

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861989

研究課題名(和文)水溶性フラーレン/ユビキノンをを用いた変形性関節症の新規局所療法の開発

研究課題名(英文)Development of new Treatments for osteoarthritis using water-soluble fullerene / ubiquinone

研究代表者

大谷 泰志(OHTANI, TAISHI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90609504

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)：変形性関節症への水溶性フラーレンを用いた新規治療法の開発を目的として研究をスタートした。ヒト滑膜細胞に対し、培養液中に水溶性フ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。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、減少が見られた。正常滑膜細胞と炎症性滑膜細胞の比較では、炎症性滑膜細胞では有意な減少は見られなかった。今後は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、動物実験での組織における抗炎症性効果とフラーレンの代謝を研究する予定である。

研究成果の概要(英文)：When water soluble fullerene for osteoarthritis. Water soluble fullerene for osteoarthritis. Occurrence in the culture medium, there was a tendency to suppress cell proliferation in the high Concentration range. When inflammatory cytokines in the culture supernatant measured by ELISA, not observed in inflammatory synovial cells in comparison normal and synovial membrane cells and inflammatory synovial cells. Inflammatory effect by inducing inflammation due to mechanical stress etc. on normal cells, anti-inflammatory effect in tissues in animal experiments and metabolism of fullerene.

研究分野：医歯薬学

キーワード：変形性関節症 水溶性フラーレン ナノカーボン ユビキノ

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症の患者は国内において少なくとも約 1000 万人いるといわれている。変形性関節症は徐々に進行する退行性疾患であり、股、膝、椎間などの体重を支える関節に発生する。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。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。

そして咀嚼機能をつかさどる顎関節においても変形性関節症が存在する。顎関節は他の関節とは異なり、関節面は硝子軟骨を有さず線維性組織の被覆で構成されているが、顎関節の被覆線維は関節軟骨に似てほぼ同様の機能的要求に応じている。顎関節において、多様な因子による反復性微小外傷などが変形性関節症の病因に関連することが示唆されており、これら様々なメカニカルストレスによる負荷により、虚血-再灌流現象が起こり、その際に発生するフリーラジカルが直接的、あるいはサイトカインネットワークを介し間接的に関節破壊を引き起こすと考えられている。

これまでフリーラジカルの一つであり、強力な炎症反応物質である一酸化窒素 (NO) が顎関節症患者において上昇していること、炎症サイトカインが NO と密接に関連していること、成熟ウサギの抗原誘発慢性顎関節炎モデルの滑膜表層細胞において、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が強く発現していることが見出されてきた。このように、変形性顎関節症の病因とされるフリーラジカルによる酸化が関節構成細胞の活性・寿命の低下や機能の低下に関連していることが明らかとなっており、この疾患成立に関与する酸化ストレスを抑制する研究がなされている。

ナノカーボン素材のフラレンは強い抗酸化作用を持つ。フラレン(C60)は 1985 年に発見された比較的新しい炭素の同位体であり、球状の形態をした直径約 0.7 ナノメートルのクラスターで、化学的、熱的に安定しており壊れにくく、活性酸素やラジカルを消去する作用が報告されている。1 個のフラレン分子には二重結合が 30 個あり、この結合が解けて活性酸素と結びつくことで強力に活性酸素を取り除く。近年、フラレンのその優れた生体活性を利用した医薬品の研究が精力的に行われている。ラジカル消去能力を生かしたものの、その分子の形を利用したものなど方法は様々だが、癌転移抑制、脳内疾患 (アルツハイマー、パーキンソン病)

治癒、HIV 治癒、C 型肝炎治癒などの有用な研究成果が続々と報告されている。変形性関節症の分野では、聖マリアンナ医科大学のグループが動物モデルでフラレンが関節の変形を半分以下に抑えたとの報告があるのみで、他関節とは異なる顎関節での試みは国内外を通じて報告はない。また、フラレン類は DNA と結合し、ベクターとしての高い能力を持つ事も報告されており、顎関節症のみならず、他関節への遺伝子治療への応用の可能性も期待される。

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行ない、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きている。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。

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、一定の抗炎症性作用が確認された。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。

フラレンの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。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、フラレンが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。

本研究ではナノカーボン素材のフラーレンが顎関節における変形性関節症に対して、それ自体が有用な抗変性因子となることを証明する。さらにこれまでのところでは、フラーレン単独ではフリーラジカル消去能に限界がある可能性が示唆されており、ユビキノンを併用し、酸塩基平衡を保ち、加えて細胞膜脂質の酸化を抑制することにより、関節変性をさらに有意に抑制できことを研究する。

3. 研究の方法

本研究においては水溶性フラーレン自体のヒト滑膜炎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、まず *In vitro* での実験系を設計した。この実験系、以後の研究におけるヒト滑膜炎細胞への水溶性フラーレンの投与濃度の設定の予備実験も兼ねている。なお、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が、ウサギ由来の滑膜炎細胞である HIG-82 への投与実験は既に行っている。

ヒト滑膜炎細胞株、ヒト正常滑膜炎細胞株を、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水溶性フラーレン 0.1 microM、1 microM、10 microM、40 microM、100 microM、1000 microM を、0.1% fatty acid free bovine serum albumin を含む Ham's F12 培地に添加した。ヒト正常滑膜炎細胞株においては、TNF- α を加えた群と加えない群を設けた。

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-1 β 、PGE2 の濃度を測定した。さらに、水溶性フラーレンにユビキノンを CoQ10 を混合した群を加え実験を行った。

これにより水溶性フラー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

ヒト滑膜炎細胞株においては最初から炎症性サイトカインが合成されており、その減少が観察される水溶性フラーレンの濃度では細胞数自体の減少が観察されることとなった。元来水溶性フラーレンには毒性はないとされるが、高濃度であると浸透圧をはじめとする根本的な部分に変質してしまう可能性がたかい。一方でヒト正常滑膜炎細胞株においては、かなりシビアではあるものの、TNF- α による炎症の惹起とそれに対する水溶性フラーレンによる抗炎症効果が確認された。

しかしながら、TNF- α による炎症反応が非常に大きく、細胞がアポトーシスを起こすため、炎症の惹起方法については考慮すべきかもしれない。

ユビキノンを加えると、炎症の増悪が緩やかになり、抗炎症作用が延長される傾向が見られたが、長時間の観察がヒト正常滑膜炎細胞株では困難なため、*in vivo* における組織学的な評価が必要と判断した。また、フラーレンの生体内での運命についても組織学的評価が重要であり、蓄積や代謝終末における作用についても検討の余地が大きいと考えられた。

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たと言える。

今後の研究として、水溶性フラーレンの存在下での細胞活性の比較が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、滑膜炎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ーレンの抗炎症効果を観察することが *in vitro* としては行うべき研究かもしれない。加えて、抗原誘発関節炎動物モデルであれば、フラーレンの組織学的な効果のみならず、水溶性フラーレンに標識を修飾することでその運命の観察実験が可能であろうと思われる。ヒトへの応用を念頭にヒト由来の滑膜炎細胞やその物質としての運命を研究していく予定である。

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)

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 泰志 (OHTANI TAISHI)
九州歯科大学・歯学部・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：

(4) 研究協力者

()