

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11248

研究課題名(和文)軟骨組織からみた免疫抑制剤作用基盤の分子レベルでの差別的解析とその応用

研究課題名(英文) Differential analysis and application at the molecular level of the immunosuppressant action base seen from cartilage tissue

研究代表者

仲田 直樹 (NAKATA, naoki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90626251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1) in vitroにおいてタクロリムスのCCN2/CTGF遺伝子発現調節機構を分子生物学的手法を用いて明らかにしようとしたが、想定していたような結果は得ることができなかった。
2) HCS-2/8細胞をタクロリムスで刺激した場合、CCN2/CTGF遺伝子発現調節が最も盛んな時間と濃度においてマイクロアレイの手法を用いて、デキサメタゾンなど他の変動遺伝子と同様に網羅的に解析を行う予定であったが、計画どおり進まず達成できなかった。

研究成果の概要(英文)：1) We tried to clarify the regulatory mechanism of CCN2 / CTGF gene expression of tacrolimus in vitro using molecular biological methods, but we could not obtain the expected results.
2) When stimulating HCS-2/8 cells with tacrolimus, analyze exhaustively as well as other variable genes such as dexamethasone, using the microarray method at the time and concentration where CCN2 / CTGF gene expression regulation is the most active. Although it was scheduled to do, it could not be achieved due to delay in planning progress.

研究分野：口腔外科学

キーワード：免疫抑制剤 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

臨床現場において、関節リウマチ等の自己免疫疾患に対する治療薬として、ステロイド薬や他の免疫抑制薬が使用されているが、少なからず副作用が生じる。そのため、これらの薬剤の副作用を極力抑えるための手がかりを得るため、作用メカニズムについての研究が広く行われている。しかし、それらが免疫担当細胞以外の病巣局所に位置する細胞に、直接与えられる影響の検討は十分になされてきたとは言えない。そこで本研究では、ステロイド薬およびその他のカテゴリーに属する免疫抑制薬が軟骨細胞に与える影響を分子レベルで比較解析し、その結果、両薬剤の作用メカニズムの共通項・固有項が明らかになるので、得られた所見に基づき、自己免疫性関節炎に対して副作用のない最適な治療プロトコルを見出すことを本研究のゴールとした。

2. 研究の目的

臨床現場において、自己免疫性関節炎、例えば関節リウマチに対する治療薬としてデキサメタゾンなどのステロイド薬あるいは近年用いられるようになってきたタクロリムス(FK506)などの免疫抑制薬が使用され、それらは炎症・免疫応答を抑制することで関節骨・軟骨破壊を抑制し、ときに骨芽細胞、軟骨細胞の活動を賦活して関節骨・軟骨を修復すると考えられている。

しかしながら、このような免疫抑制薬の投与は少なからず副作用を惹起する。これを回避するため、こういった薬剤の作用メカニズムについての研究が広く行われており、副作用のない安全な自己免疫疾患治療薬の開発が、長年の間、臨床現場において強く求められ続けている。

過去の研究をみると、デキサメタゾンなどのステロイド薬およびタクロリムスなどの免疫抑制薬の個々の作用機序を免疫シ

ステムの観点から分子レベルで解析した報告は様々にあるが、ステロイド薬および、それ以外の免疫抑制薬の局所の細胞に対する作用を分子レベルで比較解析し、その共通項、固有の機能、相反する側面を洗い出すような研究はほとんど存在しない。そこで本研究では、ステロイド薬および免疫抑制薬の2種の薬剤が軟骨細胞において生む生物学的効果を詳細に比較解析するとともに、これに関する因子を明らかにし、最終的にはそれぞれの役割を包括的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) HCS-2/8細胞を用い、in vitroにおいてデキサメタゾンとタクロリムスのCCN2/CTGF遺伝子発現調節機構を分子生物学的手法を用いて明らかにする。すでに本研究グループが行った研究でHCS-2/8細胞においてデキサメタゾンはCCN2/CTGFの遺伝子発現を促進することが明らかとなっているが、促進に関わる因子と遺伝子上の標的領域はいまだ解明されていない。そのためこれを明らかにすることから開始する。

これと同時にHCS-2/8細胞を用い、in vitroにおいてタクロリムスのCCN2/CTGF遺伝子発現調節機構を分子生物学的手法を用いてデキサメタゾンの場合と同様に明らかにする。この解析にはルシフェラーゼアッセイをまず応用し、転写因子などの関連タンパク質の同定にはゲルシフトアッセイ、サウス/ノースウエスタン法を主として用いるが、必要に応じてDNA/RNAアフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製とペプチドマスフィンガープリンティング法なども援用する。

2) HCS-2/8細胞を用いた、デキサメタゾン

とタクロリムスによって変動する遺伝子を網羅的に検索するトランスクリプトーム解析

先に述べたように、すでに HCS-2/8 細胞をデキサメタゾンで刺激した場合、CCN2/CTGF 遺伝子発現調節が最も盛んな時間と濃度においてマイクロアレイの手法を用いて他の変動遺伝子の検索を行っている。これにならい、タクロリムス刺激の効果も同様に網羅的に解析する。マイクロアレイの結果から発現促進および抑制の 2 つの方向で変動する遺伝子が得られるため、デキサメタゾンとタクロリムスでの 2 つのマイクロアレイの結果を解析し、同方向に変動する遺伝子、相反する方向に変動する遺伝子、一方のみによって変動する遺伝子に、変動遺伝子を分類する。こうして得られた新規関連遺伝子の中から必要な場合、ステロイドおよびタクロリムスの薬理効果と副作用に深く関与すると考えられる遺伝子を選び出し、次の解析対象とする。

3) 予定通りの成果が得られなかった場合

1: 口腔粘膜を対象とした追加検討: 口腔粘膜に生じ自己免疫疾患とも捉えられている口腔扁平苔癬は、その治療にデキサメタゾン・タクロリムスが使用されている。そのため、口腔内から採取した歯肉から歯肉線維芽細胞・角化細胞の初代培養細胞を作成して、デキサメタゾン・タクロリムスを作用させ、同様の研究を行う。

2: 口腔扁平苔癬組織における CCN2/CTGF 発現解析を行う。

4. 研究成果

1) HCS-2/8細胞を用い、in vitroにおいてデキサメタゾンとタクロリムスのCCN2/CTGF遺伝子発現調節機構を分子生物学的手法を用いて明らかにすることと、またHCS-2/8細胞を用い、in vitroにおいてタクロリムスの

CCN2/CTGF遺伝子発現調節機構を分子生物学的手法を用いてデキサメタゾンの場合と同様に明らかにしようとしたが、想定していたような結果は得ることができなかった。

2) HCS-2/8細胞を用いた、デキサメタゾンとタクロリムスによって変動する遺伝子を網羅的に検索するトランスクリプトーム解析は、HCS-2/8細胞をデキサメタゾンで刺激した場合、CCN2/CTGF遺伝子発現調節が最も盛んな時間と濃度においてマイクロアレイの手法を用いて他の変動遺伝子の検索を行っており、これにならいタクロリムス刺激の効果も同様に網羅的に解析を行う予定であったが、計画進行が予定通り進めることができず達成できなかった。

3) 上記の研究が進まなかったことから最終年度は口腔粘膜を対象とした検討を行った。口腔粘膜に生じ自己免疫疾患とも捉えられている口腔扁平苔癬は、その治療にデキサメタゾン・タクロリムスが使用されている。そのため、口腔内から歯肉を採取し歯肉線維芽細胞・角化細胞の初代培養細胞を作成して、デキサメタゾン・タクロリムスを作用させ、今後の研究へと利用可能な結果を得ることを目標とし行ったが発表に至るほどのデータは得られなかった。

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)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲田 直樹 (NAKATA, naoki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 90626251

(2)研究分担者

山近 英樹 (YAMACHIKA, eiki)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：10294422

滝川 正春 (TAKIGAWA, masaharu)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20112063

森谷 徳文 (MORITANI, norifumi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60467751

久保田 聡 (KUBOTA, satoshi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90221936

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし