

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21041

研究課題名（和文）コールドレーザーによる基質代謝活性の制御技術を応用した顎関節軟骨再生治療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of cartilage regeneration therapy for temporomandibular joint using cold laser technology to control matrix metabolic activity

研究代表者

坂田 修三（sakata, shuzo）

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：60911526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年開発された高周波近赤外半導体レーザー（コールドレーザー）は、組織への侵襲が少なく、かつ高いエネルギー透過性を有することから、変形性顎関節症への応用が期待されている。申請者らは、ヒトから分離した軟骨細胞を使用し、変形性顎関節症の細胞実験モデルを作製した。また、コールドレーザーを軟骨細胞に照射することで、炎症性サイトカイン、および軟骨基質破壊酵素の発現を抑制することを明らかにするとともに、その細胞内シグナル伝達経路として、NF- κ Bシグナルの関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性顎関節症に対する現在の治療は主に対症療法であり、疾患の病態を制御しうる新たな治療法の確立が望まれている。本研究は、近年開発された高周波近赤外半導体レーザー（コールドレーザー）の、軟骨細胞に対する影響を明らかにした。この成果は、将来的なコールドレーザーの臨床応用に対し大きく貢献するものであると考える。

研究成果の概要（英文）：Recently developed high-frequency near-infrared diode laser (cold laser) are expected to be applied to TMJ osteoarthritis because of its low tissue invasion and high energy penetration. We have created an experimental cellular model of TMJ osteoarthritis using chondrocytes isolated from humans. We also demonstrated that cold laser irradiation to chondrocytes suppressed the expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases, and revealed the involvement of NF- κ B signaling as an intracellular signaling pathway.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：レーザー 変形性顎関節症 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症 (TMJ-OA) は、顎関節軟骨の破壊を初期病変とする退行性疾患であり、重篤な例では、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をきたすことがある。TMJ-OA の初期変化として、下顎頭軟骨線維層の断裂や剥離などの器質的変化が起こり、その結果として関節潤滑機能の低下が生じることが報告されている。以前より、我々は、OA 発症の機序について研究を重ねてきた。過度な機械的負荷は SZP 産生を低下させ、摩擦係数を増加させるとともに、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) -1, 3, 9 の産生を亢進させ、Ⅱ型コラーゲン、アグリカン、ヒアルロン酸 (HA) などの基質破壊を惹起するとして一連の OA 発症機序を明らかにした (Tanne K. Jap Dent Sci Rev, 2008)。一方、現在の TMJ-OA の治療法としては、関節負荷の均一化を目的としたスプリント療法、理学療法、ヒアルロン酸ナトリウム (NaHA) の関節注入療法などが推奨されている。しかしながら、進行した OA 関節では軟骨組織そのものの修復能力が乏しいため、関節腔への NaHA 注入療法だけでは、損傷した顎関節軟骨の再生には至らない。そのため、患者の侵襲性が少なく、有効な治療法の確立が望まれている。

レーザーは、医療分野で広く応用されており、主に整形外科や皮膚科領域において、その有効性が報告されてきた。その中でも、低出力のレーザー光による生体組織に対する光刺激作用 (LLLT) が注目されてきた。LLLT の効果として、細胞増殖能の亢進・骨分化作用、疼痛緩和がこれまでに報告されている。一般的にレーザー機器は、連続波あるいはパルス波(レーザー照射と休止を繰り返す変調)を発生させる。連続波は、副作用として熱の発生が多くなるため、生体内に照射させる際には、低出力にする必要がある。そのため、従来の技術法では、安定した効果を得ることが難しい。近年、超短パルスを発振できる超短パルス半導体レーザー(コールドレーザー)が開発され、組織表面に熱損傷を伴わず、高い光エネルギーをより効率的に深部組織へ浸透させることが可能となった。コールドレーザーは、これまでのレーザーと比較して、関節炎に対してより有効である可能性を有している。しかしながら、これまでの研究ではコールドレーザーの関節軟骨における生物学的作用を検討した報告はない。そのため、コールドレーザーの関節軟骨に対する生物学的作用について、詳細な検討を行うことが望まれている。

2. 研究の目的

TMJ-OA は難治性の疾患であり、現在のところ、有効な治療法は確立されておらず、新規治療法の確立が望まれている。整形外科領域において、骨折や関節炎に対するレーザー治療が、広く応用されており、その抗炎症作用、治癒促進作用、疼痛軽減作用などが報告されている。顎関節領域においても、低出力レーザー治療の有効性がいくつか報告されているものの、未だ治療法の一つとして確立されているものはない。近年開発されたコールドレーザーは、高い安全性と組織深部到達性を有しており、関節軟骨の病態改善に有用である可能性が考えられる。しかしながら、コールドレーザーの皮膚や骨の対する影響を報告した研究は認められるものの、関節軟骨に対する影響は未だ明らかではない。コールドレーザーを、顎関節炎に対する治療法の一つとして確立するためには、関節に対するコールドレーザー照射の影響について、詳細な検討を行う必要がある。そこで本研究は、従来の治療法では完全に対処がなされていない TMJ-OA に対し、非侵襲のコールドレーザーを用いて、新たな治療法を確立することを目指し、そのために、コールドレーザーの関節軟骨に対する影響を明らかにするとともに、TMJ-OA に対する有効性を検証することで、新規治療法として確立するための科学的根拠を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1 として、培養軟骨細胞に対するコールドレーザーの影響の検討を行った。ヒト初代培養軟骨細胞 (NHAC-Kn) を使用し、TMJ-OA 患者の顎関節滑液内に有意な発現上昇が認められる炎症性サイトカインである、Interleukin-1 beta (IL-1 β) で刺激を行うことで In Vitro の TMJ-OA モデルを作製した。コールドレーザー照射群においては、IL-1 β で刺激を行ったのちに、培養皿の上方からコールドレーザー照射を行った。IL-1 β およびコールドレーザーで処置後に、total RNA および総タンパクを回収し、リアルタイム PCR 解析およびウエスタンブロット解析を行い、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解析した。また培養上清を回収し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) を行い、培養上清中に含まれるマトリックスメタロプロテアーゼ濃度の定量解析を行った。

実験 2 として、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への影響の検討を行った。IL-1 β 刺激を行い、コールドレーザー照射群においては、実験 1 と同様にコールドレーザーの照射を行った。関節炎で重要な役割を果たす転写因子であるとともに、IL-1 β 下流の主要シ

グナル伝達経路として知られている、MEK/ERK シグナル伝達経路、p38 MAPK シグナル伝達経路、JNK シグナル伝達経路、および NF- κ B シグナル伝達経路の解析のため、軟骨細胞の総タンパクを抽出し、各タンパク質のリン酸化についてウエスタンブロット解析を行った。また NF- κ B シグナルの細胞内動態の変化を検出するため、軟骨細胞の核画分および細胞質画分に含まれるタンパク質を分画抽出し、ウエスタンブロット解析を行った。さらに、細胞蛍光免疫染色を行い、DAPI により染色される細胞核領域と、NF- κ B により染色される領域の重なりを比較することで、NF- κ B の核内移行を染色にて観察した。染色像は、ImageJ software を用いて NF- κ B の核内移行を認める細胞を定量評価し、全細胞に占める NF- κ B 核内移行陽性細胞の割合を計算した。そして、細胞内に移行した NF- κ B の転写活性を確認するため、Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) および ELISA を用いて解析を行うことで、NF- κ B と DNA の結合活性について評価を行った。

4. 研究成果

実験 1 では、コールドレーザーの炎症性サイトカインおよびマトリックスプロテアーゼの発現に対する検討を行った。

ヒト初代培養軟骨細胞に対し IL-1 を添加することで、炎症性サイトカインである IL (Interleukin)-1、IL-6、Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) の遺伝子発現が有意に上昇した。また、軟骨基質破壊酵素である Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1)、MMP-3、および MMP-13 の遺伝子発現が有意に上昇した。また、コールドレーザー照射により、IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP-1、および MMP-3 の遺伝子発現上昇が有意に抑制された。またウエスタンブロット解析において、ヒト初代培養軟骨細胞に対し IL-1 を添加することで、IL-1、IL-6、TNF- α 、MMP-1、MMP-3 のタンパク質発現が有意に上昇した。また、コールドレーザー照射により、IL-1、IL-6、MMP-1、MMP-3 のタンパク質発現上昇が有意に抑制された。さらに、ELISA において、軟骨細胞の培養上清中に分泌された MMP-1、MMP-3 タンパク質濃度は、IL-1 の添加により有意に上昇した。IL-1 添加後にコールドレーザーを照射することで、培養上清中の MMP-1 および MMP-3 タンパク質濃度は有意に減少した。これらの結果から、ヒト初代培養軟骨細胞において、IL-1 の添加は軟骨細胞に対し炎症性サイトカインおよび軟骨基質破壊酵素の発現を有意に亢進させるとともに、コールドレーザーを培養細胞に照射することで、これらの発現上昇が有意に抑制された。したがって、In Vitro の変形性関節炎モデルにおいて、コールドレーザーの照射は、培養軟骨細胞の炎症を抑制するとともに、軟骨基質破壊の抑制作用を有することが示唆された。

実験 2 では、コールドレーザーのシグナル伝達経路に対する影響の検討を行った。

ウエスタンブロット解析の結果から、IL-1 の刺激により、細胞内シグナル伝達経路である MEK/ERK シグナル伝達経路、p38 MAPK シグナル伝達経路、NF- κ B シグナル伝達経路の活性化が確認されたが、JNK シグナル伝達経路の活性化は認められなかった。また、IL-1 刺激後にコールドレーザー照射を行うと、NF- κ B シグナル伝達経路の活性化が減弱した。一方、MEK/ERK シグナル伝達経路および p38 MAPK シグナル伝達経路に関しては、コールドレーザーの照射によって有意な活性化抑制は認められなかった。そこで、軟骨細胞の細胞質タンパク質と核内タンパク質を分画抽出し、ウエスタンブロット法にて NF- κ B の核内移行を観察したところ、IL-1 刺激によって亢進した NF- κ B の核内移行が、コールドレーザーの照射によって抑制されることが確認された。さらに、細胞蛍光免疫染色法によっても同様の結果が観察され、NF- κ B の核内移行を認めた細胞の割合は、IL-1 の添加によって有意に上昇し、コールドレーザーの照射によって有意に抑制された。コールドレーザーの照射のみでは、NF- κ B の細胞内動態に有意な変化は与えなかった。次いで、核内へ移行した NF- κ B の転写活性を、EMSA および ELISA を用いて検討を行ったところ、いずれの方法によっても、NF- κ B と DNA の結合活性は IL-1 の添加により上昇し、コールドレーザーの照射により抑制された。NF- κ B シグナル伝達経路の阻害剤である BAY 11-7082 により NF- κ B シグナルを阻害した上で、IL-1 の添加を行うと、炎症性サイトカインおよびマトリックスプロテアーゼの発現が抑制されることを、ウエスタンブロット法による予備検討にて確認を行った。これらの結果から、実験 1 で認められたコールドレーザーの炎症抑制作用および軟骨基質破壊抑制作用は、NF- κ B シグナル伝達経路の活性化を抑制することで生じた可能性が示唆された。

以上の成果より、コールドレーザー治療が、変形性顎関節症の病態形成を抑制しうる可能性が示唆された。今後は、TMJ-OA の動物モデルに対するコールドレーザーの影響を検討し、生体におけるコールドレーザーの有効性を詳細に検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakatani Ayaka, Kunimatsu Ryo, Tsuka Yuji, Sakata Shuzo, Horie Kayo, Gunji Hidemi, Ito Shota, Kado Isamu, Putranti Nurul Aisyah Rizky, Terayama Ryuji, Tanimoto Kotaro | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Effects of high-frequency near infrared laser irradiation on experimental tooth movement-induced pain in rats | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Lasers in Medical Science | 6. 最初と最後の頁 2697 ~ 2706 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10103-022-03543-x | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 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 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 坂田修三, 國松亮, 柄優至, 中谷文香, 谷本幸太郎 |
| 2. 発表標題 ヒト軟骨細胞に惹起された炎症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回日本レーザー歯学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 坂田修三, 國松亮, 柄優至, 中谷文香, PutrantiNAR., 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（神奈川）（国際学会） |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|