

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2005～2008

課題番号：17591560

研究課題名（和文） 関節リウマチにおける光線力学療法の応用のための基礎的研究

研究課題名（英文） The basic experiment for the clinical use of photodynamic therapy to the patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

影山 康德（KAGEYAMA YASUNORI）

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50324348

研究成果の概要：関節リウマチ(RA)の病像の首座は関節滑膜にあり、RAの治療に滑膜切除術が行われているが、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実験を行った。光感受性物質としてATX-S10(Na)、タラポルフィンナトリウムを使用した時、共にRA培養滑膜細胞におけるPDT効果を認め、RAの動物モデルである滑膜細胞をSCIDマウスに移植した実験系においてもPDT効果を認めた。さらにラットコラーゲン関節炎モデルにおける関節炎発症部位に対するPDTではタラポルフィンナトリウム使用例で関節破壊の抑制効果を認め、本研究の結果よりPDTをRA患者の滑膜切除へ応用できる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,400,000	0	1,400,000
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

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：光線力学療法、関節リウマチ、ATX-S10(Na)、タラポルフィンナトリウム

1. 研究開始当初の背景

1) 関節リウマチ(RA)ではその病像の首座が関節滑膜にある。RA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いる。しかし、これは手術侵襲を伴い、全身状態の悪化した患者、麻酔困難の患者にとって大きなリスクとなる。そこで我々はより低侵襲な治

療法であり、近年癌治療に成果をおさめている光線力学療法(PDT)をRA患者の滑膜切除へ応用するための基礎実験を行った。PDTは現在までRA患者に全く行われていない治療法である。PDTはその治療が腫瘍組織に選択的に行えることから近年癌治療に脚光を浴びている治療法である。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。近年、光感受性物質は癌細胞のみならず、活性化リンパ球などの炎症細胞にも取り込まれることが報告されていることから、血流豊富で炎症性細胞浸潤を特徴とした滑膜炎を主病巣とするRAにおいても光感受性物質が滑膜組織へ取り込まれ、PDTがRA治療へ応用できる可能性がある。

既に共同研究者の平野らは光感受性物質であるATX-S10(Na)を癌細胞株へ投与し、PDTの有効性を確認しており、ATX-S10(Na)有効至適濃度とエキシマダイレーザー光の有効エネルギー量を決定している(Jp J Cancer Res. 91, 753-759, 2000)。そこで我々は5人のRA患者から関節滑膜を採取、培養し、炎症状態の強い培養2-7日以内の早期にATX-S10(Na)を添加したところ、滑膜細胞のATX-S10(Na)の高い取り込みを確認した。一方、3人の変形性関節症患者由来の培養滑膜細胞においては培養のいずれの時点でもATX-S10(Na)の取り込みは低下していた。このことからRA滑膜炎に対してPDTが応用できる可能性が示された。

PDTに使用される光感受性物質の開発は現在盛んであり、組織深達度の高いレーザー光波長に適合した光感受性物質の開発により、深部組織の治療が可能となりつつある。従ってPDTはより発展性のある治療法となる可能

性がある。本研究による基礎データの蓄積のもとにPDTをRA患者治療へ臨床応用できれば、RA患者のより低侵襲的滑膜切除の実現が可能となることが期待される。

2. 研究の目的

1) RA患者の関節から滑膜を採取し、その培養滑膜細胞におけるPDTの効果を経細胞障害度で判定し、細胞障害機序を解析する。この時、*in vitro*実験での光感受性物質、ダイオードレーザー光の有効治療量を決定する。

2) PDTの*in vivo*実験としてRAの疾患モデルであるコラーゲン関節炎と、手術時に採取した人滑膜組織をSCIDマウスに移植したモデルを用い、PDTを行い、治療効果を判定し、至適治療条件を設定する。

3) さらに関節炎のモデル動物におけるPDT効果を検討し、PDTのRA患者治療の臨床応用に向けた基礎的データを獲得することを本研究の目標とする。

3. 研究の方法

[*in vitro*実験(培養滑膜細胞にて)]

1) 関節リウマチ(RA)、変形性関節症(OA)患者の同意のもとに手術時に滑膜を採取する。これをコラーゲンゼ処理後、培養する。光感受性物質としてATX-S10(Na)、タラポルフインナトリウムを使用する。これらを培養滑膜細胞へ投与し、光感受性物質の細胞内器官における局在をNile red、mito redなどの細胞内器官特異的集積を示す薬剤を同時投与し、蛍光顕微鏡で観察し、確定する。また取り込み量はcomputerソフトを用いて解析する。

2) 培養滑膜細胞へ各種濃度の光感受性物質を添加し、各種エネルギー量のダイオードレーザー光を照射し、細胞の生存度をMTS

アッセイで測定する。それにより *in vitro* での光感受性物質、ダイオードレーザー有効治療量を決定する。

[*in vivo* 実験 (関節炎動物モデルにて)]

1) RA と OA 患者から手術時に滑膜組織を採取し、これを SCID マウスに移植したモデルを用いる。滑膜組織が正着後 (移植 2 週間)、光感受性物質を静脈内投与し、PDT を行い、滑膜組織の病理像を観察する。

2) Lewis ラットを II 型コラーゲンで免疫し、関節炎を発症させたあと光感受性物質を関節内投与し、ダイオードレーザー光を同部に照射し、関節炎の進行度を X 線評価し、stage 分類する。

3) PDT が行われていることを確認するため、一重項酸素の産生量を測定する。

4. 研究成果

1) RA 培養滑膜細胞は OA 培養滑膜細胞よりも ATX-S10(Na)、タラポルフィンナトリウムの細胞内へのとりこみが有意に多かった。

2) RA 培養滑膜細胞での ATX-S10(Na)、タラポルフィンナトリウムの細胞内取り込みの多い器官はライソゾームであった。

3) RA 培養滑膜細胞に対する PDT において、ATX-S10(Na)、タラポルフィンナトリウム使用で共に PDT 効果が見られた。ATX-S10(Na)での細胞の 50%致死条件は、照射エネルギー $12.5\text{J}/\text{cm}^2$ 、ATX-S10(Na)濃度 $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、タラポルフィンナトリウムでの細胞の 50%致死条件は照射エネルギー $10\text{J}/\text{cm}^2$ 、タラポルフィンナトリウム濃度 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。PDT 条件を各種変えてみたが、細胞死は主にネクローシスによるものであった。

4) 滑膜組織を SCID マウスに移植し、生着後 PDT を行ったところ、タラポルフィンナト

リウムではその濃度、照射エネルギー量依存性に移植滑膜細胞の細胞死を誘導でき、PDT 効果が認められた。ATX-S10(Na)を用いた PDT でも移植滑膜細胞の細胞死を誘導できたが、今のところ PDT 効果に一定の傾向が得られていない。

5) Lewis ラットを使用したラットコラーゲン関節炎モデルにおいて関節炎発症部位である足関節部への PDT を行い、関節炎の進行度を関節破壊の程度から stage 分類して X 線評価したところ、タラポルフィンナトリウム投与例ではタラポルフィンナトリウムの濃度依存性、照射エネルギー量依存性に関節破壊抑制効果が見られた。ATX-S10(Na)による PDT では今のところ一定の傾向は得られてはいない。

6) 滑膜細胞を SCID マウスに移植したモデルとラットコラーゲン関節炎モデルにおける PDT で、共に一重項酸素の産生を確認した。

7) 本研究による結果より PDT を RA 患者の関節滑膜切除へ応用できる基礎データが得られ、今後 RA 患者に対する低侵襲的滑膜切除術の実現が可能となることが期待された。

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 2 件)

①鳥養栄治, 影山康德, 河野栄治, 平野達, 長野昭. タラポルフィンナトリウム (レザフィリン) を用いた光線力学療法 (PDT) の悪性骨軟部腫瘍への応用.

日本レーザー医学会誌 9(2) 101-105, 2008
査読有

②Torikai E, Kageyama Y, Kohno E, Hirano T, Koide Y, Terakawa S, Nagano A.

Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats. Clin Rheumatol. 27(6):751-761, 2008

査読有

[学会発表] (計 9 件)

①第 47 回日本リウマチ学会

光線力学療法 (PDT) の培養 RA 滑膜細胞への作用について. 影山康德、鈴木基裕、市川哲也、鳥養栄治、永房鉄之、長野 昭、河野英治、平野 達

2004. 4. 15-17 岡山

②第 14 回光線力学学会

光線力学療法 (PDT) の培養 RA 滑膜細胞への殺細胞効果について. 影山康德、河野栄治、阪田 功、平野 達

2004. 5. 29 鳥取

③第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会

光線力学療法 (PDT) の培養 RA 滑膜細胞への殺細胞効果について.

影山康德、高橋正哲、永房鉄之、河野栄治、平野 達

2004. 10. 21-22. 東京

④第 49 回日本リウマチ学会

RA 培養滑膜細胞に対する光線力学療法 (PDT). 影山康德、鳥養栄治、鈴木基裕、市川哲也、永房鉄之、長野 昭

2005. 4. 17-20. 横浜

⑤第 16 回日本光線力学学会

RA 培養滑膜細胞に対する光線力学療法 (PDT). 影山康德、鳥養栄治、河野栄治、平野 達、長野 昭

2006. 5. 13. 東京

⑥第 11 回 International photodynamic association

Photodynamic therapy using Talaporfin sodium on synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats. Torikai E, Kageyama Y, Kohno E, Hirano T, Nagano A.

2007. 3. 28-31. Shanghai

⑦第 17 回日本光線力学学会

関節炎モデルラットに対するレザフィリンを用いた PDT による滑膜切除法の検討. 鳥養栄治、影山康德、河野栄治、平野 透、寺川進、長野 昭

2007. 6. 16 鬼怒川

⑧第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会

レザフィリンを用いた光線力学療法 (PDT) の関節リウマチへの応用. 鳥養栄治、影山康德、河野栄治、平野 透、寺川 進、長野 昭

2007. 10. 25-26 浜松

⑨第 29 回日本レーザー医学会

光線力学療法 (PDT) の整形外科領域への応用 鳥養栄治、影山康德、河野栄治、長野 昭

2008. 11. 15-16. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 康德 (KAGEYAMA YASUNORI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50324348

(2) 研究分担者

長野 昭 (NAGANO AKIRA)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50272547
河野 栄治 (KONO EIJI)
浜松医科大学・光量子医学研究センター・
寄附研究部門教員
研究者番号：40313952
平野 達 (HIRANO TORU)
浜松医科大学・光量子医学研究センター・
寄附研究部門教員
研究者番号：30313951

(3) 連携研究者