) は RA の治療に革新的な成果をあげているが、一方でその合併症である感染症の発生が大きな問題となっている。特にもともと肺その他の臓器に感染病巣を保有もしくはその既往をもつ RA 患者では生物学的製剤の投与が困難で、このような患者の治療は依然として難渋している。そこで我々は新しい治療法として光線力学療法 (PDT) を RA 患者治療に応用することを考えた。PDT は組織に取り込まれた光感受性物質 (光センシタイザー) とレーザー光の相互作用により腫瘍を破壊するため、PDT の効果発現には、まず投与した光感受性物質が目的とする組織に取り込まれることが必須となる。我々は肺癌治療などへ臨床応用されているタラポルフィン Na の培養滑膜細胞への添加実験において、RA 患者の関節から得られた培養滑膜細胞は変形性関節症患者由来の培養滑膜細胞と比べてより高いタラポルフィン Na の取り込みがあることを確認しており、さらに関節炎モデルでの動物実験において PDT の有効性を示してきた (Clin Rheumatol. 27:751-761, 2008)。

2. 研究の目的

今までの基礎実験より RA に対するタラポルフィン Na による PDT の有効性の可能性は確かめているが、それ以外の光感受性物質を使用して PDT を行い、RA の治療においてより有効性が高く、副作用が少ない光感受性物質を同定し、RA における PDT 応用のための基礎データをえることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

RA 患者のインフォームドコンセントのもと、人工関節置換術の手術時に関節滑膜を採取した。これをコラゲナーゼ処理後、培養した。本研究では ATX-S10 (Na)、フォトプリンあるいは 5-aminolevurinic acid (5-ALA) を培養細胞へ投与し、レーザー光を照射した。その前後でミトコンドリア膜電位の変化、ヘキスト 33342 染色、アクリジンオレンジ-エチジウムブロマイド染色、電子顕微鏡撮影を行った。さらに MTT アッセイにて PDT における細胞障害度を検討した。加えて光感受性物質の細胞内小器官への取り込み部位についても検討した。対照細胞として HeLa 細胞を用い、同様の実験を行った。さらに RA の疾患モデルであるコラーゲン誘導関節炎モデル (DBA 1/J マウスを II 型コラーゲンで 2 回免疫し、関節炎を発症させる) を用い、このマウスに光感受性物質を静脈内投与もしくは

は腹腔内投与し、一定時間後に 405 nm のレーザー光を関節炎発症関節、非発症関節に照射し、その蛍光量からの光感受性物質の関節内への取り込み量を測定した。

4. 研究成果

RA 培養滑膜細胞では ATX-S10(Na)、フォトフリン、5-ALA いずれの光感受性物質においても、レーザー光照射後、ミトコンドリア膜電位の低下を認め、ヘキスト 33342 染色、アクリジンオレンジ-エチジウムブロマイド染色、電子顕微鏡像では光感受性物質の各種濃度、各種照射エネルギー量においていずれの条件でも細胞のネクロシス変化を認めた。MTT アッセイではいずれの光センシタイザーにおいても、濃度依存性に殺細胞効果を認めしたが、5-ALA では PDT 殺細胞効果が得られにくい傾向にあった。HeLa 細胞では ATX-S10(Na)、フォトフリンの使用にて細胞のアポトーシスを認め、5-ALA では細胞のネクロシスを認めており、RA の培養滑膜細胞と HeLa 細胞の PDT での殺細胞機序は異なっていた。光感受性物質の細胞内小器官への取り込み部位についての検討では、ATX-S10(Na)はライソゾーム中心に取り込みが見られ、5-ALA はミトコンドリアのみでなく、他の部位にも取り込みが見られ、その部位の詳細については現在検索中である。

コラーゲン関節炎マウスの腹腔内へフォトフリン、5-ALA を投与した後、2～3時間後に関節の蛍光を測定した結果、関節組織に蛍光は見られたものの、関節炎を発症した部位と発症していない部位における蛍光強度に明らかな差が見られず、動物実験において PDT を行うべき至適条件設定はまだできていない。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1) 第 21 回日本光線力学学会
担腫瘍ヌードマウスを用いた ALA-PDT の combined therapy モデルの研究
吉田孝人、河野栄治、金田雅充、井上克司、影山康徳、福司康子、寺川進 2011. 7. 2-3

2) 第 117 回中部日本整形外科災害外科学会
関節リウマチ培養滑膜細胞に対する光線力学療法 (PDT) の効果
影山康徳、鳥養栄治、小林勇人
2011. 10. 28-29

3) 第 32 回日本レーザー医学会総会
Novel 5-ALA-PDD/PDT combined therapy モデルの開発研究
吉田孝人、河野栄治、金田雅充、井上克司、石井拓也、影山康徳、福司康子、寺川進
2011. 11. 24-25

[図書] (計 0 件)

[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◇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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山康德 (KAGEYAMA YASUNORI)
浜松大学・保健医療学部理学療法学科・
教授
研究者番号：50324348

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：