

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 25日現在

機関番号：37111
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23890240
 研究課題名（和文） フラーレンによる遺伝子導入を用いた変形性関節症の新規治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of new Treatments for Osteoarthritis using Gene Transfer by Fullerene
 研究代表者
 大谷 泰志（OHTANI TAISHI）
 福岡大学・医学部・助教
 研究者番号：90609504

研究成果の概要（和文）：変形性関節症への水溶性フルラーレンによる新規治療法の開発を目的として研究をスタートした。HIG-82 細胞に対し、培養液中に水溶性フルラーレンを添加し反応を見たところ、高濃度域での細胞増殖の抑制傾向が見られたが有意ではなかった。培養上清中の炎症性サイトカインを ELISA にて測定したところ、変化は見られなかった。培養液中にサイトカインが累積しており、炎症性の滑膜細胞のみでの抗炎症効果の確認に追試が必要な結果であった。今後、正常滑膜細胞と炎症性滑膜細胞の比較、正常細胞へのメカニカルストレス等による炎症を惹起させての抗炎症効果を研究していく予定である。

研究成果の概要（英文）：Research for the purpose of a new treatment method using soluble fullerene to osteoarthritis was started. Soluble fullerene was added to the culture medium. Reaction of HIG-82 cells was observed. Trends suppression of cell proliferation was observed in the high density region. But it was not significant. Inflammatory cytokines in culture supernatants was measured by ELISA. However, the variation was not observed. These may be due to cytokine in the culture medium. It is necessary to consider the method of measurement. Only synovial inflammatory cells that confirm the anti-inflammatory effect of fullerene difficult have been found. Future comparison of inflammatory synovial cells and normal synovial cells is needed. In addition, it is expected to be added to the mechanical stress on normal synovial cells, on it, will continue to study the anti-inflammatory effect of the fullerene.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：変形性関節症 治療法 フラーレン ナノカーボン HIG-82 局所投与 ウサギ滑膜細胞

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は、関節軟骨の変性と滑膜炎ならびに、軟骨・骨の増殖に基づく進行性の関節変性疾患である。その日本における患者数は変形性膝関節症でも 700 万人と言われ、調査によっては数千万人が罹患しているとされる。加齢に伴い発症することも多く、老化現象として捉えられることが多いが、進行例では著しく QOL を損なう疾患であり、さらに変形性関節症のために活動性が落ちることで他の様々な疾患の誘引ともなりうる。

このように国民の健康な生活のために大きな問題となる疾患でありながら、患者の QOL を向上させられるような治療薬や治療法は未だ完成していないとされる。変形性関節症の治療が可能になれば、高齢社会における加齢変化自体についての概念が変わっていくとも推察され、その治療法の開発は非常に有意義なものである。これまでにウサギ抗原誘発関節炎モデルを用いた関節疼痛と関節変性についての研究をかねてより行なっており、報告してきた。また、さまざまな関節変性における研究成果も挙げられている。これまでの研究成果を踏まえた上で、研究を次の段階に進め、治療法の開発を行なっていく段階に来ているのではないかと考えられる。

今研究では、関節疼痛と関節変性の両方を制御可能な新しい変形性関節症の治療法として、C60 フラーレンに着目した。ナノカーボン素材であるフラーレンは炭素原子からなる格子状の分子であり、様々な分野でその応用が期待されている。特に、その抗酸化能は、活性酸素が媒介となる生体内での有害事象にたいする応用が期待されている。しかし一方で、フラーレンそのものは化学的・物理的に安定性の高い物質であるが、そのために応用がしづらく、また体内への蓄積の問題などもあり、細胞実験による基礎的な部分からフラーレンについては研究がなされる必要がある。

今研究にはフラーレンのなかでも水溶性フラーレンを用いることとした。これにより、注射用水や生理食塩水を用いて応用することができ、治療法として開発しやすいと考えた。

フラーレンによる、強力な抗酸化作用は、細胞環境を整え、細胞機能を維持し増強させる作用を有するとこれまでの報告で示唆されている。昨今、フラーレンは本研究が対象としている変形性関節症ばかりでなく、がんやその他の炎症性疾患および加齢に伴う様々な病態・疾患の治療に役立つのではないかと期待されている。

2. 研究の目的

これまで変形性関節症に対する治療は、非ステロイド性消炎鎮痛剤の内服や副腎皮質ステロイドの内服、あるいは関節洗浄やヒアルロン酸製剤の関節内注入等により、痛みや炎症を抑える治療が中心であった。その効果をみていくと、必ずしも対症療法であると言い切れる効果ばかりではなかったものの、根治的な治療として有効な薬剤は存在していなかったと言える。

我々のこれまでの成果に、ウサギ抗原誘発関節炎モデルにおける、分子標的薬である抗 TNF- α 抗体の関節腔内局所注射による、関節炎の抑制作用についてみたものがある。抗 TNF- α 抗体製剤は主として全身投与によりリウマチ性疾患を始めとする炎症性疾患に用いられている薬剤である。局所投与におけるその効果についての研究成果であり、一定の抗炎症性作用が確認された。これにより、水溶性フラーレンの局所投与による抗炎症作用は期待できると考える。より安全な投与方法は、フラーレン自体の安全性の検討と主に庵が得なければならない。

また TNF- α は炎症性サイトカインとして上流に位置するものである。リウマチ性疾患などに抗 TNF- α 抗体製剤や受容体製剤は応用されており、これら薬剤の効果は非常に優れたものであるが、やはり対症療法として域を出ることはできないものでもある。また、サイトカインは全身において様々な反応に関与する分子であり、抗炎症効果が得られる一方で易感染性になるなどの問題点も示唆されている。

フラーレンによる抗酸化作用による抗炎症作用・抗変性作用については、化学的にはほぼ証明されているものである。しかし、この作用だけでは、前述の抗炎症性サイトカインがそうであるように、対症療法としてすぐれた効果があらわれるにとどまるものと思われる。その物質としての安定性から局所にとどまり続けることで長期的な効果が期待できる向きもあるが、水溶性フラーレンがそうであるように、修飾を施すことで根治的あるいは長期的効果を併せ持たせることができる可能性がある。

本研究では、水溶性フラーレンそれ自体の細胞に対する作用と副作用（有害事象）の検討から、作用の細胞局在性による差を検討し、最終的には抗炎症性サイトカイン遺伝子の導入についてフラーレンをベクターとして用い、超音波遺伝子導入法などにより遺伝子導入を図ることで、対症療法としての抗炎症作用のみでなく、それ以後の変形性関節症の予防についての可能性までも検討することにある。

3. 研究の方法

本研究においては水溶性フラブレン自体の細胞への影響の解析とその抗炎症作用が細胞に対して有効であるか確認する必要があるため、In vitroでの実験系を設計した。この実験系は、以後の研究における水溶性フラブレンの投与濃度の設定の予備実験も兼ねている。これはもちろんヒトへの投与量にそのまま使えるものではないが、動物モデル実験としてウサギ抗原誘発関節炎を用いる計画であるため、ウサギ由来の滑膜細胞であるHIG-82を細胞株として選択した。

抗炎症作用をみるためにHIG-82細胞に対し、リゾホスファチジン酸を用いて炎症を惹起する方法を選択した。10%胎仔ウシ血清(FBS)および抗生物質(100microg/ml ペニシリン、100U/ml ストレプトンマイシン)を加えたHam's F12培地で培養した。播種および培地転換時にリゾホスファチジン酸10 microMおよび水溶性フラブレン0.1 microM、1 microM、10 microM、40 microM 100 microMを、リゾホスファチジン酸と同時に0.1% fatty acid free bovine serum albuminを含むHam's F12培地に添加した。培養上清は6時間後、12時間後、24時間後に回収し、ELISA Kit (R&D system corp.)を用いてTNF- α 、IL-1b、PGE2の濃度を測定した。これを実験群とし、対照群としては水溶性フラブレンのみを加えた群、リゾホスファチジン酸のみを加えた群を設定した。

これにより水溶性フラブレンの抗炎症作用の確認と細胞継代系における安全性を観察することとした。

4. 研究成果

HIG-82細胞に対するリゾホスファチジン酸による炎症の惹起により、炎症性サイトカインの発現が確認された。

水溶性フラブレンを加えた場合、40 microM 100microMと、高濃度域でのHIG-82細胞の増殖抑制の傾向が見られたが有意ではなかった。また、リゾホスファチジン酸の添加により細胞増殖についてばらつく印象をうけた。これについても統計学的有意差はみられなかった。

しかしながら、これらの傾向がリゾホスファチジン酸や水溶性フラブレンの存在による細胞への有害事象であるのか、統計学上許容される無意な差であるのかの確認は、今後実験を続ける上で確認しなければならない大きな課題であると言える。

併せて施行した培養上清中の炎症性サイトカインの測定では、フラブレンの濃度変化による群内差、細胞培養の時間経過による群間差は観察することができなかった。これは、

本実験における炎症の惹起による培養液中に産生されるサイトカインが抗酸化作用による抑制を上回っている可能性が最も考えられる。が、時間依存的に増していくサイトカインが累積していることもあるため、測定時間における培養上清中に含まれているサイトカインの量が多すぎる可能性も考えられた。とくに細胞株においては細胞増殖のためこれらのサイトカインの発現が亢進している場合もあり、これらのため、滑膜細胞からの炎症性サイトカインの測定についてはRT-PCR やウェスタンブロット法による追試が必要であるとおもわれる結果となった。

一方で、炎症性滑膜細胞の継代系では、細胞自体が炎症発現していることもあり、本研究の方法と目的が適さない可能性も示唆される。こうした問題や課題は新規研究においては避けては通れない点であると考えられ、現在までの研究では、目的に適う実験系構築のための課題が浮き彫りになったことが成果といえる。

現時点において、論文発表に足るような研究成果が得られているとはいいがたいが、これまでに明らかになった問題点とともに、継続した研究が行える環境を整えることはできており、研究のスタートとしての成果は挙げられたと言える。

今後の研究として、正常滑膜細胞と炎症性滑膜細胞の比較を行う必要がまずあげられる。特に水溶性フラブレンの存在下での細胞活性の比較は非常に重要な課題である。また、炎症を惹起させる方法として、滑膜細胞に対しメカニカルストレスを加える方法をとることで他の化学物質の存在しない状態での水溶性フラブレンの抗炎症効果を観察する必要もあると思われる。他方で、動物モデル実験への応用もさることながら、ヒトへの応用を念頭にヒト由来の正常滑膜細胞や関節炎滑膜細胞に対する水溶性フラブレンの存在下における影響と効果を研究していく予定である。

また、フラブレンによる活性酸素の阻害作用をより安定させるため、ユビキノンを併用することで平衡作用が維持できる可能性も化学的に考えられ、今後更に研究を行う予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 泰志 (OHTANI TAISHI)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90609504

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：