

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011年 2 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 高島 成二
所属機関名： 大阪大学
所属部署名： 医学系研究科 職名： 准教授
所在地： 大阪府吹田市山田丘 2-2
電 話： 06-6879-3492 内線： 3492



1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

エネルギー代謝関連酵素の心疾患における役割解明・治療への応用

3. 成果の概要

心臓のエネルギー代謝にかかわる新たな経路としてAMPKと呼ばれる酵素の器質を精製・同定した。AMPKの活性化を介する微小管制御という新たなストレス応答メカニズムを明らかにした。

※発表論文等

Nakano T. et al. Nature Cell Biology 12 (6): 583-590 (2010)

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 高島 成二	職名： 准教授
所属機関名： 大阪大学大学院	部署名： 医学系研究科
中国側研究者氏名： 廖 禹林	職名： 教授
所属機関名： 南方医科大学	部署名： 病態生理部門

エネルギー代謝関連酵素の心疾患における役割解明・治療への応用

研究者氏名 高島 成二

所属機関 大阪大学 大学院医学系研究科・准教授

中国側共同研究代表者 廖 禹林

所属機関 南方医科大学 病態生理部門・教授

要 旨

心臓の特異性を決定するシグナル因子の同定を行い、それらの機能解析を行うことにより、心血管疾患の病態解析から新しい治療法の開発につなげることを目的とする。心臓で特異的に発現誘導される因子としてGSという蛋白質を同定し、低酸素ストレス時にエネルギー代謝酵素を活性に調節する因子であることを明らかにした。またストレス応答酵素の新規器質CLI-170を心臓から同定し、その機能を明らかにした。2つのストレス応答機構の発見が、今後心不全の病態解明と新規の治療法の開発につながると期待される。

Key Words 心臓、代謝、微小管、細胞極性

緒 言：

分裂して同化反応を積極的に行う癌細胞などの細胞とは異なり、生後間もなく分裂を中止し収縮のためのエネルギー産生と異化反応を積極的に行う心筋細胞は、エネルギー代謝につながるシグナル、増殖シグナルに大きな差があることが予想される。こういった心臓としての臓器特異性に注目し、独自のシグナル経路を同定する。そしてこれらにかかわる因子の機能を明らかにすることにより新しい心疾患の診断・治療法の開発につながると考え本研究を考案・実行することとした。

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要な増殖因子シグナルを中心とした機能分子を新たに同定することにより心筋特有の生存維持機構・ストレス応答機構を解明する。

そのために独自のスクリーニング系を開発するとともに、敏速な生体内での分子機能評価系を確立し、重要な因子の同定を敏速化させる。それらの相互作用から心臓の生存の分子機構を解明し、心不全の病態解明、さらには新たな治療法への展開を図る。

研究の対象と方法：

(1) 心臓の特異的機能維持にかかわる分子の同定

①心筋の非分裂性を規定する分子の同定

非分裂細胞である心筋細胞の機能維持に必要なシグナルの解析を通して、心臓特異的な生存維持機構の解明を行った。心臓は生後まもなく細胞分裂を中止し、さらに決して癌化をおこさない唯一の器官である。そこで、この細胞分裂抑制機構の解明を主な目的として、細胞分裂

に必要な転写因子に対する心臓の反応性を比較した。心臓特異的な転写誘導をきたす分子を同定、機能解析を行った。

②心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

リン酸化酵素は特定の器質のリン酸化により多彩な生理作用を有することが知られているが、細胞内局所、あるいは各臓器で独自の作用を有している。リン酸化酵素はその標的器質によって機能を空間的・時間的に多様化させていることが近年明らかになりつつある。ストレス応答に関与すると考えられている AMPK ファミリー分子も心臓での強発現が確認されている。そこで心臓特異的な AMPK の器質を新たに検索同定しその生理的役割の解明を行った。

(2) 独自の技術による新規リン酸化酵素器質の同定法の確立

上記の計画を実行するために、蛋白精製手法と *in vitro* リン酸化反応を組み合わせた新たな器質同定法を確立した。この手法は心臓組織を最初に高分離能のカラムで精製することにより脱リン酸化酵素を効率よく除くことが可能である。また分離されたたんぱくを器質として *in vitro* でリン酸化反応を行うため K_m の低い(アフィニティの高い)器質を同定することが可能である。そのため臓器において特異的に重要なシグナルの同定につながった。

(3) 同定された分子機能のゼブラフィッシュ等を利用した生体内解析

上記で新たに同定されたシグナルをゼブラフィッシュを使ったアッセイ系を利用して機能解析を行った。解析には心臓特異的 GFP 発光個体、GAL4-UAS システムを利用した心臓特異的遺伝子高発現系などを利用した。

結 果：

(1) 心臓の特異的機能維持にかかわる特異的分子の同定

我々は以前、HB-EGF と呼ばれる増殖因子が心臓の機能維持に重要な役割を果たすことを報告してきた。この増殖シグナルの働きにより心臓においても分裂細胞と同様 *c-fos* や *c-myc* と呼ばれる癌遺伝子の誘導がおこる。しかしその後は特異的な遺伝子の調整機構が働き心臓の非分裂性が規定されている。特に *c-myc* は最近 iPS 細胞の誘導に使用されるなど細胞運命決定とも深い関与が示唆されている。そこで *c-myc* を心臓および分裂細胞で発現させ、それにより誘導される遺伝子の差を網羅的に解析した。

結果、GS という蛋白が心臓特異的に *c-myc* により発現誘導されることが明らかになった。GS は今日までほとんど、その機能が解析されていなかった。そこで、GS の結合蛋白の精製・同定を行い F-ATP synthase という蛋白との結合を証明した。

F-ATP synthase はミトコンドリアに存在する酸化的リン酸化に関与する重要な分子であり、特にミトコンドリアの発達した心臓においてはその細胞機能に直接かかわることが考えられた。そこで、ATP 感受性 FRET を使用した実験により細胞内では GS が F-ATP synthase の活性を上昇させること、低酸素により強く発現誘導されることなどを明らかにした。つまり、GS は F-ATP synthase の働きを動的に制御し低酸素などのストレスに応答する重要な適応物質であることが明らかになった。

今後はさらに GS の分子メカニズムを解明し、ATP の産生の直接調整という新しい心不全治療への可能性を検討していく。

(2) 心筋の機能維持にかかわる特異的分子の同定

ストレス応答蛋白として知られる AMPK の新しい器質として CLIP-170 を心臓組織から同定し、

その微小管動態における役割を明らかにした。まず心筋ホモジネートを高分離能のカラムにて分離し、その各フラクションにおいて *in vitro* リン酸化反応を行い、放射線標識されたたんぱくをさらに高分離能のカラムにより精製することにより同定した。同定された CLIP-170 は微小管の先端に結合することは既知であったがその機能は不明であった。

そこでその機能を解析するために、まずリン酸化部位 (S311) を同定し、S311 リン酸化 CLIP-170 抗体を作成することにより、*in vivo* においても AMPK が CLIP-170 の S311 をリン酸化することを証明した (図 1)

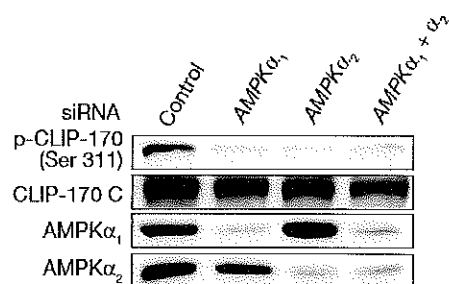


図 1、AMPK の阻害により CLIP-170 のリン酸化が抑制される。p-CLIP-170 は CLIP-170 のリン酸化特異的抗体、CLIP-170C はリン酸化非特異的抗体によるウエスタンブロットングをそれぞれ示す。AMPK の活性を siRNA により抑制すると CLIP-170 のリン酸化レベルは著明に低下する。

さらに AMPK を抑制すると微小管スピードが減少するという興味深い現象が観察された (図 2)。

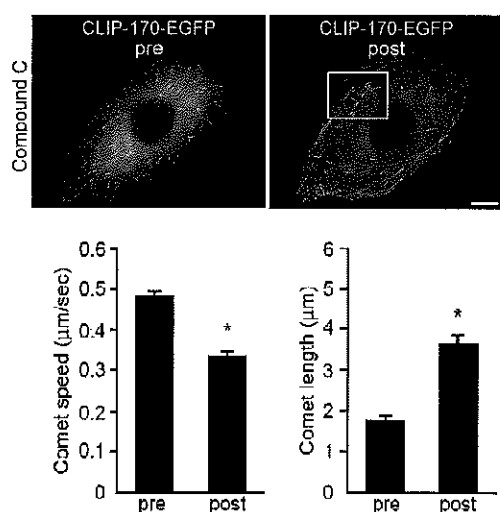


図 2、AMPK 抑制剤 Compound C による微小管伸長スピード抑制作用。CLIP-170-GFP を安定発現させた細胞に Compound C を投与した。CLIP-170 は上図のように comet 状に微小管のスピードに合わせて中心体から細胞膜側に向かって移動する。Compound C により AMPK の活性が抑制されると CLIP-170 の comet の長さが伸びるとともに微小管の伸長スピードを表す comet のスピードも顕著に減少した (下図)。

これまで微小管の伸長スピードを動的に制御する酵素は知られておらず、エネルギー代謝の異常をはじめとした様々なストレスによって活性化される AMPK が CLIP-170 のリン酸化を介して微小管制御を介して何らかのストレス応答をおこなっていると考え

られた。

さらに CLIP-170 のリン酸化を抑制するあるいは CLIP-170 の非リン酸化変異体を導入すると、微小管の伸長スピードの低下のみならず退縮距離の短縮も観察された。これにより微小管の安定性が過剰に増加し、微小管を構成するチューブリンの N 末端のチロシンが脱落した微小管が増加することも観察された。安定化した微小管は通常細胞遊走の方向にのみ伸長しているが AMPK が抑制された状態では安定化した微小管が全方向性に広がり、細胞極性の消失および細胞遊走が極端に抑制された (図 3)。

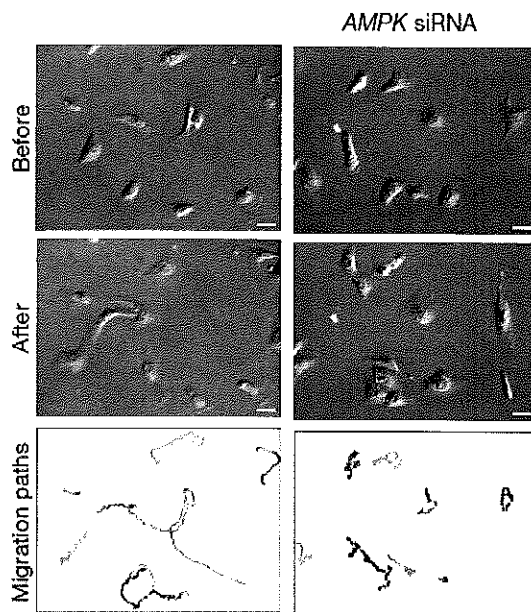


図3、AMPKの抑制により細胞遊走が障害される。

線虫やショウジョウバエでは早期からAMPKが細胞極性を規定する因子として注目されていたが長年その器質・および分子メカニズムは不明であった。本実験からAMPKによる極性形成にはこのCLIP-170が関与することが強く示唆された。

さらに zebrafish を使った実験により in vivo でも CLIP-170 が極性形成に重要であることを証明した。

これらの発見は、ストレスにตอบสนองして活性化され解糖系などを変化させてATP産生に働くと考えられていたAMPKが、実は微小管の活性化による細胞機能全体の補強を行

っているという全く新しい分子メカニズムを明らかにした。これは細胞生物学的にも大変興味深い発見であり Nature Cell Biology 誌に current topics として取り上げられた。

考察：

近年、AMPKの活性促進剤が心不全を改善すること、AMPKが虚血障害に抑制的に働くことなどが報告されているが、本発見はこれらの分子メカニズムにも深く関与することが示唆される。今後さらにこのAMPK-CLIP-170の生体内での作用が明らかとなれば、心臓特異的な保護機構の解明、治療法の開発につながると期待される。

参考文献：

Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S.

AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation.

Nat Cell Biol. 12 (6) :583-590. 2010

作成日：2011年2月10日

財団法人 日中医学協会


2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 3 月 12 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 顧 艶 紅  印
所属機関名：（独）国立成育医療研究センター研究所
所属部署名：成育政策科学研究部 職名：上級研究員
所 在 地：〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1
電 話：03 3416 0181 内線：03 3417 2694

1. 助成金額：900,000円

2. 研究テーマ

中国神経管閉鎖障害高発地域における繰り返し流産する女性の甲状腺機能を含むヨード代謝及び葉酸代謝に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 顧 艶紅	職名： 上級研究員
所属機関名： （独）国立成育医療研究センター研究所	部署名：成育政策科学研究部
中国側研究者氏名： 張 霆	職名： 副所長・研究員
所属機関名： 北京市首都小児科研究所	部署名：分子免疫研究室

4. 当該研究における発表論文等

論文 “Maternal thyroid hormones protect against fetal neural tube defects in pregnant women with hyperhomocysteinemia” GU YH et al 投稿中。

論文 “Spectrum of additional congenital malformations in fetus with neural tube defects in a high occurrence area of China” GU YH et al 投稿中。

中国神経管閉鎖障害高発地域における繰り返し流産する女性の甲状腺機能を含む

ヨード代謝及び葉酸代謝に関する研究

日本側研究者氏名	顧 艶紅
所属機関名	(独) 国立成育医療研究センター 研究所 成育政策科学研究部
中国側研究者氏名	張 霆
所属機関名	北京市首都小児科研究所 分子免疫研究室

要旨

中国の山西省で神経管閉鎖障害 (NTDs) の発症率は約出生 1 万対 199 であった。さらに、この地域はかつてはヨード欠乏地域でもあったが、ヨード添加食塩の政策で、他の地域のようなヨード過剰摂取の恐れがある。山西省の山間地域では NTD 児、特に無脳児の妊娠により、繰り返し流産する女性が多かった。今回、これらの女性を対象に血清中の甲状腺ホルモン (fT_3 , fT_4)、血清甲状腺刺激ホルモン thyroid stimulating hormone (TSH)、血清総ホモシステイン (total homocysteine; tHCY) 及び尿中のヨードの排泄 (urine iodine; UI) を測定した。症例対照研究でヨード代謝を含む甲状腺機能及び葉酸代謝に関する研究を行った。甲状腺機能亢進症と思われる妊婦がいなかった。甲状腺機能低下症の妊婦を除いて解析を行った。NTD 児を妊娠していない妊婦を対照群、NTD 児を妊娠した妊婦を症例群とした。tHCY \leq あるいは $>13 \mu\text{mol/L}$ の割合、UI $>250\mu\text{g/L}$ の割合及び年齢は対照群と症例群の間に有意差がなかった。tHCY $>13 \mu\text{mol/L}$ かつ妊娠 20 週以下場合は 1) 症例群より対照群の方は血清甲状腺ホルモンのレベルが有意に高かった; 2) 二項ロジスティック回帰分析で、 fT_3 、TSH、UI、年齢と妊娠週数等の因子の影響を補正した後、 fT_4 のオッズ比は 0.60 (95%信頼区間: 0.42-0.86) であり ($P=0.006$)、保護作用を示した; 3) 対照群で fT_4 サージをみられたが、症例群ではみられなかった。さらに今は血清抗甲状腺抗体、血清 hCG 等を調べているところである。

Key Words 神経管閉鎖障害、高ホモシステイン血症、甲状腺ホルモン、尿中ヨードの濃度、母子保健

緒言:

中国の山西省で神経管閉鎖障害 (NTD) の発症率は約出生 1 万対 199 であり、特徴として無脳児が多かった。主な原因は葉酸欠乏であった。さらに、この地域はかつてはヨード欠乏地域でもあったが、1996 年からの全国一斉ヨード添加食塩の政策で、他の地域のようなヨード過剰摂取の恐れがある。NTD の病態を解明するため、流産した高ホモシステイン血症の妊婦において、血清中の甲状腺ホルモン及び尿中ヨードの濃度について検討することを目的とした。

対象と方法:

対象は中国の山西省にある山間地域の妊婦計 173 人、妊娠週数は 5-40 週、年齢は 18-21 歳。病理専門医が病理診断を行った。NTD 児ではなく他の原因で人工流産治療を受けた妊婦を対照群 (90 人)、NTD 児を妊娠し、人工流産をした妊婦を症例群 (83 人) とし、対照症例研究を行った。検体を冷凍保存した。血清甲状腺ホルモンと TSH は Abbott 社の ARCHITECT[®]アナライザー、血清中 tHCY は酵素法、尿中ヨードの濃度は Catalytic Spectrophotometry で北京市首都小児科研究所で測定した。2007 年に公表された「妊婦甲状腺機能異常ガイドライン」(J Clin Endocrinol Metab 2007;98(8):S1-S47) に基づいて、TSH $>2.5\text{mIU/L}$ の妊婦を甲状腺機能低下症、TSH $<0.1\text{mIU/L}$ の妊婦を甲状腺機能亢進症と定義した。匿名のデータを日本で分析した。統計分析は PASW17.0

を用いて行った。文書でインフォームド・コンセントを得た。研究計画は首都小児科研究所の倫理委員会の承諾を得た。

結果：

1) 対象者の基本情報：

今回の基準では甲状腺機能低下症はみられなかったが、17.8% (16/90) の対照群の妊婦、及び22.9% (19/83) の症例群の妊婦が甲状腺機能低下症であり、両者の有意差はなかった。これらの妊婦を除いてから解析した。妊娠週数 (20 週) と tHCY ($13 \mu\text{mol/L}$) 濃度別でグループ分け、解析した。対照群と症例群の間に tHCY ≤ あるいは $>13 \mu\text{mol/L}$ の割合、UI $>250 \mu\text{g/L}$ の割合及び年齢には有意差がなかった。他の基本情報は表 1 で示す。

2) 甲状腺ホルモンが NTD に対する保護作用：

妊娠週数 20 週以下かつ tHCY $>13 \mu\text{mol/L}$ の妊婦では、症例群より対照群の方は血清甲状腺ホルモンのレベルが有意に高かった (表 1)；二項ロジスティック回帰分析で fT_3 、TSH、UI、tHCY、年齢と妊娠週数等の因子の影響を補正した後、 fT_4 のオッズ比は 0.60 (95%信頼区間：0.42-0.86, $P=0.006$) であり、保護作用を示した；対照群で fT_4 サージをみられたが、症例群ではみられなかった；tHCY $\leq 13 \mu\text{mol/L}$ の妊婦と比べて、パターンが異なった (図 1)

考察：

妊娠週数 20 週以下かつ tHCY $>13 \mu\text{mol/L}$ の妊婦では NTD に対する保護作用がみられた。詳細なメカニズムはホモシステイン代謝関連酵素を介すると思われる。妊婦健診の際に、血中ホモシステインと甲状腺ホルモンのレベルを同時にモニターリングする必要がある。さらに 1) 抗甲状腺抗体 TPOAb、TGAb、及び既往歴等を調べ、甲状腺疾患のハイリスク妊婦の割合を比較すること；2) 甲状腺疾患のハイリスク妊婦を取り除いて、もう一度検証すること；3) この地域の妊婦のために妊娠初期、中期と後期に応じた甲状腺機能測定値のそれぞれの正常範囲を検討することが必要である。

参考文献：

1. Abalovich M, Amino N, Barbour LA, Cobin RH, De Groot LJ, Glinoe D, Mandel SJ, Stagnaro-Green A. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Aug;92(8 Suppl):S1-47.
2. 顧 艶紅、張 霆、加藤忠明：神経管閉鎖障害の発症要因と予防：中国現地調査と文献考察, 小児保健研究 Vol169 : 85-90 (2010).
3. Hustad S, Nedrebø BG, Ueland PM, Schneede J, Vollset SE, Ulvik A, Lien EA. Phenotypic expression of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and flavin cofactor availability in thyroid dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004 Oct;80(4):1050-7.
4. Zhang BY, Zhang T, Lin LM, Wang F, Xin RL, Gu X, He YN, Yu DM, Li PZ, Zhang QS, Zhao J, Qin YF, Yang XF, Chen G, Liu JF, Song XM, Zheng XY. Correlation between birth defects and dietary nutrition status in a high incidence area of China. *Biomed Environ Sci.* 2008 Feb;21(1):37-44.
5. Zhang T, Xin R, Gu X, Wang F, Pei L, Lin L, Chen G, Wu J, Zheng X. Maternal serum vitamin B12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. *Public Health Nutr.* 2009 May;12(5):680-6.

注：2010年9月17日「第57回日本小児保健学会」(新潟市)ポスター発表。また、本論文“Maternal thyroid hormones protect against fetal neural tube defects in pregnant women with hyperhomocysteinemia” GU YH et al は投稿中。

作成日：2011年3月14日

表 1. 20 週以下かつ TSH 値が 2.5mIU/L 以下の対象者の甲状腺ホルモンと尿中ヨードの値

	tHCY≤13 μ mol/L				tHCY>13 μ mol/L							
	fT3 (pg/ml)		fT4 (ng/dl)		fT3 (pg/ml)		fT4 (ng/dl)		UI (μg/L)			
	CTL	NTD	CTL	NTD	CTL	NTD	CTL	NTD	CTL			
妊娠週数≤20 週	CTL, n=29; NTD, n=13		CTL, n=23; NTD, n=18									
中央値	4.6	4.6	14.7	13.6	148.2	197.3	5.5	4.5	18.6	12.5	200.4	235.4
範囲	3.8-8.1	2.9-5.9	9.9-37.7	12.3-18.7	45.0-525.0	44.0-529.0	3.5-8.7	3.1-4.9	11.1-34.9	9.0-17.0	46.0-855.0	60.0-839.0
Mann-Whitney の U 検定の P 値*	-	-	-	-	-	-	P 値=0.002	P 値=0.002	P 値=0.000	-	-	-
妊娠週数>20 週	CTL, n=14; NTD, n=13				CTL, n=8; NTD, n=19							
中央値	4.1	4.2	12.4	13.8	215.3	262.4	4.3	4.2	14.9	13.8	161.2	185.0
範囲	2.9-4.8	3.6-5.3	9.8-16.4	11.0-17.0	54.0-609.0	129.0-688.0	3.8-5.8	3.1-5.8	11.8-18.4	9.5-18.2	49.0-782.0	57.0-612.0
Mann-Whitney の U 検定の P 値*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CTL:対照群; NTD:症例群。*P<0.05 のみの項目を表示してある。

図 1 の説明: CTL: 対照群、NTD: 症例群。

A: 妊娠週数 20 週以下かつ tHCY≤13 μ mol/L 対照群と症例群の fT₄ (中央値) の時系列曲線。

対照群において、妊娠 11-13 週と 17-20 週に fT₄ サージがみられたが、対照群において、fT₄ サージがみられなかった。

B: 妊娠週数 20 週以下かつ tHCY>13 μ mol/L 対照群と症例群の fT₄ (中央値) の時系列曲線

対照群において、妊娠 5 週と 14-19 週に複数の fT₄ ピークがみられたが、tHCY≤13 μ mol/L 対照群の fT₄ サージパターンと異なった。
症例群において、18-20 週に小さい fT₄ ピークが一つだけみられた。

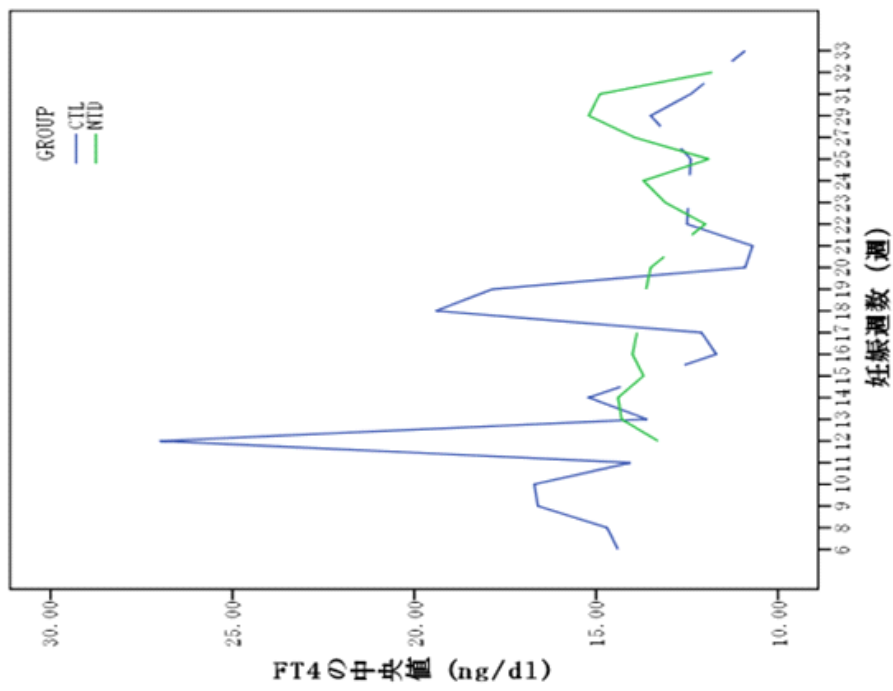


図1A

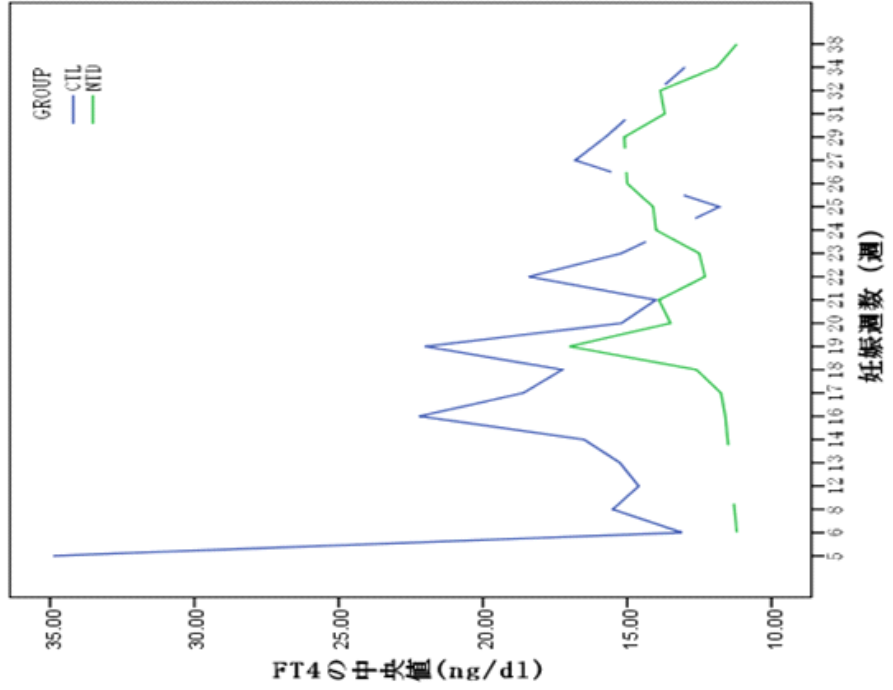


図1B

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 加藤 直也
所属機関名： 東京大学医科学研究所
所属部署名： 疾患制御ゲノム 職名： 特任准教授
医学ユニット
所在地： 東京都港区白金台 4-6-1
電 話： 03-3443-8111 内線： 72335



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

C型肝炎ウイルスコア蛋白変異と発癌および抗ウイルス治療効果

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 加藤 直也	職名： 特任准教授
所属機関名： 東京大学医科学研究所	部署名： 疾患制御ゲノム 医学ユニット
中国側研究者氏名： 王 岳	職名： 研究員
所属機関名： 中国疾病対策予防センター	部署名： ウイルス肝炎

4. 当該研究における発表論文等

学会発表

加藤直也、室山良介、五藤 忠. C型肝炎ウイルスコア領域 70 の置換により

ペグインターフェロン/リバビリン併用療法に対する感受性は変わるか？ 第

46 回日本肝臓学会総会 2010/5/27-28 山形

C型肝炎ウイルスコア蛋白変異と発癌および抗ウイルス治療効果

日本側研究者氏名	加藤 直也
所 属 機 関	東京大学医科学研究所 特任准教授
共同研究者氏名	李 雯雯、胡 中傑、室山良介、古渡礼恵
中国側研究者氏名	王 岳
所 属 機 関	中国疾病対策予防センター 研究員

要 旨

C型肝炎のペグインターフェロン・リバビリン併用治療抵抗性に最も関与しているウイルス側因子は、コア蛋白第70番のアミノ酸変異である。われわれはコア蛋白第70番目アミノ酸の野生型および変異型C型肝炎ウイルスのリアルタイムPCRアッセイによる個別定量法を確立し、それぞれのダイナミクスを詳細に検討した。

まず、1型高ウイルス量のC型慢性肝炎患者のシリーズ血清を用いて、治療前・中・後の野生型と変異型C型肝炎ウイルスのダイナミクスを検討した。次に、治療前の野生型および変異型C型肝炎ウイルスの比率と治療効果につき検討した。

治療前血清においては、36例中26例72%が野生型と変異型の混在型であった。その比率は治療中も変化せず、野生型および変異型C型肝炎ウイルスの治療に対する初期感受性は同等であった。治療前に野生型優位であった再燃例では、治療後のウイルス再出現時早期（治療後第4週目）には変異型が優位に変化しており、その後野生型と変異型C型肝炎ウイルスの比率は治療前と同様に野生型優位に復した。また、変異型C型肝炎ウイルスの比率が高くなるほどウイルス学的著効は得られにくかった。

多くの患者においてコア蛋白アミノ酸第70番目の野生型と変異型C型肝炎ウイルスが混在しており、変異型C型肝炎ウイルスの比率が高い患者ほどペグインターフェロン・リバビリン併用療法に抵抗性である。変異型C型肝炎ウイルスは排除されにくいと考えられた。

Key Words C型肝炎ウイルス、コア蛋白、アミノ酸置換、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法、治療効果

緒 言：

世界中には実に1億7千万人ものC型肝炎ウイルス感染者がいるとされる。日本の国民の約2%、また、中国の国民の約3%がC型肝炎ウイルスに感染している。C型肝炎ウイルスは、急性・慢性肝炎のみならず、肝硬変・肝癌の主要な原因である。したがって、日中両国にとって、C型肝炎は健康上の大いなる脅威となっている。C型慢性肝炎に対しては、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法が標準治療として行われているが、その奏功率は最も多い遺伝子型1型のC型肝炎ウイルスに対しては、たかだか50%に過ぎず、より治療効果を上げる方策が必要である。

最近になり、治療抵抗例ではC型肝炎ウイルスコア蛋白の第70番目アミノ酸が変異していることが多いことが報告された。また、このコア蛋白アミノ酸変異は治療抵抗性のみならず、肝発癌とも関連していることが報告された。実際に、われわれは本アミノ酸変異が肝癌と関連していることをグローバルデータベースを用いた解析で確認した。

そこで、まず、コアアミノ酸第70番目変異の高感度検出法を開発し、ペグインターフェロン・リバビリン

ン併用療法との関連を明らかにする必要がある。また、治療抵抗性と発癌に関わるコアアミノ酸第 70 番目変異の機能解析を行い、それらのメカニズムを明らかにする必要がある。

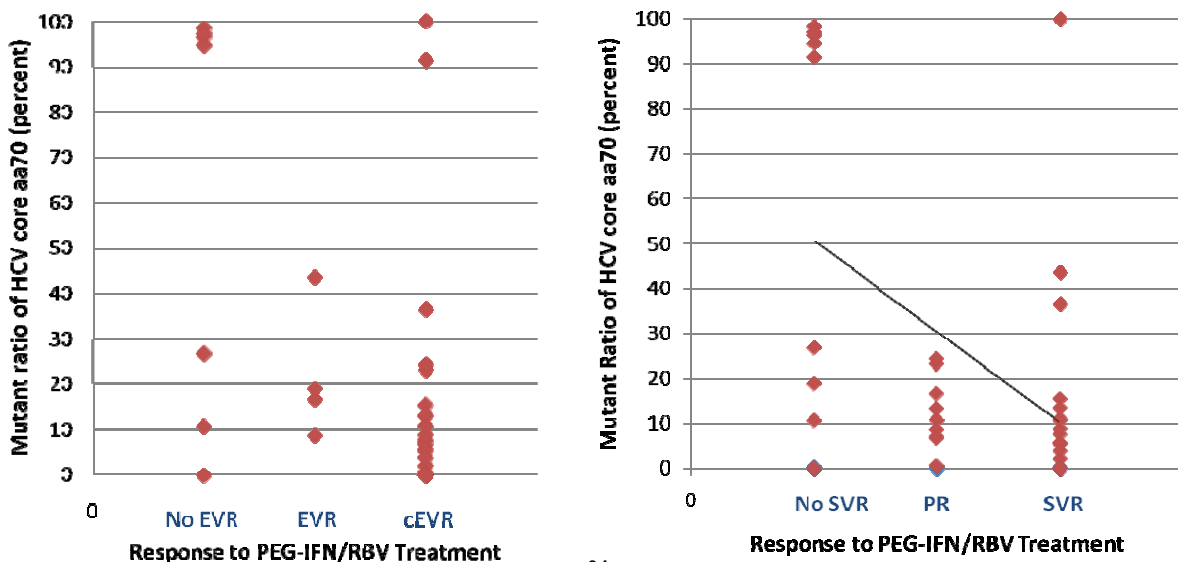
研究対象と方法：

- 1) Taqman MGB probe を用いて、コアアミノ酸第 70 番目の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスを個別に定量する高感度リアルタイム PCR アッセイを確立する。
- 2) インフォームドコンセントが得られた 36 例の遺伝子型 1 型の C 型慢性肝炎患者血清を用いて、治療前、治療経過中、治療後の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスの個別の量的推移を検討する。
- 3) 野生型優勢型の変異型コア領域と変異型優勢型の変異型コア領域を比較検討した。
- 4) 野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスコア蛋白が、肝癌細胞 (Huh7 細胞) においてインターフェロニンシグナル伝達系およびインターロイキン 28B シグナル伝達系に及ぼす影響を検討する。
- 5) 野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスコア蛋白が、アポトーシスに及ぼす影響を検討する。

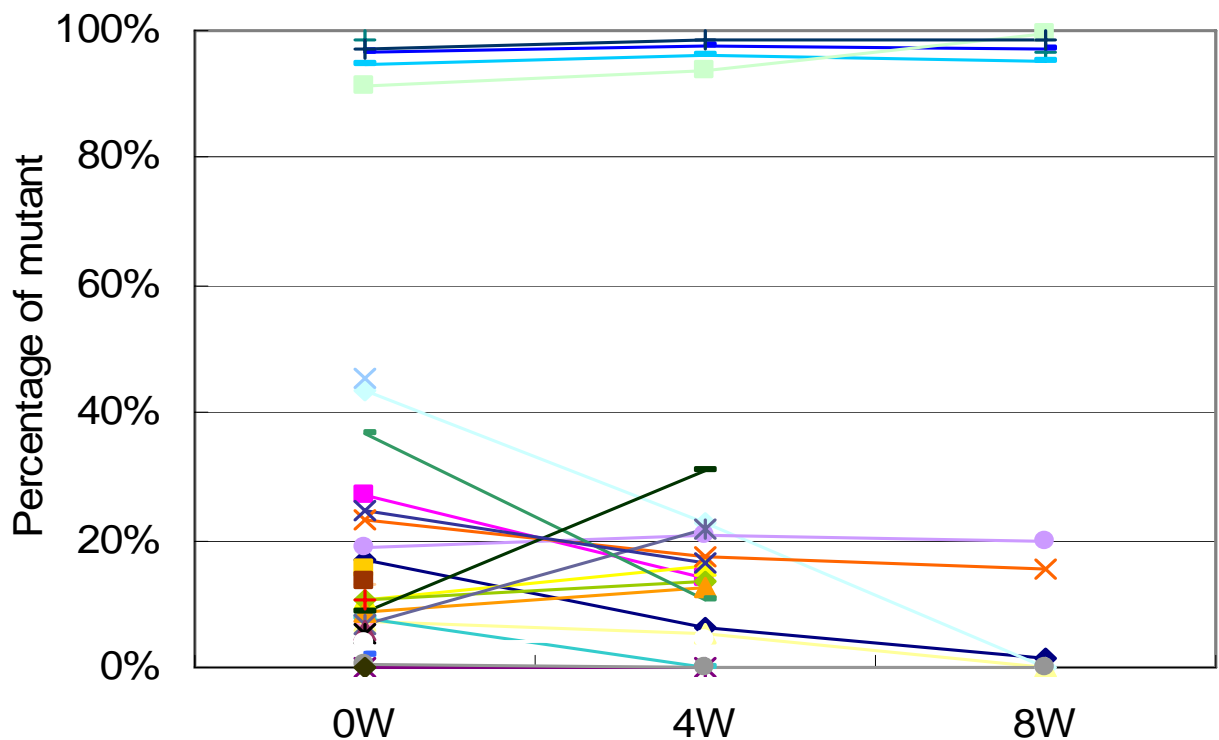
結 果：

- 1) 野生型および変異型 C 型肝炎ウイルス用プローブは、それぞれ 5 コピー中の 50% の野生型あるいは変異型 C 型肝炎ウイルスを検出可能、また、50 コピー中の 10% の野生型あるいは変異型 C 型肝炎ウイルスを検出可能であり、高感度かつ特異的な個別定量系が確立された。
- 2) 治療前血清において、36 例中 26 例 (72%) が野生型と変異型の混在型であった。また、36 例中 6 例 (17%) で変異株が野生株より優位であった。

変異株の割合が高いほど、有意に早期抗ウイルス効果 (early virological response: EVR) およびウイルス学的著効 (sustained virological response: SVR) が得られにくかった。



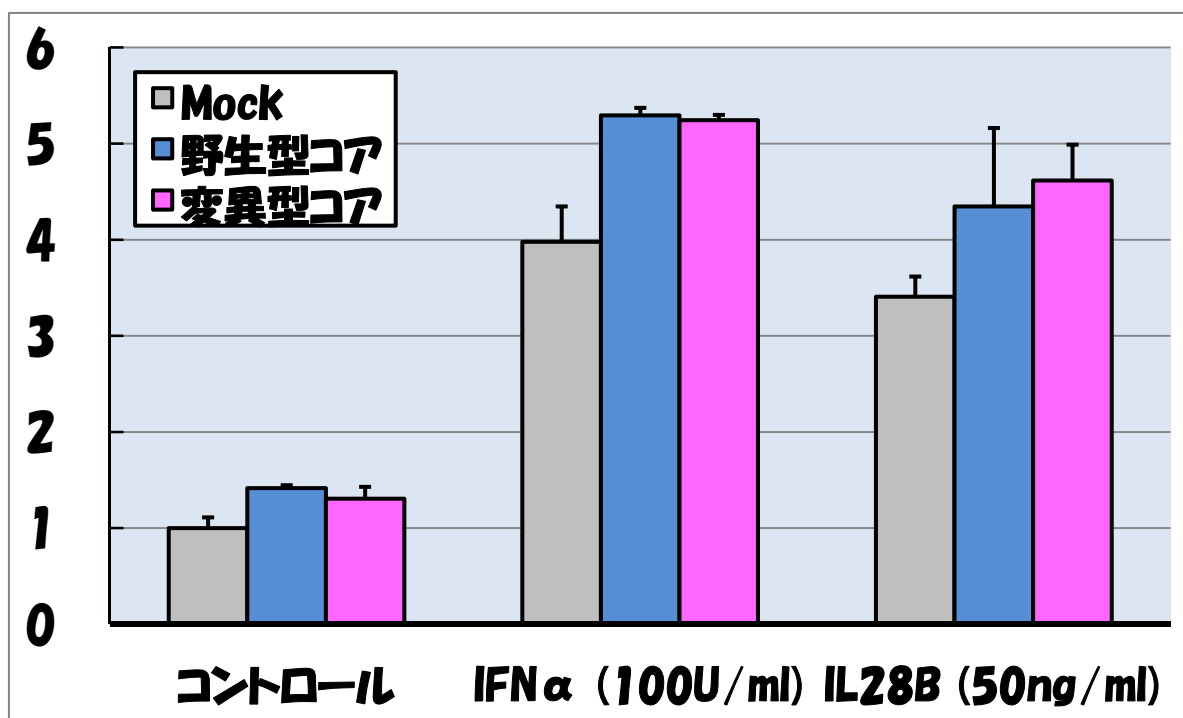
しかしながら、治療経過中の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスのダイナミクスを検討すると、治療経過中の野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスの比率は変化せず、野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスのペグインターフェロン・リバビリン併用療法に対する感受性は少なくとも治療初期には同等であることが判明した。



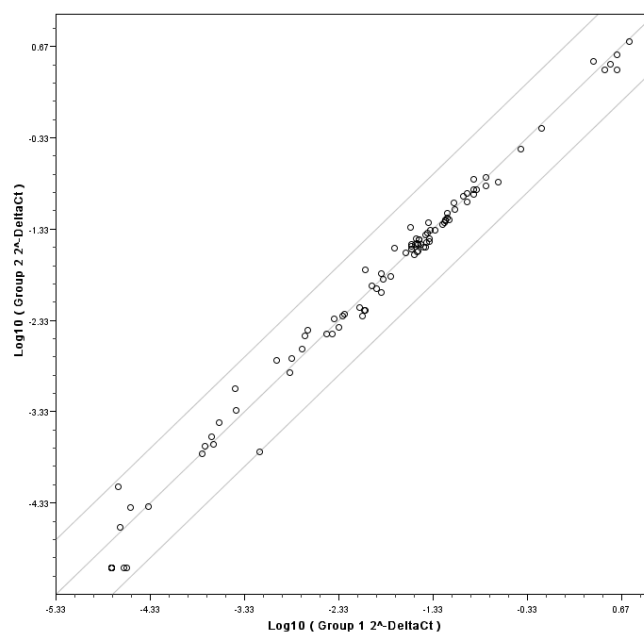
しかしながら、治療前に野生型優位であった再燃例では、治療後のウイルス再出現時早期（治療後第 4 週目）には変異型が優位に変化しており、その後野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスの比率は治療前と同様に野生型優位に復していた。

3) 変異型が優位な場合と野生型が優位な場合では変異型 C 型肝炎ウイルスに 2 塩基の有意な違いがあり、これらはウイルス増殖能に関連している可能性が考えられた。

4) 野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスコア蛋白はインターフェロンシグナル伝達系を活性化する傾向にあったが、両者の及ぼす影響には差がなかった。また、同様に、インターロイキン 28B シグナル伝達系に野生型および変異型コア蛋白が及ぼす影響には差がなかった。



5) 野生型および変異型コア蛋白がアポトーシスに及ぼす影響には差がなかった。



考察：

ほとんどの患者においては、C型肝炎ウイルスコア蛋白第70番目アミノ酸の野生型と変異型が混在していた。変異型優位の症例ではペグインターフェロン・リバビリン併用療法に治療抵抗性であるにもかかわらず、同一患者内における野生型と変異型C型肝炎ウイルスのダイナミクスには違いがなかった。しかしながら、再燃時には一時的に変異型が優位となり、変異型C型肝炎ウイルスは排除されにくいことが明らかとなった。

なぜある患者では変異型が優位になるのかについては、コア領域の変異と関連している可能性が示唆された。

しかしながら、変異型コア蛋白のペグインターフェロン・リバビリン併用量に対する治療抵抗性を生ずるメカニズム、あるいは肝発癌に関わるメカニズムについては、なお検討の必要がある。

参考文献：

1. Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N: Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* Vol 100, 2465-2468 (2009)

注：本研究は、2010年5月27日『46回日本肝臓学会総会』にて口演発表、2010年8月1日『BIT's 1st Annual Inaugurate Symposium of Hepatitis (SHV-2010)』にて口演発表、2010年9月10-14日『17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses』にてポスター発表、2010年10月28日『第1回疾患医科学ミニシンポジウム』にて口演発表、2010年12月17日『The APASL 7th Single Topic Conference "Hepatitis C Virus"』にてポスター発表、2011年2月18日『The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)』にて口演発表。

作成日：2011年3月14日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011年 3 月 15 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 近藤格

所属機関名： 国立がん研究センター

所属部署名：創薬プロテオーム研究分野

所在地：東京都中央区築地5-1-1

電話：03-3542-2511

職名：分野長

内線：3004



1. 助成金額：1,000,000 円

2. 研究テーマ

プロテオーム解析による肝細胞癌の病態解明に基づく個別化医療実現のための新規診断技術の開発および創薬シーズの探索

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：近藤格

所属機関名：国立がん研究センター

中国側研究者氏名：樊 嘉

所属機関名：復旦大学

職名：研究職、分野長

部署名：創薬プロテオーム研究分野

職名：外科医、教授

部署名：中山医院

4. 当該研究における発表論文等

1. 第8回 日本プロテオーム学会 シンポジウム 「Cancer Proteomics for Biomarker Development」近藤格

2. 第51回 日本癌学会学術総会 シンポジウム 「がんプロテオーム解析によ

プロテオーム解析による肝細胞癌の病態解明に基づく 個別化医療実現のための新規診断技術の開発および創薬シーズの探索

研究者氏名：近藤格

所属機関：国立がん研究センター 創薬プロテオーム研究分野

研究者氏名：樊 嘉

所属機関：復旦大学中山医院外科

共同研究者：黄成、バイオマトリックス研究所

要旨

肝細胞癌は本邦でも中国でも悪性腫瘍による死亡原因としては主要な位置を占めている。肝細胞癌の患者の予後は一般にきわめて不良であり、新しい予防、診断、治療法の開発が求められている。遺伝背景を共有する日本と中国とが協力し、肝細胞癌の治療成績の向上を目指した研究にあたることは、国民の健康福祉の向上のみならず、両国の将来をともに形作ることにもつながるため重要な課題である。国立がん研究センターでは、かねてから復旦大学中山医院と共同で肝細胞癌の治療成績の向上を目指した基礎研究を行ってきた。臨床的には肝細胞癌では手術後の再発が大きな問題となっている。再発する臓器としては肝臓がもっとも多く、早期に肝内再発（転移）を来す症例の予後はきわめて不良である。肝内再発の分子機構を解明し、肝内再発を予測して未然に防いだり、肝内再発を見越した治療戦略を立てることによって、肝細胞癌の治療成績の向上が見込まれると考えられている。

国立がん研究センター研究所では、悪性腫瘍を対象とした大規模なプロテオーム解析が行われてきた。大型の二次元電気泳動装置や質量分析装置を用いた一般的なプロテオーム解析に加え、多数の抗体を用いた解析を行っていることが特色である。具体的には、転写因子やアポトーシス構成因子など、悪性腫瘍の発生や進展に関わることがわかっている分子経路に含まれているタンパク質について抗体を入手し、ウェスタンブロッティングを行うことで発現解析を行うというものである。一般的なプロテオーム解析では微量なタンパク質（たとえば転写因子など）を観察することはきわめて困難であり、しかも特定の分子パスウェイに含まれるタンパク質に的を絞って解析することはほぼ不可能である。しかしながら、抗体を用いた解析であれば可能である。たとえば、目的とする分子パスウェイに含まれるタンパク質すべてについて一つずつ抗体を使って調べることでパスウェイワイドな解析が可能になる。国立がん研究センター研究所ではいくつかの学術機関や民間企業との共同研究によって多数の抗体が使用できる環境にあり、このたびの研究ではその抗体を用いた解析を実施した。具体的には約600種類の核内因子に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施した。

復旦大学中山医院は、中国でもっとも肝細胞癌の切除術が多く行われている医療機関であり、

年間約2000症例が肝細胞癌の手術を受けている。臨床のみならず手術検体を用いた基礎研究でも実績をあげている。術後の追跡調査も十分に行われており、臨床情報を用いた研究が可能である。

本研究では、国立がん研究センターのユニークなプロテオーム解析システムと復旦大学の臨床検体を用いて、肝細胞癌の早期再発に関わる核内因子を網羅的に調べた。結果的に、早期再発に関わると考えられる核内因子24種類、発癌に関わると考えられる核内因子148種類と特定した。免疫染色は中国国内でしかできないため、現在復旦大学にて組織アレイを用いた解析を実施中である。

Key Words: hepatocellular carcinoma, proteomics, western blotting, early intrahepatic recurrence, nuclear factors

緒言

肝細胞癌の治療成績の向上のための基礎研究として、早期の肝内再発に着目した研究はきわめて重要である。肝細胞癌は予後不良な疾患であるが、早期に再発を来す症例の予後はきわめて不良であること、さらに早期に再発を来す症例が多いこと、などからである。本研究では、国立がん研究センターのプロテオーム解析技術と、復旦大学中山医院の手術検体および臨床情報を用いた解析を実施した。

対象と方法

対象としたのは、復旦大学中山医院において肝細胞癌の根治切除術を施行された症例であり、手術検体を用いた解析を行った。手術検体としては、腫瘍組織50検体および非腫瘍組織50検体を使用した。手術検体はかならずしも同一の症例に由来するものだけではない。臨床検体を医学研究の目的に使用することについて文書による同意を提供者から得ている場合にのみ、検体を使用した。また、本研究は、復旦大学の倫理委員会の承認および国立がん研究センターの倫理委員会の承認を得て実施した。

発現解析の目的で、579種類の市販モノクローナル抗体を使用したウェスタンブロッティングを行った。国立がん研究センターと共同研究契約を締結しているバイオマトリックス研究所の抗体を使用した。手術検体より高濃度のウレアを含むバッファー（7M urea, 2M thiourea, 3% CHAPS, 1% Triton X-100）にてタンパク質を抽出した。SDS-PAGEによってタンパク質を分子量にしたがって分離した。分離はディスパーザブルの市販のゲル（ATTO社製）を使用した。予測される分子量にしたがってゲルの濃度を決定した。次に、分離されたタンパク質を電気的に膜に転写した。転写されたタンパク質に対して上記の抗体を反応させ、化学発光（ECL-Plus, GE）によって抗原抗体複合体を検出した。検出系にはLAS-3000（富士フィルム）を使用した。検出されたシグナルの定量を画像解析ソフトを用いて行った。発現の有意性の基準は、p値が0.05より小さく、しかもグループ間の平均の差が2倍より大きいこととした。

組織アレイは復旦大学中山医院で作成されたものを使用した。上記のウェスタンブロッティングに使用した抗体を用いて組織アレイを対象に免疫染色を行った。免疫染色の判定は復旦大学中山医院の病理医および外科医が行い、その結果の確認を国立がん研究センターの共同研究者とともにに行った。

結果

手術後2年以内に再発を来した25症例と、2年以上の観察期間中に再発を来していない25症例の比較を行った。腫瘍組織どうしの比較においては、21種類の核内因子が有意な発現差を示していた。同様の比較を非腫瘍組織どうしに行うと、3種類の核内因子が有意な発現差を示していた。

非腫瘍組織（50検体）と腫瘍組織（50検体）の比較を同様にウェスタンブロッティングで行い、148種類の核内因子が有意な発現差を示していることがわかった。

次に、同定された核内因子が肝細胞癌および非腫瘍組織のどの細胞に発現しているかを確認する目的で、組織アレイを用いた解析を行った。まず、再発に関わるとして同定された上気の24種類の核内因子、腫瘍組織と非腫瘍組織の間で発現差が認められた26種類の核内因子について免疫染色を実施した。すべての抗体が免疫染色にて反応性を示したわけではないが、ウェスタンブロッティングと同様な発現差を示す核内因子が同定された。さらに興味深いことに、ウェスタンブロッティングにおいて腫瘍組織で発現が高いとして同定された核内因子の中には、腫瘍内の血管内皮細胞に特異的に発現するものが含まれていることが分かった。

考察

本研究において、肝細胞癌の再発に関わる核内因子、発癌に関わると考えられる核内因子を同定することができた。核内因子はヒトゲノム上には約2000種類がコードされていると考えられている。我々は今回、その約3分の1を調べたことになる。このような解析は抗体を用いてのみ可能であるが、同様の解析が実施できる研究室は国立がん研究センター以外には国内外に存在しない。また、今回は臨床情報が付随した100検体の手術検体を使用した。国内では肝細胞癌の手術数は減っており、再発の情報が付加されたこれだけの数の手術検体を研究に使用することはかなり困難である。したがって、本研究は日本と中国のそれぞれの長所を活かした研究であると言える。

核内因子の異常がどのような遺伝子発現の異常を引き起こし、ひいては腫瘍細胞の形質に影響を与えているのかを調べるのが今後の課題である。その目的では、siRNAを用いて対象とする核内因子の発現を低下される実験を肝細胞癌の培養細胞を用いて実施しているところである。また、同定された核内因子がどのように臨床上有用であるのかを調べるのが最終的な目的であり、そのためには上記の機能解析の実験に加え、さらに多数症例にあたる必要がある。

今回の研究成果をもとにして、現在、復旦大学において組織アレイを用いた大規模な検証実験を行っているところである。対象とする核内因子は上記の50種類だけでなく、今回の解析で

発現差があると認められたものすべてである。

日本と中国との共同研究が、本研究助成金をもとにさらに発展し、両国の共同研究の成果として肝細胞癌の治療成績の向上を宣言できる日を目指してこれからも研究に励みたいと考えている。

2011年3月15日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 年 3 月 14 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名 下野 勉
所属機関名： 岡山大学大学院
所属部署名：医歯薬総合研究科 職名：特命教授
所 在 地：岡山市鹿田町 2 - 5 - 1
電 話：086-235-7151 内線：6715

1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

妊婦および乳幼児の歯科保健に関する研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名：下野 勉	職名：特命教授
所属機関名：岡山大学大学院	部署名：医歯薬学総合研究科
中国側研究者氏名：葛 立宏	職名：教授
所属機関名：北京大学口腔医学院	部署名：小児歯科

4. 当該研究における発表論文等

発表予定論文；・日中両国における妊婦の歯科保健の比較

・乳幼児歯科健診における妊婦歯科教室の効果

妊婦および乳幼児歯科保健に関する研究

研究者氏名	下野 勉
日本研究機関	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
中国研究機関	北京大学口腔医学院 小児歯科
共同研究者名	教授 葛 立宏

要旨

「暮らしの病」と呼ばれるがごとく、齲蝕症の発病に至るまでの過程に、日々の生活習慣が大きく影響を及ぼしている。従って、齲蝕予防対策を講じるためには、生活リズムの基礎が形成される乳幼児期における養育者と子供の行動科学的要因を分析する必要がある。また、細菌学的要因としての齲蝕原性細菌が伝播し、発病に至る過程を解明することは公衆衛生学的にもきわめて重要である。

他の先進国と比べて少子化傾向の著しい日本と、一人っ子政策の進む中国においては、小児期から成人期にかけてのライフサイクルの中でも乳幼児期に齲蝕が急増しており、その発生に関与する様々な要因を早期に見出し、適切な歯科的アプローチを行うことが望まれる。

そこで本研究では 2010 年度に大阪府交野市保健センターと中国北京市海淀区婦幼保健院で行われた妊婦歯科保健指導において妊婦の齲蝕細菌学的要因を齲蝕活性度試験により調べ、母親の齲蝕発生に関する生活習慣をアンケート調査により調べ、両国の結果を比較検討したところ、齲蝕活動性試験カリオスタットで調べた齲蝕活性度は、ハイリスク者の割合が日本人妊婦が中国人妊婦と比べて約 2 倍大であり、自分は虫歯が多いという自覚症状を有する割合は、日本人妊婦が中国人妊婦とは比べて 3 倍以上も大であった。しかし未処置の虫歯の存在に関する意識は中国、日本の間で差が認められなかった。齲蝕原性細菌の伝播に関係すると思われる噛み与えをする危険性に関しては、中国人妊婦のほうが少ない傾向がみられた。

Key Words 妊婦、歯科保健、カリオスタット、齲蝕活動性、アンケート

諸言：

近年、“80 歳まで自分の歯を 20 本以上持つ”という 8020 運動のスローガンのもと、各地で運動歯科保健事業への取り組みが展開されている。しかし、80 歳で平均残存歯数 5.1 本の現状を考えると、より早期からの継続的な歯科健診体制の確立が望まれる。そこで、出生前からの歯科的アプローチに着目し、大阪府交野市において妊婦歯科教室を実施し、妊婦自身の口腔内状況の改善と出生した乳幼児の齲蝕発生の抑制に著しい成果を上げてきた。今回、一人っ子政策が進み、乳幼児の養育方法の変化に伴い、乳幼児の重症齲蝕が散見される中国において、その予防策の一つとして、中国北京市で日本と同じ形式の妊婦教室を行い、妊婦の保健指導に用いたアンケートとカリオスタット検査結果を分析し、日本と中国の比較検討を行った。

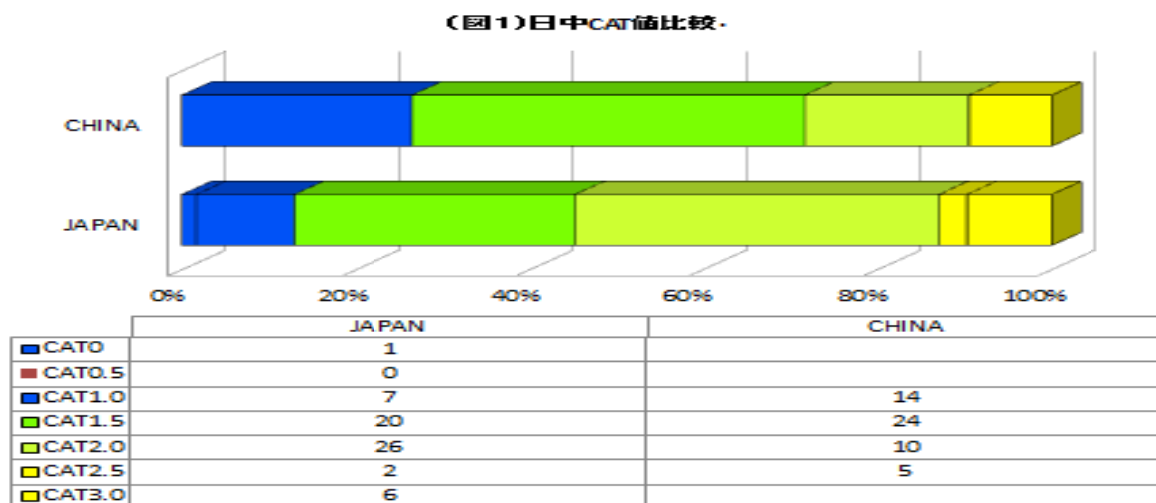
対象と方法：

2010 年 4 月から 2011 年 3 月までに日本、大阪府交野市保健センターと中国、北京市海淀区婦幼保健院で行われた妊婦歯科保健教室を受講した妊婦、日本側 62 名、中国側 53 名にたいしてビデオやスライドを用いて集団指導を実施し、初回の産科教室の時にいったカリオスタット検査と生活習慣に関するアンケートの結果に基づき、間食や生活習慣の改善、歯磨き指導を行い、妊婦自身の口腔健康観の向上を図った。

結果：

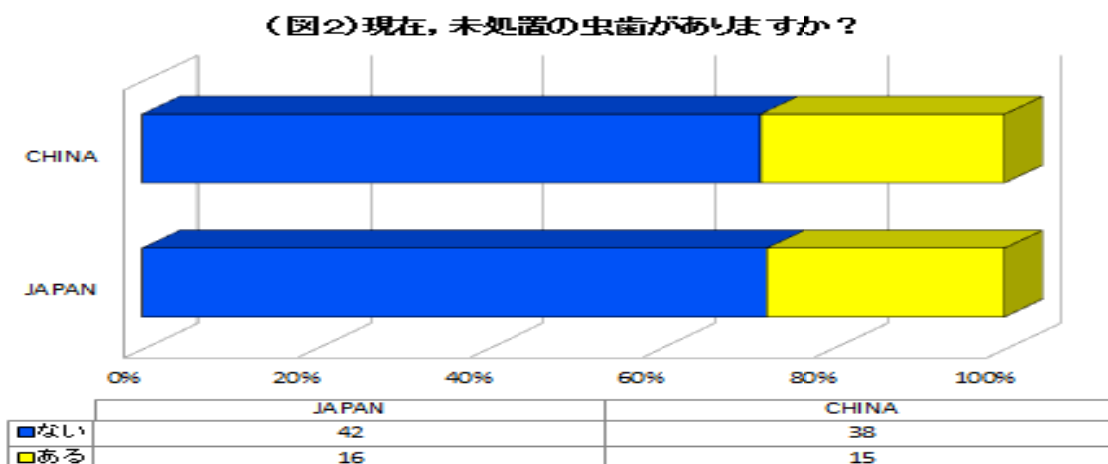
日本人妊婦と中国人妊婦の齶蝕活性度の比較

交野市の妊婦の齶蝕活性度の分布は北京市の妊婦の齶蝕活性度の分布に比べてハイリスク者の分布が多く、CAT値 2.0 以上(肉眼判定；黄緑色、pH；4.7 以下)のハイリスク者の割合は交野市では 54.8%に対して北京市では 23.8%日本人妊婦のほうがハイリスク者の割合が約 2 倍高率であった（ 図 1 ）

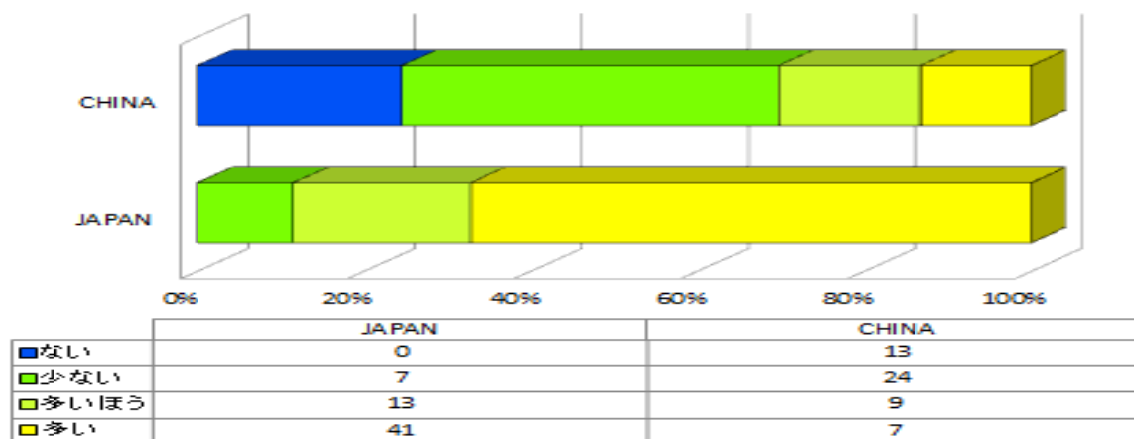


口腔内症状に関する質問

未処置の虫歯の有無に関する質問に対しては、日本では 33%、中国では 28.3%が現在未処置の虫歯を有している、と答えており、回答の分布には差を認めなかった(図2)が自分は虫歯が多いほうだと思うかの質問に対しては、日本で 67.2%、中国で 13.2%と 5 倍以上の回答率の差を認めた (図 3)。



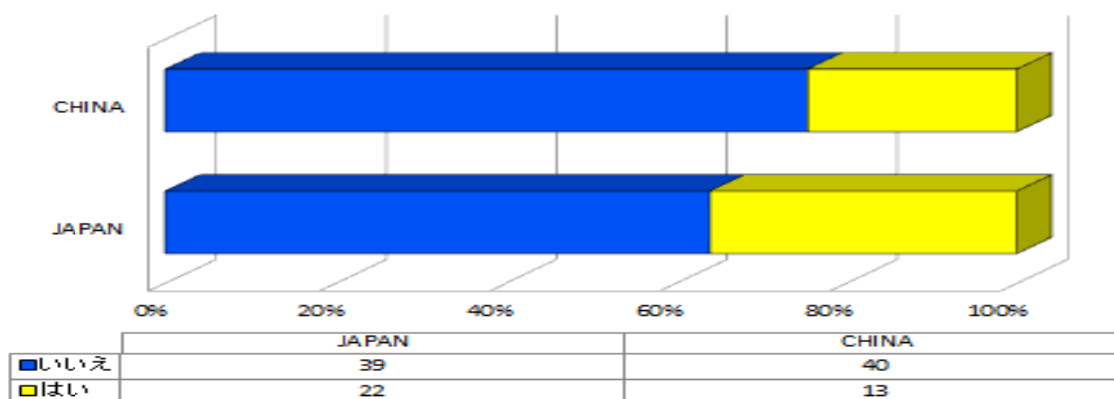
(図3) 自分は虫歯が多いほうだと思いますか？



間食に対する質問

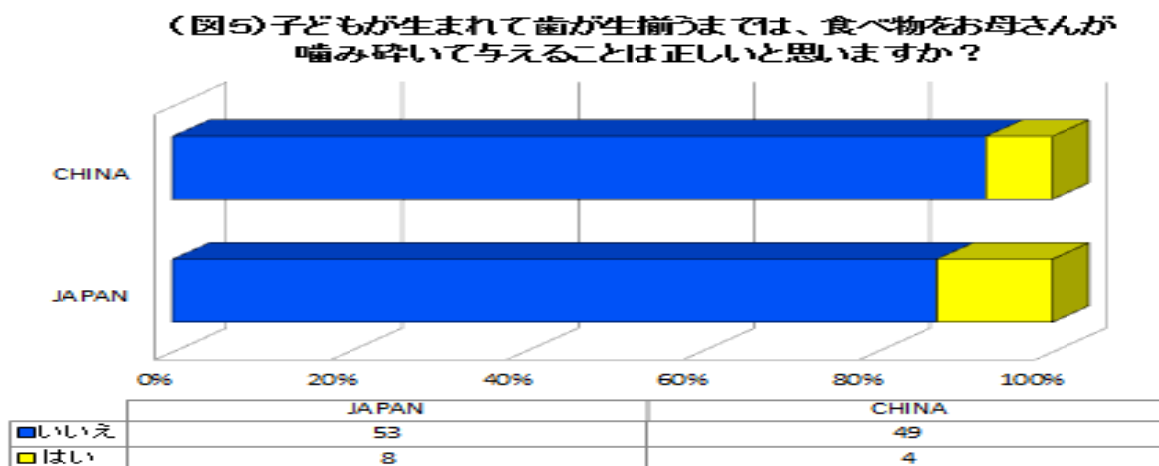
飴やチョコレート、ジュースなど齲蝕誘発性の高い食品をいつも買い置きしているかの質問に対して日本では 36.1%であるのに対して、中国では 24.5%と日本のほうが高い回答率を示した (図 4)

(図4) あめ、チョコレート、ジュース(コーラ、紅茶等)は常に買い置きしていますか？



噛み与えに関する質問

歯の萌出期から始まる離乳食を育児担当者が食品を噛み砕いて児に与えることがあるが、もし、育児担当者が齶蝕原性細菌を有していて、しかもショ糖含有食品が口腔内に存在している状態であるとすれば噛み与えは非常に危険な行動であり、齶蝕原性細菌の伝播が危惧される行動である。そこで、子供が生まれて歯が生えそろうまでは、食べ物をお母さんが噛み砕いて与えることは正しいと思いますかという質問を行ったところ、日本では13.1%が中国では7.5%が正しいと答えており、日本のほうが約2倍高い割合が示された。



考察：

2010年4月から2011年3月までに日本大阪府交野市保健センターと中国北京市海淀区婦幼保健院で行われた妊婦歯科保健指導において採取した齶蝕活性度試験（カリオスタット）の結果とアンケート調査の結果を比較検討したところ、カリオスタットで調べた口腔内の齶蝕細菌の酸産生能力から見た齶蝕活性度（CAT値）の分布は日本人妊婦のほうがハイリスク者の割合が約2倍であり、自覚症状としては中国人妊婦の3倍以上の割合の日本人妊婦が自分は虫歯が多いほうだと答えている。しかし未処置の虫歯の存在に関する意識は中国、日本の間で差が認められなかった。すなわち、自分は虫歯が多いほうだと思っている人の中での未処置歯を持っている人の割合は中国人のほうが高く、日本人のほうが処置率の高いことが窺われる。虫歯の要因として考えられるアンケート項目では菓子類の買い置きは中国のほうが少なく、また、出生後の育児の中で見かけられる食物を母親が噛み砕いて与える齶蝕原性細菌の伝播につながるリスク行動も中国人妊婦のほうが少ない傾向がみられた。人口規模の大きな中国においては例え少しの虫歯増加も医療需給バランス壊すことにつながる。急激な増加しつつある中国の乳幼児を対象としてスクリーニングを行い、ハイリスク者を重点的に教育指導を行うことで、重症齶蝕を持つ乳幼児の発生を抑制できる可能性が示唆される。虫歯水を経験してやっと最近乳幼児の虫歯発生の減少の兆しがみられる日本の経験をもとにして、日中間での協力を益々さかんにする必要性がある。

参考文献：

1. 下野勉 壺内智郎 中村由貴子 福島康祐 岡崎好秀：口腔衛生会誌 J.Dent. Hlth.49:544-545,1999
2. 山岡瑞佳 壺内智郎 中村由貴子 岡崎好秀 下野勉：口腔衛生会誌 J.Dent. Hlth.51:572-573,2001

作成日：2011年3月13日

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書—調査・共同研究—

2011 年 3 月 4 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 吉成 正雄
所属機関名： 東京歯科大学
所属部署名：口腔科学研究センター 職名：教授
口腔インプラント学研究部門
所在地：千葉県千葉市美浜区真砂 1-2-2
電 話： 043-270-3536 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

チタン表面改質による即時荷重インプラントシステムの開発

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 吉成 正雄	職名：教授
所属機関名： 東京歯科大学	部署名：口腔科学研究センター
中国側研究者氏名： 魏 建華	職名：講師
所属機関名： 第四軍医大学口腔医学院	部署名：口腔外科

4. 当該研究における発表論文等

第 32 回日本バイオマテリアル学会 (2010 年 11 月 30 日、広島)、シンポジウム
第 3 回口腔先端応用医科学会議 (2011 年 1 月 22 日、東京)、招待講演

5. 成果の概要

現在、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献する即時荷重インプラントを開発する要求が高まっており、チタンに生体活性やオッセオインテグレーションを向上させる様々な表面改質法

チタン表面改質による即時荷重インプラントシステムの開発

研究者氏名	魏 建華
中国所属機関	第四軍医大学口腔医学院
日本研究機関	東京歯科大学 口腔科学研究センター
指導責任者	教授 吉成正雄
共同研究者名	三浦 直, 田辺耕士, 江黒 徹

要 旨

即時荷重インプラントは、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献することから、チタンに生体活性を向上させる表面改質法により本試システムを実現する試みがなされているが、最適な表面改質法は未だ明らかになっていない。本研究は、インプラント表面の濡れ性が細胞の初期接着及びその後の細胞動態に重要な役割を果たすことから、チタン表面の濡れ性に及ぼす表面形状と表面性状を変化させた表面処理、ならびに保存条件の影響を明らかにすることを目的とした。粒度の異なるアルミナブラスト処理および酸処理を行った後、酸素プラズマ処理(O₂plasma)、紫外線照射処理 (UV)、過酸化水素処理(H₂O₂)が施され、濡れ性（水に対する接触角）を計測した。その後、保存条件が表面親水性の持続性に及ぼす影響を調査した。さらに、それらの表面処理が骨芽細胞の動態に及ぼす影響を調査した。

表面形状に関し、ブラスト処理後に酸処理を施した条件で接触角がほぼゼロである超親水性を示した。表面性状に関し、O₂plasma 処理、UV 処理を施した試料は全ての表面形状で超親水性を示した。この親水性は大気中保存で急速に失われたが、水中保存では超親水性を維持した。また、超親水性表面は骨芽細胞の増殖、分化を促進することが明らかとなった。以上より、早期骨形成に寄与するべく親水性を得るための表面形状と表面性状を制御する処理法、また親水性を持続する保存法が明らかとなった。

Key Words : 歯科インプラント, チタン, 酸素プラズマ, 紫外線照射, 骨芽細胞

緒 言 :

インプラント骨接触部へ骨芽細胞の早期接着・増殖あるいは分化を促す環境を作り出すことは、オッセオインテグレーションを早期に実現するための重要な因子の一つである。細胞のインプラントへの接着、増殖、分化はインプラント表面の性質、すなわち表面形状 (surface topography) および表面性状 (surface physicochemistry) に影響される。表面形状は細胞の接着、伸展、配列、集簇に大きく影響するばかりではなく、細胞の分化・発現形態に重要な役割を与えることはよく知られている。一方、表面性状は、インプラントとタンパクや細胞の吸着や接着に影響を与える。表面の性状を決定する物理化学的な因子は表面エネルギー（濡れ性、接触角などで評価）と表面荷電（ゼータ電位、等電点などで評価）であり、これらの性質は表面官能基の形成情況に支配される。

近年、表面濡れ性が骨芽細胞の動態、ひいてはオッセオインテグレーションに影響を及ぼすことが指摘され、親水性を付与したインプラントも市販されている。親水性と細胞接着の関係では、親水性が大きな表面で細胞接着性が増大傾向にあることが報告されている。さらには、チタン表面への低温プラズマ処理（グロー放電）による親水性処理によって、各種細胞の初期接着性や分化特性が向上することが報告されている。我々は、酸素プラズマ処理により創製された超親水性表面は骨芽細胞、線維芽細胞の初期接着の促進に有効であることを報告した^{1,2)}。

親水性を付与する方法として、低温プラズマ法(グロー放電処理)、紫外線(UV)照射法、過酸化水素水(H₂O₂)浸漬法などが提案されている。低温プラズマ法は、低温でプラズマ(電離状態)をつくりだす処理法であり、

表面に官能基を導入し表面エネルギーや表面荷電などの表面性状が制御できることから、生体材料への応用が拡大している。UV 照射法は、チタン酸化物の光触媒効果によりチタン表面に親水性を付与し、骨芽細胞の増殖、分化に有効に働くことが報告されている。H₂O₂ 浸漬法は、主に整形外科領域で提案されてきた処理法であり、表面に水酸基を導入することにより親水性を付与すると云われている。

一方、各種処理により得られた親水性はその後の大気中保存により急速に親水性が失われて疎水化に転じることから、本法を臨床へ応用するためには親水性を持続させる方法を開発することも重要な課題である。

そこで本研究は、表面形状と表面性状を変化させた表面処理がチタンの濡れ性に与える影響、および親水性を維持する保存条件の影響を明らかにすることを目的とした。同時にこれらの表面処理が骨芽細胞の動態に与える影響を調査した。

材料と方法：

1. 試験片の作製および表面処理

使用したチタンは直径 13mm、厚さ 1mm の JIS2 種チタン板 (Kobe steel, Japan) である。表面形状に関し、鏡面 (MS)、各々の粒度のアルミナブラスト処理を施した表面 (SB25, SB50 および SB150)、および SB150 に酸エッチングを施した表面 (SB150E) を調製した。表面性状に関し、表面形状調製直後 (大気中で 10 分間保存) の試料をコントロールとして用いた (As)。さらに、酸素プラズマ処理を 10 分間施した試料 (O₂Plasma)、紫外線照射 (励起波長 254 および 365nm) を 2 時間施した試料 (UV)、および酸性 H₂O₂ 溶液 (pH4.0, 60°C) に 1 日間浸漬した試料 (H₂O₂) を作製した。

2. 表面形状観察および表面粗さ測定

表面形状観察は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた。また、表面粗さの測定は表面形状測定器を用い算術平均粗さ (Ra) および最大高さ (Rmax) を算出した。

3. 接触角の測定、接触角の経時的変化

各処理表面の純水に対する濡れ性 (接触角) を表面形状および表面性状の調製 10 分後に測定した。処理面を純窒素でブローした後、水滴量 4μL の条件で液滴 15 秒後に接触角を計測した。また、接触角の経時的変化は SB150E を用い、大気中 (Air)、純水中 (DW) およびエタノール中 (Eth) と保存条件を変化させて測定した。

4. 骨芽細胞の培養試験

表面形状を SB150E に調製後、大気中 (As-Air)、蒸留水中 (As-DW) また、SB150E を O₂ 処理後蒸留水中 (O₂-DW)、UV 処理後蒸留水中 (UV-DW)、H₂O₂ 処理後蒸留水中 (H₂O₂-DW) に 1 週間保存した。これらの試料表面上で、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を通法にしたがった培養した。細胞播種後 1,3,5,7 日後の増殖を WST-1 法により評価した。また、播種後 7, 14 日後の ALP 活性を測定した。

結 果：

1. 表面形状および表面粗さ

MS は表面が平滑であり、表面粗さも $Ra=0.08\pm 0.02\mu m$ と鏡面を呈していた。SB 処理は、ブラスト粒子が大きくなるに従って凹凸が激しくなり、表面粗さも大きくなった。SB150E は、SB150 と比較してエッチピットによる微細な凹凸が多くなった。また、表面粗さは、Rmax が顕著に大きくならなかったのに対して Ra は顕著な増大を示し、SB150E は大きなうねりを持つ山に微細な凹凸が付与されている様相を呈していた。

2. 表面処理 10 分後の接触角

表面形状および表面性状を変化させたチタン表面の調製 10 分後の接触角を図 3 に示す。

表面形状の違いについて、大気中保存 10 分の試料 (As, コントロール) についてみると、MS が約 70° の接触角であったのに対し、表面粗さが大きい条件では接触角が小さくなった。特に、SB150E においては接触角がほぼ 0° と超親水性を示した。それ以外の表面性状を変化させた試料 (O₂, UV, H₂O₂) に関しては、表面形状の違いによる顕著な差が見られなかった。

表面性状の違いについて、特に O2, UV 処理を行った試料は全ての表面形状で超親水性を示した。

H2O2 試料は MS において As より接触角が小さくなったものの、SB150E では逆に接触角が大きくなった。

3. 接触角の経時的変化 (SB150E)

保存条件の違いによる接触角の経時的変化は、As 試料 (調製直後の接触角 0°) において、大気中保存 (Air) では急速に接触角が大きくなり 7 日後で約 100° と疎水性表面となり、その後は一定となった。Eth 保存においては 7 日後で As より小さい約 80° を示した。一方、純水中保存 (DW) では保存後 21 日においても接触角 3° と超親水性を維持した。O2 および UV 試料 (調製直後の接触角 0°) では、As 試料より全体的に小さな接触角で推移しているものの、保存条件の違いにおいては As 試料と同様な傾向を示した。H2O2 試料 (調製直後 17.5°) は他の試料と同様に Air, Eth 保存では経時的に接触角が大きくなるものの DW 保存では小さくなった。

3. 骨芽細胞の培養結果 (SB150E)

表面形状 SB150E 上における骨芽細胞の増殖傾向を図 2 に示す。水中に保存した As-DW (未処理) に比較し、特に O2-DW, UV-DW 試料上では、培養 3 日後に増殖が増加し、増加傾向は 5 日後で顕著になった。ALP 活性は、As-DW に比較し、O2-DW, UV-DW, H2O2-DW は 7 日後から有意に増加した。

考 察 :

本研究は、先ず処理直後 (10 分) の表面形状がチタンの濡れ性に与える影響 (As) を検討した。その結果、ブラスト処理面は鏡面に比べ親水性を示した。特に、ブラスト処理に酸エッチングを施した表面 (SB150E) においては接触角がほぼ 0° と超親水性を示した。この結果は、Wenzel model³⁾により説明できる。表面形状が異なるときの接触角 $\cos\theta_r$ は、 $\cos\theta_r = r \cos\theta$ で表せる (r : 表面構造因子, $\cos\theta$: 平坦表面の接触角)。この model は、平坦面で接触角が 90°未満の親水性表面では、表面が粗造化するとより親水性に、疎水性表面ではより疎水性になることを意味している。表面構造因子 r には表面積が大きく関与し、表面積が無限大になるような表面 (フラクタル表面) は超親水性や超疎水性表面になりうる。

本研究における SB150E 表面は、SB150 と比較し微細な凹凸が多くなり、表面粗さ計測では R_{max} が顕著に大きくならなかったのに対して R_a が顕著な増大を示し、大きなうねりを持つ山に微細な凹凸が付与されている様相を呈していた。したがって、SB150E 表面では表面積が極端に大きくなり、超親水性に転じたと考えられる。

本研究では次に、表面性状を変化させる各種表面処理がチタンの濡れ性に与える影響を検討した。その結果、特に O2, UV 処理を行った試料は全ての表面形状で超親水性を示した。

チタンに酸素プラズマ照射や紫外線照射を施すと、表面は親水性に変化する。酸素プラズマ照射に関しては、高エネルギー分子の衝突によって有機物質が分解される、また酸化チタンがプラズマ状態酸素により励起され同時に雰囲気中の水分子が反応し水酸基が形成されると報告されている。UV 照射に関しては、250nm 付近以下で有機化合物を分解する、酸化チタン (アナターゼ型) は波長が 387nm 以下で光触媒反応により OH ラジカル

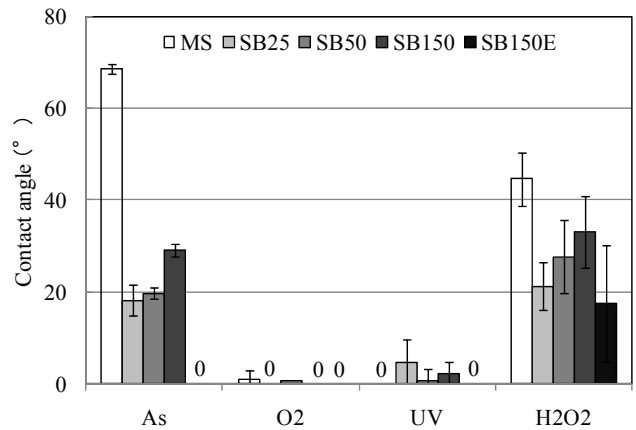


図 1 表面形状および表面性状を変化させたチタン表面の接触角 (調製 10 分後)

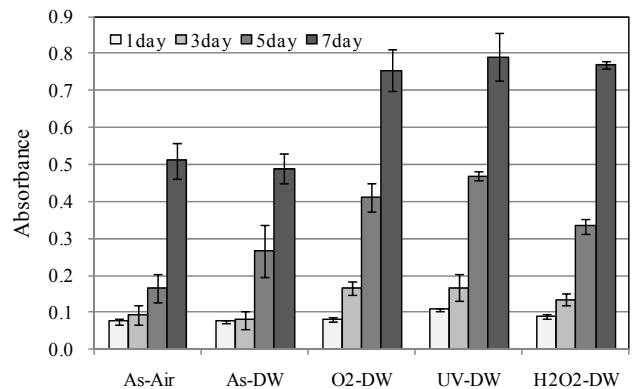


図 2 各種表面処理チタン上での細胞増殖 (SB150E)

および空気中の水分子の解離吸着により水酸基を形成すると報告されている。以上の如く、酸素プラズマ処理と UV 照射では本質的に差はなく、量的な違いこそあれ、表面に吸着した疎水性有機物（ハイドロカーボン）が分解される効果と、表面に水酸基が導入される効果が相まって、超親水性を発揮するものと考えられる。なお本研究では、処理時間を O2Plasma では 10 分に、UV 処理では 120 分としたが、文献も参考にすれば処理効率は O2Plasma が有利と考えられる。

本研究において、過酸化水素 (H₂O₂) 処理は、水酸基が生じやすくチタンを腐食しない濃度と pH に設定した。その結果、MS において As より接触角が小さくなったものの、SB150E では逆に接触角が大きくなった。この理由は判然としないが、疎水性有機物の分解が不十分だったことが一因として考えられる。

以上の処理による親水性（接触角）の評価は、処理直後（10 分）に行った。しかし、本法の臨床応用を考慮すると、処理後に親水性を安定的に持続する方法を見いだすことが重要になると考えられる。そこで、本研究は親水性を維持する保存条件の影響を調査した。その結果、SB150E 試料において、全ての表面性状を変化させた条件（コントロールを含む）で、大気中保存では急速に接触角が大きく親水性は退行したが、純水中保存では親水性を持続した。また、エタノール中保存では純水中ほどの効果はなかった。

一般に O2Plasma および UV 処理表面は、大気中保存により、処理により活性化された表面へ大気中の表面汚染物質が吸着する、活性種により分解した親水性の低分子物質が離散してしまう、などの理由で親水性が退行するとされ、この現象は Aging などと呼ばれている。本研究において、O2Plasma および UV 処理は極性溶媒中に浸漬することで親水性が持続するものと推定される。また、純水中保存でより有効であった理由は、水分子が水酸基の保持に有効に働いた結果と考えられる。

本研究の結果、ブラスト後の酸エッチング処理（SB150E）を行い、水中に保存すれば、特別な処理を施さなくてもチタン表面は超親水性が持続することが判り、本処理は臨床的に簡便で有効な方法であると判断される。しかし、この接触角の計測は、処理面を純窒素でブローしてから行ってはいるが、吸着した水分子が一層残存していたとも考えられ、さらなる検討が必要であろう。事実、細胞培養試験の結果、同様な親水性を有している As-DW と O2-DW, UV-DW, H2O2-DW は増殖、分化とも後者が有意に増加した。この結果は、接触角の測定のみでは細胞の動態を評価できないことを示している。すなわち、親水性をもたらす要因（表面エネルギーや表面水酸基）についても検討する必要がある。特に生体のように水環境においては、表面エネルギーの極性成分や水酸基チタン上に存在する塩基性水酸基が骨芽細胞の増殖と分化に重要な役割を演ずることが考えられる。以上より、本実験で得られた親水化処理の有効性を検証するためには、表面エネルギーや表面水酸基の生成状態を評価することが必要であると考えられる⁴⁾。

本研究では、親水性を付与するための表面形状と表面性状を制御する処理法、また親水性を持続する保存法について明らかになった。本結果が骨形成に寄与するかは今後の *in vitro* および *in vivo* 試験を待たねばならないが、臨床により近いチタンの親水性表面処理技術が提供できたと考える。

参考文献：

- 1) Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B, Oda Y. Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethyldisiloxane surfaces with wide range of wettability, J Biomed Mater Res 2007; 81B: 66-75.
- 2) Wei J, Igarashi T, Okumori N, Igarashi T, Maetani T, Liu B, Yoshinari M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. Biomed Mater 2009; 4 doi:10.1088/1748-6041/4/4/045002.
- 3) Wenzel RN. Resistance of solid surfaces to wetting by water. Ind Eng Chem 1936; 28: 988-994.
- 4) Yoshinari M, Matsuzaka K, Inoue T. Surface modification by cold-plasma technique for dental implants -Bio-functionalization with binding pharmaceuticals-. Japanese Dental Science Review 2011; in press.

注：本研究の一部は、2010年11月30日『第32回日本バイオマテリアル学会』（シンポジウム）で、また2011年1月22日『第3回口腔先端応用医科学会議』（招待講演）で報告した。

作成日：2011年3月4日