

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791538

研究課題名（和文）

超音波遺伝子導入法を用いた慢性顎関節炎の新しい治療法開発

研究課題名（英文）

New Treatment method of Chronic Temporomandibular Joint Arthritis by Ultrasound Gene Translation

研究代表者

土生 学 (HABU MANABU)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00360058

研究成果の概要（和文）：慢性顎関節炎モデルにおける超音波遺伝子導入法を用いた抗炎症性サイトカイン治療は、臨床的にも病理組織学的にも有効であった。

研究成果の概要（英文）：.

Anti-inflammatory cytokine treatment using ultrasound gene translation is a useful new method for chronic temporomandibular joint arthritis therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計			

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1) 顎関節炎モデル (2) TNF- α (3) アポトーシス (4) 超音波遺伝子導入 (5) 慢性顎関節炎

1. 研究開始当初の背景

骨、軟骨の破壊を伴う難知性慢性顎関節炎の治療は、現在、対症療法に終始しており、病態の進行を制御することは困難な場合が多い。近年、整形外科領域では、リウマチ性関節炎に対する抗炎症性サイトカイン治療が実施されており、成果が報告されている。

これを応用し、われわれは、難治性慢性顎関節炎モデルに対して局所投与による抗炎症性サイトカイン治療モデルの検討を行ったが、初期の病態は制御できるものの、慢性期における骨軟骨の変化は、制御できなかった。理由としては、投与した抗炎症性サイトカインが中和されたと考えられた。この対処法と

して複数回の投与やドラッグデリバリーシステムの応用が考えられたが、実用化が困難であることや費用の面で問題があった。そこでわれわれは、抗炎症性サイトカイン産生遺伝子の導入を検討した。

遺伝子の導入方法としては導入効率の安定性の面からウイルスを媒体とする方法が最も普及しているが、ウイルスによる未知の有害作用など安全性の面で未だ明らかでない点も多く、非悪性疾患の治療では非ウイルスベクター法が適している。われわれは、難知性慢性顎関節炎の治療のために抗炎症性サイトカイン抗体遺伝子を非ウイルスベクター法で導入する方法を検討した。平成16, 17, 18年度の科学研究費（若手研究B）でエレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入法を検討した結果、一定の抗炎症性サイトカイン（抗TNF- α ）抗体の導入効果をあげ、ウサギ慢性顎関節炎モデルに対する抗炎症作用があることを明らかにした。これは抗炎症性サイトカイン抗体（抗TNF- α モノクローナル抗体）そのものを直接投与する方法と比べ、患者自身の細胞にこれらサイトカインを作らせるという面で明らかに経済的で、効果も持続的である点で優れている。しかし、それほど大きくない電力とはいえ、比較的高い電圧を局所にかけるためその刺激も大きく、特に脳に近い部位に存在する顎関節にこの方法を応用するのは臨床的に解決し難い部分が多いことも併せて明らかになった。そこで、より副作用が少なく遺伝子が導入できる方法として超音波による遺伝子導入法に着目した。しかしながら、単純な超音波遺伝子導入法ではエレクトロポレーション法ほどの遺伝子導入効果が得られないことが報告されている。われわれの研究室における別のプロジェクトとして癌細胞への超音波遺伝子導入法が研究されているが、導入効率を上

げる方法として標的細胞が特異的に持つ表面抗原に対するレセプターを超音波造影剤であるマイクロバブルに混入する方法が検討されている。これにより癌細胞に対する遺伝子の導入効率が飛躍的に向上し、条件によってはエレクトロポレーション法の数倍にも達するもので、この方法を応用することで導入効率の良くなかった超音波遺伝子導入法でも、より安全に効率良く遺伝子導入ができると考えられる。

今回われわれは、この超音波遺伝子導入方法を応用し、慢性顎関節炎に対する抗サイトカイン治療の可能性を切り開き、対症療法に終始している現在の難治性の慢性関節炎に対して、関節洗浄療法や関節鏡視下手術時に集中的に、目的とする抗炎症性サイトカイン産生遺伝子を導入するという新しい治療方法開発の基礎的研究を計画した。

新しい治療法の開発には、疾患モデルが必要であるが、慢性顎関節炎モデルは、われわれがこれまで開発してきた、ウサギ抗原誘発顎関節炎モデルを利用する。このモデルは他のモデルと異なり確実に慢性経過を辿り、特異な形態と機能を持つ顎関節の慢性関節炎の研究には最適である。また、われわれは本モデルにてTNF- α と骨軟骨破壊の関係を確認し（J Oral Pathol and Med, 2003）、この骨破壊の一部は軟骨細胞のアポトーシスによる可能性を示した（J Oral Pathol and Med, 2005）という実績がある。さらに、平成16, 17, 18年度の科学研究費（若手研究B）において本モデルに対する抗TNF- α 抗体直接投与による消炎効果を確認しており、エレクトロポレーション法による抗TNF- α 抗体遺伝子発現プラスミドの導入効率もすでに検討している。

2. 研究の目的

慢性顎関節炎の疾患モデルに対して、抗炎症性サイトカイン産生遺伝子を超音波遺伝子導入法にて導入し、その効果を臨床的、病理組織学的に検討し、実用化の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*の系で滑膜細胞に効率良く抗炎症性サイトカイン遺伝子を導入させる条件の確立。

滑膜組織からアウトグロース法で得た滑膜由来細胞における抗TNF- α 抗体発現プラスミドベクターの効率の良い導入条件を決定する。まず、滑膜由来細胞に多く発現している表面抗原 (CD44) を確認する。超音波の出力、照射時間だけでなく、マイクロバブルの混入量、表面抗原に対する抗体の混入比率などを検討し、抗TNF- α 抗体のタンパク発現を確認する。

(2) 正常ウサギ顎関節での抗TNF- α 抗体発現を確認する。

*in vitro*の検討で決定した条件を参考に、ウサギ正常顎関節に超音波遺伝子導入を行い、導入効果を検討し、抗TNF- α 抗体のタンパク発現を確認する。超音波遺伝子導入装置は現有の機器 (KTAC-3000C) を使用する。導入効率は抗TNF- α 抗体のプラスミドベクターにGreen Fluorescence Protein (GFP) プラスミドを付けておき、GFPの蛍光により、プラスミドの細胞内への取り込みを検討する。その分析は、マイクロダイアリーシスプローブにて関節液を採取し、GFP量を蛍光光度計で、抗TNF- α 抗体量をELISA法で測定する。

(3) ウサギ慢性顎関節モデルでの抗TNF- α 抗体発現とその効果を確認する。

顎関節炎発症の抑制効果を検討するため、ウサギ慢性顎関節炎モデルにおける関節炎誘発と同時に抗TNF- α 抗体遺伝子導入を行う (以前のエレクトロポレーションにおける実験では関節炎誘発と同時に遺伝子導入を行うのが、最も関節炎の抑制効率が低いことが明

らかになっている)。遺伝子導入方法は方法2) で検討した最適条件を用いる。関節炎の抑制効果は動物の体重変化、関節の腫脹、滑液中の炎症性サイトカイン量、関節の病理組織学的ならびに免疫組織化学的所見にて評価を行う。また、遺伝子発現量のモニタリングとして、マイクロダイアリーシスプローブにて関節液を採取し、GFP量を蛍光光度計で、抗TNF- α 抗体量をELISA法で測定する。

(4) ファイバータイプ超音波発信装置による関節包内での遺伝子導入法の検討。

より臨床応用に近づけるため、抗炎症性サイトカインプラスミドのより限局的な範囲への照射を目的として、ファイバータイプの超音波発信プローブにて、関節炎動物への遺伝子導入治療を行う。評価方法は上述のものと同様で、口腔外科学第1講座ならびに口腔微生物学講座保有の機器を用いる。超音波発信プローブは市販されている血管用の細径のものを使用するが、将来的に関節洗浄や関節鏡視下手術時の使用を考えると、18G程度の径のプローブを開発する必要がある。

4. 研究成果

(1) *in vitro*の系で滑膜細胞に効率良く抗炎症性サイトカイン遺伝子を導入させる条件の確立。

ウサギ滑膜組織からアウトグロース法で得た滑膜由来細胞は、表面抗原 (CD44) 発現に個体差が大きく、超音波出力、照射条件およびマイクロバブルの混入量を一定にしても抗TNF- α 抗体発現プラスミドベクターの導入効率に大きな差が生じた。そこで、市販のウサギ膝関節滑膜細胞であるHIG-82細胞を用いて至適導入条件を検討したところ、超音波出力は2.0W、照射条件は1MHz Duty比10%、照射時間30秒、また、マイクロバブル混入量は総量の5-8%程度が至適条件であり、Western Blotにて抗TNF- α 抗体の細胞外発現が確認され

た。これにより、培養滑膜細胞に対する抗炎症性サイトカイン抗TNF- α 抗体発現プラスミドベクターの至適導入条件が確立された。

(2) 正常ウサギ顎関節での抗TNF- α 抗体発現を確認する。

in vitroの検討では、ウサギ滑膜細胞HIG-82細胞への抗TNF- α 抗体発現プラスミドベクターの効果的な導入条件は分かったが、in vivoにおいてウサギ正常顎関節での抗TNF- α 抗体発現は確認できたものの、その定量については、消炎効果を有する有効関節局所濃度である、 1.04×10^5 M/ml以上の濃度の発現は最初、確認できなかった。これには定量方法に対するテクニカルな問題、in vivoにおいての導入方法の2つの問題があったと考えられた。これに対して、定量方法および導入方法の効率化の最適条件を再検討した。

定量方法の再検討においては、検体である滑液の希釈回収方式を導入し、単位タンパク量あたりの定量を行うことで実験個体間のデータが安定した。また、遺伝子導入方法の最適化においては、遺伝子含有マイクロバブルの混入量を増やすことが最も効率が良いことが分かった。

以上の改善を行うことで、抗TNF- α 抗体が効果を有する有効関節局所濃度である、 1.04×10^5 M/ml以上の濃度を確保できた。

(3) ウサギ慢性顎関節モデルでの抗TNF- α 抗体発現とその効果を確認する。

ウサギ慢性顎関節炎モデルにおいて抗TNF- α 抗体遺伝子導入の結果、臨床的には局所疼痛や腫脹の制御が可能であった(表1、2)。また、病理学組織学的には、滑膜炎や骨・軟骨の炎症性変化は抑制され(図1、図2)、滑液中の炎症性サイトカイン量も減少していた(表3、4)。また、抗TNF- α 抗体産生遺伝子導入においては、滑液中に産生された抗TNF- α 抗体量も有意に増加していた(表5)。

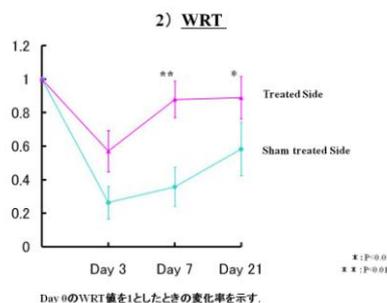
(表1)

1) Joint Swelling

	Sham treated Side			Treated Side			P
	0	1	2	0	1	2	
Before induction	4	0	0	4	0	0	1.000
Day 3	0	0	4	4	0	0	0.001**
Day 7	1	2	1	4	0	0	0.083
Day 21	3	1	0	4	0	0	0.998

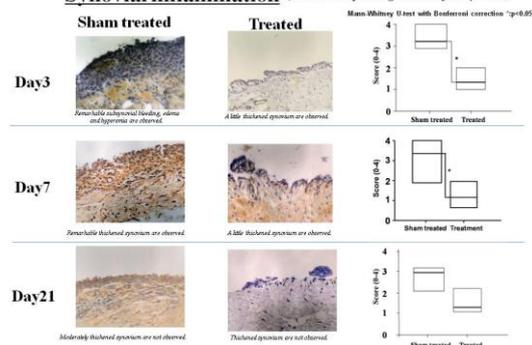
Score of joint swelling: 0= no swelling, 1= palpable swelling, 2= visible swelling
 P=significance level of the difference between the Sham treated side and Treated side
 * P<0.05
 ** P<0.01

(表2)



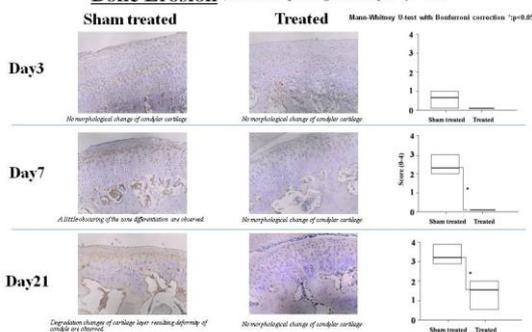
(図1)

Synovial inflammation (immunohistopathological stain of IL-1 β $\times 100$)



(図2)

Bone Erosion (immunohistopathological stain of IL-1 β $\times 100$)

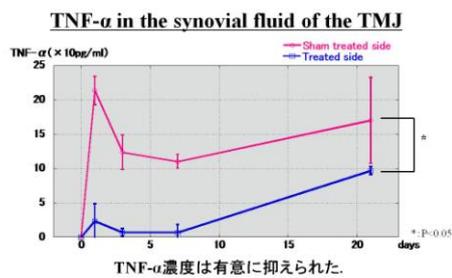


(表3)

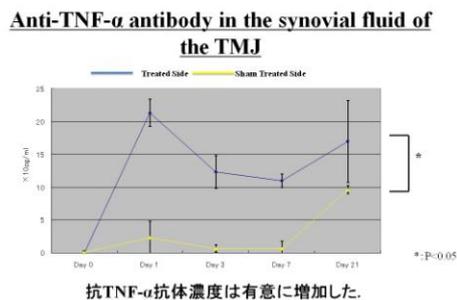
IL-1 β in the synovial fluid of the TMJ



(表 4)



(表 5)



「結論」

慢性顎関節炎モデルにおいて超音波遺伝子導入における抗炎症性サイトカイン治療は、臨床的にも病理組織学的にも有効であった。これにより本研究は十分臨床に適応可能であることが示唆された。今後は、専用の細径超音波プローブの開発などより導入効率をあげる方法を検討してゆく予定である。

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 7 件)

- ① Iwanaga, K., Tominaga, K., Yamamoto, K., Habu, M., Maeda, H., Akifusa, S., Tsujisawa, T., Okinaga, T., Fukuda, J., Nishihara, T.: Local delivery system of cytotoxic agent by sonoporation. *Cancer Gene Therapy* 14:354-363, 2007.
- ② Khanal, A., Yoshioka, I., Tominaga, K., Furuta, N., Habu, M. and Fukuda, J.: The BMP signaling and its Smads in Mandibular Distraction Osteogenesis. *Oral Diseases* 2007.

- ③ Tominaga, K., Konoo, T., Morimoto, Y., Tanaka, T., Habu, M. and Fukuda, J.: Changes in temporomandibular disc position during growth in young Japanese. *Dentomaxillofac Radiol* 36:397-401, 2007.
 - ④ Yoshikawa, S., Nodai, E., Habu, M., Furuta, N., Fukuda, J., and Yamaguti, K.: Influence of altered occlusal plane on rabbit temporomandibular joint cartilage. *J Oral Pathol Med* 37:30-37, 2007.
 - ⑤ Khanal, A., Yoshioka, I., Tominaga, K., Furuta, N., Habu, M. and Fukuda, J.: The BMP signaling and its Smads in Mandibular Distraction Osteogenesis. *Oral Diseases* 14:347-355, 2008.
 - ⑥ Maeda, H., Tominaga, K., Iwanaga, K., Nagao, F., Habu, M., Tsujisawa, T., Seta, Y., Toyoshima, K., Fukuda, J. and Nishihara, T.: Targeted drug delivery system for oral cancer therapy using sonoporation. *J Oral Pathol Med* 38(7):572-579, 2009.
 - ⑦ Manabu Habu, Tatsuo Tanaka, Taiki Tomoyose, Kentaro Ono, Toshihiro Anzai, Yuu Ozaki, Izumi Yoshioka, Yoshihiro Yamashita, Masaaki Kodama, Noriaki Yamamoto, Masufumi Oda, Nao Wakasugi, Shinobu Matsumoto, Tetsu Takahashi, Kiyotoshi Inenaga, Kazuhiro Tominaga, and Yasuhiro Morimoto: Significance of Dynamic Magnetic Resonance Sialography in Prognostic Evaluation of Saline Solution Irrigation of the Parotid Gland for the Treatment of Xerostomia. *J Oral Maxillofac Surg* 768-776, 2010.
- [学会発表] (計 3 件)
- ① Habu, M., Tominaga, K., Hirota, Y., Fukuda, J.: Histopathological influence of anti-TNF- α therapy on antigen-induced arthritis model of the rabbit temporomandibular joint. 89th Annual meeting of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgery, Honolulu, Hawaii, USA, Oct17, 2007.
 - ② 土生 学 ウサギ抗原誘発顎関節炎モデルにおける抗 TNF- α 抗体顎関節内投与の影響. 第 20 回日本顎関節学会総会. 2007 年 6 月 21 日 金沢
 - ③ 土生 学 ウサギ抗原誘発顎関節炎モデルにおける抗サイトカイン治療モデルの検討. 第 52 回日本口腔外科学会総会.

2008年10月22日徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土生 学 (HABU MANABU)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00360058