

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12527

研究課題名(和文) 複合脂質膜を用いた滑膜細胞の増殖抑制によるリウマチ治療

研究課題名(英文) Therapeutic effects of hybrid liposomes against rheumatoid arthritis

研究代表者

松本 陽子 (MATSUMOTO, Yoko)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：00133562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ベシクル分子(リン脂質)とミセル分子からなるハイブリッドリポソーム(HL)のリウマチ(RA)治療に関して以下の興味深い知見が得られた。(A)in vitroにおいて、RA(滑膜)および滑膜肉腫細胞に対する顕著な増殖抑制効果が明らかになった。(B)RA(滑膜)および滑膜肉腫細胞に対するアポトーシス誘導経路が明らかになった。(C)in vivoでは、HLを投与した治療RAモデルマウスにおいて手指の腫れや関節の変形が抑制され、顕著な治療効果が明らかになった。関節切片の免疫染色において、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6およびIL-1 β)の減少し、免疫制御による治療効果が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have produced hybrid liposomes(HL)which can be prepared by sonication of a mixture of vesicular and micellar molecules in a buffer solution. We investigated the anti-rheumatoid arthritis (RA) effects of HL and following results are obtained.(A)The remarkable inhibitory effects of HL on the growth of human RA fibroblast-like synoviocytes (HFLS-RA) and human synovial sarcoma (SW982)cells were attained in vitro.(B) HL induced apoptotic death of HFLS-RA and SW982 cells through the activation of caspase-3, -8 and -9. (C) Therapeutic effects of HL with downregulation of inflammatory cytokine (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) for the mouse model with RA arthritis were obtained in vivo. These findings suggest that HL showed inhibitory effects on the growth of HFLS-RA and SW982 cells in vitro along with apoptosis and therapeutic effects for mouse models of RA in vivo.

研究分野：工学

キーワード：リウマチ アポトーシス リポソーム 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)は、異常増殖した滑膜細胞が形成する肉芽組織(パンヌス)による骨組織破壊が特徴である慢性炎症性自己免疫疾患である。RAの薬物療法がおこなわれているが、十分な治療効果は得られていない。また、抗RA剤は重篤な副作用も報告されている。そこで、より安全で治療効果の高い薬剤の開発が急務である。

一方、ベシクル分子とミセル分子から成る新しいナノ粒子であるハイブリッドリポソーム(HL, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988))は、抗がん剤を含有せずに、それ自身ががん細胞膜特異的に蓄積した後、選択的なアポトーシス誘導により増殖抑制効果を示すことを見出した(Y. Matsumoto *et al.*, *Int. J. Cancer*, **115**, 377 (2005))。さらに、動物レベルでは、担がんマウスに対して高い治療効果と安全性が認められ、生命倫理委員会の承認後、末期がん患者に対する臨床でのパイロットスタディにおいて高い安全性、延命効果および固形リンパ腫の縮小が確認されている(*Curr. Pharm. Des.*, **17**, 1709 (2011))。

これらの研究成果を背景に、がん同様に難治性疾患であるRAにも細胞膜の物性が関与している可能性に着目し、HLを用いた新しいRA治療薬を開発できるのではと考えるに至った。申請者は、HLがRA(滑膜)細胞に対してアポトーシス誘導により増殖を抑制することを見い出している。さらに、RAモデルマウスに対して、RAに特徴的な手指の腫れや関節の変形を抑制する基礎的知見を得ている(Y. Matsumoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 207 (2011))。本研究では、HLによるRA細胞増殖抑制におけるアポトーシスカスケードおよび免疫制御の解明を目指した。

2. 研究の目的

ハイブリッドリポソーム(HL)は、それ自身でRA(滑膜)細胞の増殖を抑制することを報告している。そこで本研究においては、HLを用いて、(1) *in vitro* および *in vivo* において、RA(滑膜)細胞膜をターゲットとしたアポトーシス誘導メカニズムの全容を明らかにする。(2) 炎症性サイトカイン定量により、HLのRA細胞増殖抑制に伴う免疫制御を検討する。(3) RAモデルマウスを用いて、治療効果を検討し、抗RA剤の開発を試みる。以上のように、本研究では、従来の免疫抑制型の抗リウマチ薬で無く、リウマチの原因となる異常増殖した滑膜細胞のみの除去を目的とした、副作用のない全く新しいタイプのリウマチ治療薬の開発を目指している。

3. 研究の方法

ハイブリッドリポソーム(HL)を用いたリウマチ(RA)滑膜細胞を標的としたRA滑膜細胞増殖抑制メカニズムを解明し、HLを新規のRA治療薬として応用することを目的とし、以下の研究を進めた。

(1) HLの創製および物性評価 HLを調製し、動的光散乱法により膜サイズの測定、蛍光偏光解消法により流動性の測定を行った。

(2) HLのリウマチ細胞に対する *in vitro* 増殖抑制試験 ヒトリウマチ(滑膜)細胞に対するHLの *in vitro* での増殖抑制試験を行った。さらに、正常細胞に対する毒性試験を実施した。

(3) *in vitro* でのアポトーシス誘導の解析 TUNEL法およびAnnexin-V法を用い、HLのリウマチ細胞に対するアポトーシス誘導を検出した。

(4) HLによるアポトーシスカスケードの解析 カスパー活性化基質を用いた古悪露メトリックアッセイによりHLによるリウマチ(滑膜)細胞のアポトーシス誘導のカスパーカスケードを明らかにした。

(5) リウマチ細胞の揺らぎの解析 蛍光偏光解消法による種々のリウマチ(滑膜)細胞膜と正常細胞の膜流動性と酵素活性測定法によるHLの細胞増殖抑制効果の相関関係を検証した。

(6) リウマチモデルマウスに対する治療実験 自然発症リウマチモデル(SKG)マウスおよびコラーゲン誘導関節炎(CIA)マウスを用いてHLの治療効果を検討した。

(7) アポトーシス誘導シグナル伝達の解析 HLによるアポトーシス誘導のシグナル伝達におけるカスパーカスケードおよびミトコンドリア経路について検討した。

(8) HLによる免疫制御に関する評価 IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインをELISA法および免疫染色により検討した。

(9) リウマチモデルマウスを用いた体内動態試験 リウマチモデルマウスにおけるHLの体内動態を観測した。

(10) *in vivo* でのアポトーシス誘導の画像解析 関節組織 TUNEL 染色 TUNEL 染色し、アポトーシス誘導を観察した。

以上の結果を総合して、*in vitro* でのリウマチ(滑膜)細胞の増殖抑制効果を明らかにし、抑制メカニズムの解明を目指す。さらに、*in vivo* でのリウマチモデルマウスに対するHLの治療効果と安全性を確認し、HLを用いた新しいリウマチ治療薬の開発を目指した。

4. 研究成果

(1) ヒトリウマチ (RA) 滑膜 (HFLS-RA) 細胞の増殖に対する HL の抑制効果および RA モデルマウスに対する HL の治療効果を検討した。in vitro において、HL の RA 滑膜細胞 (HFLS-RA) 細胞の増殖に対する顕著な抑制効果が得られた。フローサイトメトリーにより、HL による HFLS-RA 細胞のアポトーシス誘導が明らかになった。さらに、in vivo において HL を投与した RA モデルマウスの関節の腫れが減少した。関節切片の免疫染色による観察において、炎症性サイトカインの減少によるパンヌス形成の抑制効果が確認された。これらの結果は、HL の RA 滑膜細胞の増殖抑制効果および炎症性サイトカインの抑制による RA モデルマウスに対する治療効果を示している (*Drug Delivery*, **22**, 619 (2015))。

(2) コラーゲンによって誘発されたリウマチ関節炎 (CIA) モデルマウスを用いて、DMPC および C₁₂(EO)₂₃ からなる HL の治療効果を検討した。CIA モデルマウスに対する HL の顕著な治療効果が、関節炎の臨床スコア法により得られた。HL による過形成性滑膜 (パンヌス組織) および軟骨・骨の破壊の著しい減少が、ヘマトキシリン エオジン (HE) とサフラニン O 染色による間接組織切片観察により明らかになった。さらに、HL で治療した CIA モデルマウスにおいて、炎症性サイトカイン (インターロイキン (IL)-1、腫瘍壊死因子 (TNF)- と IL-6) の減少が確認された。以上のことから、CIA モデルマウスに対する HL の関節腫脹のない顕著な治療効果が確認された (*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**, 2688 (2015))。

(3) ヒトリウマチモデル細胞であるヒト滑膜肉腫 (SW982) 細胞に対する HL の増殖抑制およびアポトーシス誘導について検討した。HL は SW982 細胞の増殖に対する顕著な抑制効果を示した。HL は SW982 細胞に対するアポトーシス誘導において、カスパーズ-3、-8、-9 を活性化することが明らかになった。蛍光脂質含有 HL の SW982 細胞への経時的な蓄積が明らかになった。これらの結果は、リウマチモデル細胞に対する HL のアポトーシス誘導による増殖抑制効果を示している (*SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, **4**, 1 (2017))。さらに、SW982 細胞を IL-1 で刺激し、炎症性サイトカイン IL-6 および TNF- α を発現する RA モデル細胞の作製を確認した。今後、HL による炎症性サイトカインの抑制メカニズムを詳細に解析する予定である。

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 9 件)

H. Ichihara, M. Okumura, Y. Matsumoto, Inhibitory effects of hybrid liposomes on the overgrowth of human synovial sarcoma cells by induction of apoptosis, *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, (査読有) **4**, 1-3 (2017)).

(DOI: 10.15226/2374-6866/4/1/00154)

H. Ichihara, S. Yamasaki, M. Hino, R. Ueoka, Y. Matsumoto, Therapeutic effects of hybrid liposomes with downregulation of inflammatory cytokine for model mice of rheumatoid arthritis in vivo, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (査読有) **25**, 2688-2689 (2015).

(DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.04.083)

Y. Matsumoto, H. Ichihara, M. Hino, M. Umabayashi, R. Ueoka, Therapeutic effects of hybrid liposomes without drugs for rheumatoid arthritis, *Drug Delivery*, (査読有) **22**, 619-626 (2015).

(DOI: 10.3109/10717544.2013.869635)

〔学会発表〕(計 45 件)

【Invited Speaker】Y. Matsumoto, 「Inhibitory effects of trehalose liposomes on the growth of lung carcinoma cells along with apoptosis」2016 年 11 月 24 ~ 26 日, The 10th International Symposium on Nanomedicine, Tsukuba Central (茨城県つくば市).

高木麻里, 市原英明, 松本陽子, 「炎症性サイトカイン抑制によるハイブリッドリポソームのリウマチ治療」2016 年 7 月 2 日, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市).

【Invited Speaker】Y. Matsumoto, 「Therapeutic effects of trehalose liposomes for lymphoblastic leukemia cells along with apoptosis in vitro and in vivo」2015 年 12 月 10 ~ 12 日, The 9th International Symposium on Nanomedicine, 三重大学講堂 (小ホール) (三重県津市).

【Invited Speaker】Y. Matsumoto, 「Novel liposomes including trehalose surfactant inhibit the growth of tumor cells along with apoptosis」2015 年 7 月 22 ~ 25 日, Drug Discovery & Therapy World Congress 2015 (Boston, USA).

山崎周一, 高木麻里, 市原英明, 松本陽子, 「リウマチモデルマウスに対するハイブリッドリポソームの治療効果」2015 年 6 月 27 日, 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場 (福岡県北九州市).

〔図書〕(計1件)

R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, Y. Komizu, 「 Membrane-Targeted Nanotherapy with Hybrid Liposomes for Cancer Cells Leading to Apoptosis 」, Molecular Science of Fluctuations Toward Biological Functions, Springer, 270 (221-244) (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.life.sojo-u.ac.jp/biomed/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 陽子 (MATSUMOTO, Yoko)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：00133562

(2) 研究分担者

市原 英明 (ICHIHARA, Hideaki)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：70369114