

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18759

研究課題名(和文) フォトアクチベーションを応用した変形性顎関節症治療法の探索と下顎頭吸収機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism and treatment for osteoarthritis of temporomandibular joint applied photoactivation

研究代表者

郡司 秀美 (Gunji, Hidemi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・専門研究員

研究者番号：80806688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト培養軟骨細胞に対するレーザー照射の抗炎症へ及ぼす影響について検討するとともに、その作用機序を明らかにすることとした。高周波近赤外線半導体レーザー照射はヒト培養軟骨細胞において、IL-1 の添加により誘導された炎症性サイトカインおよびマトリックスメタロプロテアーゼの発現を抑制することが明らかになった。その作用機序として、NF- κ Bシグナル伝達経路を介することが示唆された。初期の変形性顎関節症の炎症を整除しうる手段としての高周波近赤外線半導体レーザーの可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科臨床において、変形性顎関節症を伴う患者に遭遇するが、その治療法は主に対症療法であり、侵襲性が少なく有効な治療法の確立が急務である。そこで、レーザーの優れた生体活性化作用に着目し、顎関節軟骨破壊機序に対するレーザーの影響を検討することとした。高周波近赤外線半導体レーザー照射はヒト培養軟骨細胞において、IL-1 の添加により誘導された炎症性サイトカインおよびMMPの発現を抑制することが明らかになった。その作用機序として、NF- κ Bシグナル伝達経路を介することが示唆された。本研究により、高周波近赤外線半導体レーザーが初期の変形性顎関節症の炎症を整除しうる手段となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to assess the biological effects of high-frequency near-infrared (NIR) diode laser irradiation on IL-1 α -induced chondrocyte inflammation.

Normal Human Articular Chondrocyte-Knee cells were stimulated with human recombinant IL-1 α and irradiated with a diode laser. The mRNA and protein expression of relevant inflammation- and cartilage destruction-related proteins was analyzed. IL-1 α treatment significantly increased the mRNA levels of IL-1 α , IL-6, TNF- α , MMP-1, MMP-3, and MMP-13.

Diode laser irradiation significantly reduced the IL-1 α -induced expression of IL-1 α , IL-6, TNF- α , MMP-1, and MMP-3. Similarly, diode laser irradiation decreased the IL-1 α -induced increase in protein expression and secreted levels of MMP-1 and MMP-3. Thus, diode laser irradiation can reduce IL-1 α -induced inflammation in normal human articular chondrocytes through NF- κ B regulation. These results highlight the therapeutic potential of high-frequency NIR diode laser irradiation in osteoarthritis.

研究分野：歯科用レーザー

キーワード：半導体レーザー 顎関節症

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症(TMJ-OA)は、関節軟骨の破壊を初期病変とする退行性疾患であり、また、治療が困難な疾患である。TMJ-OAにより、下顎頭の進行性吸収による関節機能障害に加えて、重篤な開咬や顎偏位および顔面変形が引き起こされ、矯正歯科治療をより複雑にすることになる。しかしながら、顎関節症の治療法は主に対症療法であり、患者への侵襲性が少なく、有効な治療法の確立が急務である。

近年、半導体レーザーは、優れた組織浸透性を有することにより、関節炎や骨折の治癒促進等に臨床応用されている。しかしながら、生体内でどのような作用機序で治癒促進されるかは立証されておらず、科学的根拠に基づいた治療 (Evidence-Based-Medicine; EBM) には至っていない。

レーザーは、歯科医科領域に広く応用されており、その有効性が報告されてきた。現在、半導体レーザーは生体親和性が高く、優れた組織浸透性を有するため、関節損傷や骨折の治癒促進等に応用されている。近年、パルス幅を短縮化しスーパーパルスを搭載することで生体組織への熱的ダメージを最小限に、かつ深部到達性を高める様に設計された半導体レーザー (コールドレーザー) の臨床応用が進んでいる。しかしながら、顎顔面領域におけるコールドレーザーについては明らかになっていない。

以上の背景より、本研究は、コールドレーザーの優れた生体活性化作用に着目し、顎関節の軟骨破壊機序に対するコールドレーザーの顎関節軟骨代謝活性誘導能、抗炎症作用および疼痛緩和を同時に達成する、最適な波長やパルス幅などの照射条件を探索し、詳細なシグナル経路を確定させ、その根拠を付与することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、コールドレーザーの優れた生体活性化作用に着目し、コールドレーザー照射における軟骨細胞の代謝調節機構に及ぼす影響を解明することを目的とした。また、抗炎症作用についても検証する。

3. 研究の方法

実験1 軟骨細胞の基質代謝に対するコールドレーザー照射の影響の解明

ヒト培養膝関節軟骨細胞 (NHAC-Kn) を用いて、以下の検討を行った。なお、レーザーについては、910 nm が主波長である超短パルス半導体レーザーを使用した。培養細胞に対し、レーザー照射による軟骨代謝マーカーの発現レベルについて現有の定量 PCR を用いた遺伝子解析および Western blot 解析を行った。

実験2 炎症性サイトカイン添加時におけるレーザー照射の影響

NHAC-Kn を培養し、80%コンフルエントに到達後、リコンビナントヒト IL-1 を添加し炎症を誘導した。IL-1 添加直後にコールドレーザー照射を行い、炎症性サイトカイン [IL-1、IL-6、および TNF- α]、MMP-1 および MMP-3 の遺伝子発現について定量 PCR を用いて検討を行った。また、MMP-1 および MMP-3 のタンパク質発現について、ウエスタンブロットによる解析を行うとともに、ELISA による定量評価を行った。

実験3 コールドレーザーの軟骨細胞におけるシグナル伝達経路の解明

コールドレーザー照射がシグナル伝達経路に及ぼす影響について検討を行った。特に、NHAC-Kn の IL-1 誘導性炎症における Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) シグナル伝達経路に及ぼす影響について検討を行った。NF- κ B のリン酸化について、ウエスタンブロットおよび ELISA にて定量評価した。

4. 研究成果

実験1では、ヒト培養膝関節軟骨細胞を用いて、検討を行った。その結果、ヒト培養膝関節軟骨細胞に対してコールドレーザーを照射することにより、基質合成能に影響を及ぼすことが明らかとなった。

次に、実験2では、炎症性サイトカイン添加時におけるレーザー照射の影響について検討を行った。

NHAC-Knを培養後、80%コンフルエントに到達後、リコンビナントヒトIL-1 β を添加し炎症を誘導した。IL-1 β 添加直後にコールドレーザー照射を行い、炎症性サイトカイン [IL-1 β 、IL-6、およびTNF- α]、MMP-1およびMMP-3の遺伝子発現について定量PCRを用いて検討を行った。また、MMP-1およびMMP-3のタンパク質発現について、ウエスタンブロットによる解析を行うとともに、ELISAによる定量評価を行った。NHAC-KnにIL-1 β を添加することで、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-1およびMMP-3の遺伝子発現が有意に亢進した。また、IL-1 β 添加によって亢進された遺伝子発現が、コールドレーザー照射を行うことで、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MMP-1、MMP-3の遺伝子発現が有意に抑制された。MMP-1およびMMP-3のタンパク質発現量は、IL-1 β の添加により有意な増加を認めた。IL-1 β の添加によって増加したMMP-1およびMMP-3のタンパク質発現量は、コールドレーザー照射により有意に減少した。

実験3では、コールドレーザー照射が、NHAC-KnのIL-1 β 誘導性炎症におけるNuclear Factor- κ B (NF- κ B)シグナル伝達経路に及ぼす影響について検討を行った。

NF- κ Bのリン酸化について、ウエスタンブロットおよびELISAにて定量評価した。その結果、NF- κ Bのリン酸化はIL-1 β の添加により有意に亢進したが、コールドレーザー照射を行うことにより、リン酸化は有意に抑制された。

以上の結果より、近赤外線領域高周波近赤外線半導体レーザー照射は、ヒト培養軟骨細胞において、IL-1 β の添加により誘導された炎症性サイトカインおよびマトリックスメタロプロテアーゼの発現を抑制することが明らかになった。その作用機序として、NF- κ Bシグナル伝達経路を介することが示唆された。初期の変形性関節症の炎症を整除しうる手段としての高周波近赤外線半導体レーザーの可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakata S, Kunimatsu R, Tsuka Y, Nakatani A, Hiraki T, Gunji H, Hirose N, Yanoshita M, Putranti NAR, Tanimoto K.	4. 巻 9(3)
2. 論文標題 High-Frequency Near-Infrared Diode Laser Irradiation Attenuates IL-1 -Induced Expression of Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases in Human Primary Chondrocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9030881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakata S., Kunimastu R., Tsuka Y., Nakatani S., Gunji H., Yanoshita M., Kado I., Ito S., Putranti NAR., RC Prasetya., Hirose N., Tanimoto K.	4. 巻 37
2. 論文標題 High-frequency near-infrared diode laser irradiation suppresses IL-1 -induced inflammatory cytokine expression and NF- B signaling pathways in human primary chondrocytes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lasers Medical Science.	6. 最初と最後の頁 1193-1201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10103-021-03371-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂田修三, 國松 亮, 柄 優至, 中谷文香, Putranti NAR, 矢野下 真, 廣瀬尚人, 谷本幸太郎
2. 発表標題 高周波近赤外半導体レーザー照射がヒト軟骨細胞の炎症サイトカインに及ぼす影響.
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会大会・第5回国際会議（横浜）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田修三, 國松 亮, 柄 優至, 中谷文香, Putranti NAR, 矢野下真, 廣瀬尚人, 谷本幸太郎.
2. 発表標題 ヒト初代培養軟骨細胞における炎症性サイトカインおよびマトリックスメタロプロテアーゼの IL-1 誘導性発現に対する高周波近赤外半導体レーザー照射の影響.
3. 学会等名 第34回日本顎関節学会学術大会（東京）.
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------