

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：85402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659725

研究課題名(和文) テロメア関連抗加齢因子と超音波感受性バブルリポソームによる変形性関節症治療

研究課題名(英文) Treatment of osteoarthritis using systematic delivery of telomere-related antiaging factors by bubble liposomes and ultrasound exposure

研究代表者

松尾 俊宏 (Matsuo, Toshihiro)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・医師

研究者番号：90397977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円、(間接経費) 570,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト不死化遺伝子であるhTERT、ストレス誘導MAPK(p38 MAPK)阻害剤、長寿遺伝子Sirtuin 1に、超音波感受性バブルリポソームを用いたdrug delivery systemによる変形性関節症に対する新たな治療法の開発を目的として実験を計画した。バブルリポソームの作成が非常に困難であったため、テロメア関連microRNAを用いた遺伝子導入および軟骨細胞への抗老化効果を検証する実験を計画した。フローサイトメーターによるラット軟骨細胞のテロメア長測定およびmicroRNAの導入を行った。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to develop new treatment method for osteoarthritis using novel delivery system of telomere-related antiaging factors (hTERT, p38 MAPK inhibitor and Sirtuin 1) by bubble liposomes and ultrasound exposure. Bubble liposomes could not be prepared successfully by our method, therefore, we planned to introduce telomere-related microRNA in the chondrocyte in order to examine the antiaging effects. We measured the telomere length of rat chondrocyte by flow cytometer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・整形外科学

キーワード：遺伝子 老化

1. 研究開始当初の背景

運動器不安定症は、加齢に伴い運動能力の低下を生じ、転倒・骨折のリスクなどが高まった状態を示す病態です。この疾患の診断基準の1つである変形性関節症はわが国で1200万人に発症しているといわれています。65歳以上の高齢者が総人口の22%を超えて超高齢社会に突入しており、自立した健康長寿を享受するために、運動器の健康が極めて重要であるといえます。細胞老化により関節破壊をきたす代表的疾患である変形性関節症(OA)は、高齢者にとって疼痛と運動機能障害を引き起こし、生命予後因子であるとされる大腿骨近位部骨折にもつながる病態であり、従来の治療法を越えた新たな治療法の開発が切望されています。細胞の老化は、細胞分裂によるテロメアの短縮、酸化ストレスなどが関連しています。我々は骨・軟部腫瘍のテロメア・テロメラーゼおよびhTERTに関する研究とデータの蓄積を行ってきました。このagingにも関連するテロメア研究の経験に基づき、様々なテロメア関連の抗加齢因子に着目し、OA治療を行うことを考えました。

2. 研究の目的

ヒト不死化遺伝子である human telomerase reverse transcriptase (hTERT)、ストレス誘導 mitogen-activated protein kinase である p38 MAPK の阻害剤および長寿遺伝子 sirtuin 1 (SIRT1)に、超音波感受性バブルリポソームを用いた超音波による drug delivery system (DDS) を組み合わせ、変形性関節症の治療法に応用することを目的としました。不死化遺伝子および抗加齢遺伝子を安全で効率的に軟骨細胞内に誘導可能な DDS を用いること

は極めて有効な OA 治療になりうると考え、さらに、本方法は OA のみならず関節リウマチや関節近傍腫瘍術後の関節温存や他の aging 関連疾患に対する新たな治療戦略モデルとなり、広く応用可能であると考えました。

3. 研究の方法

ラビット変形性膝関節症モデルの軟骨変性に対し、テロメアに関連した抗加齢因子である hTERT、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580) および SIRT1 に、超音波感受性バブルリポソームと超音波を用いた DDS で治療を行なうこととしました。バブルリポソームは超音波との併用でバブルの崩壊を誘導し、その際生じるエネルギーで細胞内に薬物や遺伝子を導入する方法で、この DDS の軟骨細胞への導入効果および治療効果を検討し、テロメア長を中心とするテロメア因子の治療による変動を検討する予定としました。

4. 研究成果

フォスファチジルコリン (DSPC) およびメトキシポリエチレングリコール (DSPE-PEG(2k)-Ome) を用い、回転式エバポレーターによる逆相蒸発法を行ない、作成したリポソームにパーフルオロプロパンを封入し調整する予定でしたが、バブルリポソームの作成が技術的に困難でした。そのため、テロメア関連 microRNA を用いた遺伝子導入および軟骨細胞への抗老化作用を検証する実験を再計画しました。

フローサイトメトリーによるラット軟骨細胞のテロメア長測定を行う系を立ち上げ、今後、老化関連 microRNA 導入後の比較検討のための準備を行いました。

テロメア長が明らかになっている 1301 細胞株 (EC01051619, DS Pharma Biomedical) を購入, 培養し, コントロールとしました。SD ラットの膝関節から単離した軟骨細胞 (P3) を培養し, テロメア長計測サンプルとしました。

テロメア長は relative telomere length として算出し, Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry (DAKO) を用いて計測しました。このキットを用いることによって, テロメア長 70kbp である 1301 細胞株に対して, SD ラット軟骨細胞の relative telomere length は 60kbp (86.3%) であることが明らかになりました(下記図参照)。

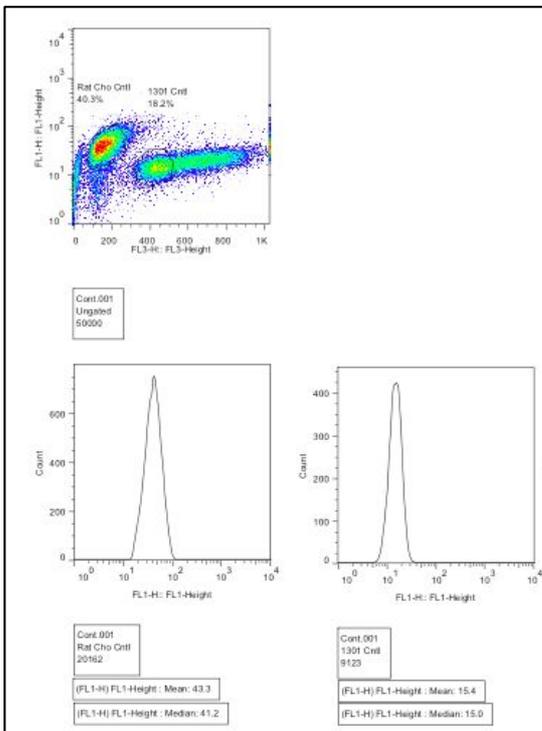


図1. コントロールサンプルを用いたフローサイトメトリードットプロット図とヒストグラム

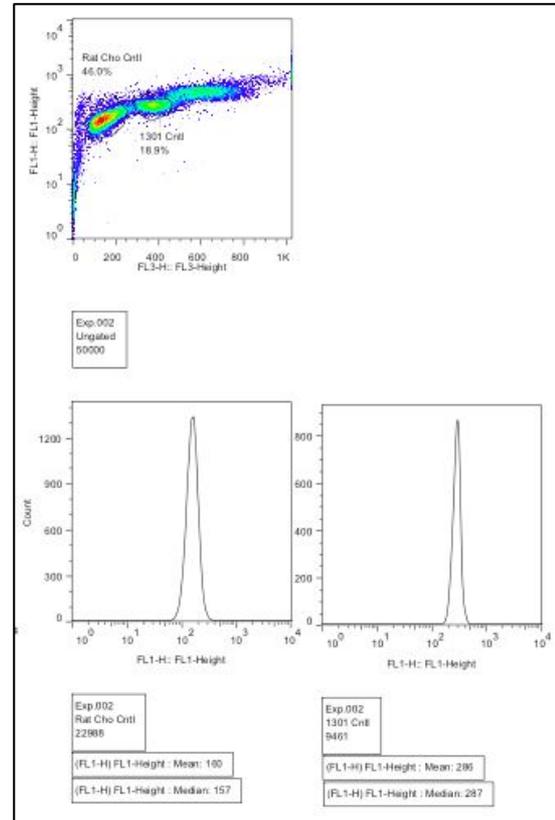


図2. 実験サンプルを用いたフローサイトメトリードットプロット図とヒストグラム

プローブによるテロメアの染色を行ったものを行っていないサンプルでその平均蛍光強度の差から相対的なテロメア長を算出しました。

今後このデータを元に老化関連 microRNA 導入によるテロメア長への影響を様々な細胞において観察できることが期待できると考え, 研究を継続いたします。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 俊宏 (MATSUO TOSHIHIRO)
独立行政法人国立病院機構呉医療センター
臨床研究部・その他部局等・医師
研究者番号: 90397977

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授
研究者番号: 70177244

下瀬 省二 (SHIMOSE SHOJI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授
研究者番号：30304439

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：60467769