

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

吉岡 広孝

専攻分野：スポーツ医学

コース：

指導教授：武者 春樹

主論文の題目：

Polyhydroxylated C60 Fullerenes Prevent Chondrocyte Catabolic Activity at Nanomolar Concentrations in Osteoarthritis.

(ポリ水酸化 C60 フラーレンはナノモル濃度で変形性関節症における軟骨細胞異化活性を抑制する)

共著者：Naoko Yui, Kanaka Yatabe, Hiroto Fujiya, Haruki Musha, Hisateru Niki, Rie Karasawa, Kazuo Yudoh.

緒言

変形性関節症 (osteoarthritis: OA) は、関節軟骨の変性やメカニカルストレスによって引き起こされる二次性滑膜炎および骨の新生増殖性変化に基づく進行性の関節変性疾患である。多くの研究報告から OA の発症と進行には、加齢にともなう軟骨基質の組成変化に加えて、肥満や荷重等のメカニカルストレスと、それに伴い軟骨細胞から過剰産生が誘導される炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1 β や活性酸素種の蓄積が密接に関与することが明らかとなっている。

これまでに我々は、強力な抗酸化剤であるナノカーボン分子フラーレ

ン (C60) には、軟骨異化抑制作用があり、C60 が OA 治療薬としての可能性を有することを報告してきた。しかし、C60 は低親水性分子のため、軟骨異化抑制効果の発現にはマイクロモル濃度を要した。

今回我々は、複数の水酸基を持つポリ水酸化 C60 が、これまでの 1/1000 のナノモル濃度で軟骨異化抑制効果を示すことを *in vitro* 実験系で証明した。

方法・対象

人工膝関節置換術が施行された OA 患者から *informed consent* を得た後に、手術時に関節軟骨組織を得て、既報に則って培養軟骨細胞を分離培養した (84 歳男性、81 歳女性)。培養軟骨細胞に、軟骨異化誘導因子である IL-1 β (10.0 ng/ml) 存在下、非存在下に各種濃度 (1.0, 10.0 または 100.0 nM) のポリ水酸化 C60 [C60(OH)₁₀、C60(OH)₂₄、C60(OH)₂₆、C60(OH)₃₆ または C60(OH)₄₄] を添加して 24 時間培養後、培養上清を採取した。ポリ水酸化 C60 の軟骨細胞への影響は、軟骨基質分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP)-13 産生活性及び軟骨基質 (プロテオグリカン) 合成活性を enzyme-linked immunosorbent assay 法で測定することで評価した。本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会臨床試験部会 (承認 1315 号) の承認を得たもので、統計学的解析には Student's t 検定または Fisher の検定を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

結果

IL-1 β の添加によって、OA 軟骨細胞の MMP-13 産生能は有意に増強され ($p < 0.05$)、且つプロテオグリカン産生能は有意に抑制された ($p < 0.05$)。ポリ水酸化 C60 を添加した OA 軟骨細胞では、IL-1 β によって誘導される OA 軟骨細胞における MMP-13 産生増強能およびプロテオグ

リカン産生抑制効果は、各々有意に抑制された (MMP-13 産生抑制効果： $p < 0.05$, プロテオグリカン産生能： $p < 0.05$)。特に $C60(OH)_{10}$ 、 $C60(OH)_{24}$ 、 $C60(OH)_{26}$ は、 $C60(OH)_{36}$ 、 $C60(OH)_{44}$ と比較してより強い軟骨異化抑制効果を示した。

考察

OA の病因・病態には、加齢による軟骨基質の退行性変化に加えて、肥満や荷重によるメカニカルストレスに伴い誘導される酸化ストレスの関与が報告されている。20 個の六角形と 12 個の五角形の球状炭素分子 $C60$ は、60 個の C-C 単結合と 30 個の C=C 二重結合を有する。この C=C 二重結合が活性酸素種を捕捉する能力を持つため、 $C60$ の抗酸化能は C=C 二重結合の数に依存すると考えられており、それ故、 $C60$ に結合する水酸基の増加による C=C 二重結合の減少は、水酸化 $C60$ の抗酸化能の低下を導くことが示唆される。我々の共同研究機関からの報告では、ポリ水酸化 $C60$ の水酸基が多いほど抗酸化力が低くなる傾向が確認されているが、異なる水酸基数の 5 種類の水酸化 $C60$ を用いた本研究において我々は初めて、抗酸化力の差と軟骨異化抑制能との関連、すなわち水酸基数が比較的少ない（比較的抗酸化能の高い） $C60(OH)_{10}$ 、 $C60(OH)_{24}$ 、 $C60(OH)_{26}$ が $C60(OH)_{36}$ 、 $C60(OH)_{44}$ よりも有意に高い軟骨異化抑制能を持つことを明らかとした。

一方、 $C60$ の水溶性は、結合している水酸基数に依存して高くなると考えられる。我々は以前に抗酸化能とは対照的に水酸基数が増えるに伴って $C60$ の水溶性は高くなることを報告してきたが、本研究の実験においても $C60$ の水溶性は $C60(OH)_{44}$ 、 $C60(OH)_{36}$ 、 $C60(OH)_{24}$ 、 $C60(OH)_{10}$ の順に高くなる傾向があることを確認した（データ未公開）。今後は、ポリ水酸化 $C60$ の水溶性、抗酸化能および軟骨異化抑制能と

の関連について、さらに詳細な解析が必要であると考えます。

結論

ヒト軟骨細胞を用いた *in vitro* OA モデルにおいて、ポリ水酸化 C60 がナノモル濃度で OA における軟骨細胞異化活性を抑制しうることを報告した。今後、OA 治療薬としてのポリ水酸化 C60 の価値を明らかにするためには、水酸化 C60 の水溶性、抗酸化能および軟骨細胞異化抑制効果との関連について更なる研究が必要である。