

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591676

研究課題名（和文）関節炎に対する体外衝撃波による NF-kB decoy 導入の有効性についての検討
 研究課題名（英文）Evaluation of NF-kB decoy transfer using extracorporeal shock wave for arthritis model

研究代表者

落合 信靖（OCHIAI NOBUYASU）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40400931

研究成果の概要（和文）：関節炎に対する Nuclear factor-kB decoy (NF-kB decoy) 及び体外衝撃波療法の効果を検討した。体外衝撃波のみでも抗炎症作用を有し、NF-kB decoy を体外衝撃波により腱細胞へ導入することでも、強い抗炎症作用をもたらしていた。以上より、体外衝撃波療法にも抗炎症作用をもたらす作用があり、NF-kB decoy による抗炎症作用も体外衝撃波照射により向上する可能性を認めた。

研究成果の概要（英文）：Treatment using nuclear factor-kB decoy (NF-kB decoy) and extracorporeal shock wave therapy (ESWT) were evaluated. Our data showed that ESWT and NF-kB decoy suppressed the inflammation. Furthermore, both treatments would have synergism for the treatment of arthritis model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：関節病学

1. 研究開始当初の背景

慢性関節リウマチ等の炎症性疾患は進行すると、関節そのものが変性し、軟骨が消失し、骨にびらんが生じる。最終的には関節が破壊され、強直となる。現在の治療方針では関節リウマチの診断がいたら、抗リウマチ薬（DMARDs）を用いる。また、痛みに対する対症療法として非ステロイド系消炎鎮痛剤（NSAIDs）などを用いる。関節リウマチの病気の勢いそのものを弱める薬として、メ

トトレキサート、スルファサラジン、ブシラミン等が使用可能であり、近年ではインフリキシマブ、エタネルセプトといった生物学的製剤が使用可能となっている。これらはリウマチに対してきわめて強力な治療効果を示し、リウマチの診療そのものの姿を変化させつつある。しかし、これらの薬には種々の副作用が懸念される。体外衝撃波は、結石治療で臨床適用され、その物理的作用が広く知られるようになったが、近年整形外科領域での

臨床応用がはじまり、骨折遷延癒合の治療やテニス肘などの腱附着部炎の除痛を目的に利用されている。衝撃波の作用は、自由神経終末の破壊が起こることにより除痛をもたらすものと考えられている。また、ラット変形性膝関節症モデルにおいて、体外衝撃波療法は除痛をもたらす行動学的にも運動能力の改善をもたらすことから、関節炎疾患においても有効性が示唆されている。体外衝撃波の作用として更に *in vitro* の実験で、体外衝撃波照射により遺伝子導入効率が140倍に上昇する。この作用メカニズムは体外衝撃波により、細胞膜に小さい穴が開き、そこから遺伝子が導入されると考えられている。Nuclear Factor-kappa B (NFκB) は5種類の転写因子 (p-50、p-65、c-Rel、p-52、RelB) の総称であり、炎症性サイトカインや接着因子の遺伝子発現を調節している転写調節因子の1つである。無刺激時には核移行を抑制するインヒビターBタンパクと結合し、細胞質内に存在している。通常時では炎症などの刺激により、インヒビターBタンパクが分解されて Nuclear Factor-kappa B は核内に移行し、染色体上の転写調節領域に結合してサイトカインや接着因子の発現を促進する。Nuclear Factor-kappa B decoy-oligo は、Nuclear Factor-kappa B が結合する転写調節領域の一部を人工的に作った核酸である。NFκB decoy を細胞内導入すると、NFκB の転写調節領域への結合が阻害され、サイトカイン (TNF-α 等) の発現が抑制される。その結果、ラット炎症モデルでの疼痛の改善がもたらされる。

2. 研究の目的

以上の背景より、関節炎モデルでの関節炎の抑制、進行の抑制、疼痛の改善を目的として、体外衝撃波の有効性を検討すること、及び体外衝撃波を使用することにより NFκB decoy の効率的な導入により相乗的な効果をもたらすことが可能かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) cell preparation

5週齢の Sprague-Dawley rat のアキレス腱を採取し、0.2% PRONASE で1時間処置後 0.025% collagenase P を入れた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で16時間 incubation を行った。分離された腱細胞を遠心分離で採取し、DMEM の中で monolayer に細胞培養を行い、第1世代の細胞を実験に

使用した。体外衝撃波は放射状体外衝撃波装置である Swiss Dolorclast (Electro Medical Systems SA, Nyon, Switzerland) を使用した。培養した細胞はトリプシン入りの5mlの10% FBS、50mg/ml の gentamicin 入り DMEM 上に1.0 million/ml の量で入った状態で体外衝撃波照射を行った。0.3 MPa and 10 Hz で0発 (control group), 1,000発, 2,000発, 3,000発とした。照射後 trypan blue を用いて cell の viability を検討した。

(2) FITC でラベルされた NF-κB decoy の導入

1 または 4mg/ml の NF-κB decoy-fluorescein isothiocyanate (FITC) の入った溶液に体外衝撃波照射を行った。照射直後に細胞を集め、1 million cells/well で24時間 incubate した。顕微鏡を用いて溶液中の全細胞、FITC 要請の細胞を計測した。

(3) 腱細胞への NF-κB decoy と体外衝撃波次に1mg/ml の NF-κB decoy 含有の溶液に対して、体外衝撃波を照射した群と照射しなかった群に対して、最初に trypan blue を用いて cell の viability を確認し、その後24時間 incubate した。その後 IL-1β (10 ng/ml) で1時間刺激を行った後、NF-κB の評価を行った。

(4) ELISA を用いた NF-κB の活性化の計測 衝撃波照射後、Nuclear Extract Kit (Active Motif North America, Carlsbad, CA) を使用して細胞を細胞質と核に分画した。その後 Trans AMTM (Active North America) を使用して NF-κB の活性を計測した。活性は核の分画中の NF-κB p65 subunit を計測した。96well のプレートに分注し、1時間 incubate を行い、洗浄後抗 NF-κB p65 抗体を分注後、更に1時間 incubate し、洗浄後2次抗体を分注した。洗浄後 Developing Solution を加え、2-10分後に吸光度 450 nm、reference wavelength は 630 nm で spectrophotometer (EZSABS, IWAKI Ltd. Tokyo, Japan) で計測し、細胞数で正規化した。

(5) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法による炎症性サイトカインの定量的評価

次に adjuvant を右足関節に注入する、関節炎モデルを作成した。5週齢の Sprague-Dawley rat を使用して、adjuvant 関節炎群、関節炎モデルに対して体外衝撃波照射のみを行った ESWT 群、NF-κB decoy 注入のみを行った NF-κB decoy 群、NF-κB decoy 注入後に体外衝撃波照射を行った ESWT+ NF-κB decoy 群の4群を作成した。Adjuvant 関節炎は sodium pentobarbital (40mg/kg, i.p)

で全身麻酔下に足関節前方より complete adjuvant 50ul を注入して作成した。注入 2 週間後に①sodium pentobarbital (40mg/kg, i.p)の麻酔のみを行った adjuvant 関節炎群②sodium pentobarbital (40mg/kg, i.p)の麻酔後に放射状衝撃波を足関節内側、外側 1000 発ずつ照射した ESWT 群③sodium pentobarbital (40mg/kg, i.p)の麻酔後に足関節前方より 1mg/ml の NF-kB decoy 50ul を注入した NF-kB decoy 群④sodium pentobarbital (40mg/kg, i.p)の麻酔後に足関節前方より 1mg/ml の NF-kB decoy 50ul を注入した後に放射状衝撃波を足関節内側、外側 1000 発ずつ照射した ESWT+NF-kB decoy 群、⑤adjuvant を注入しない control 群の 5 群を作成した。上記 5 群に対して Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)法を使用して炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , nerve growth factor (NGF) の定量を行った。sodium pentobarbital を用いて安楽死させ、足関節内の滑膜を摘出し、液体窒素により凍結粉碎させ、溶解させた後、ELISA Kit (TNF- α , IL-1 β ; R&D Systems, Minneapolis, MN, NGF; Abnova Corporation, Taipei, Taiwan)を用いた。また、蛋白定量キット(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて蛋白定量を行い、ELISA 蛋白量補正を行った。

4. 研究成果

(1) NF-kB Decoy-FITC の放射状衝撃波による導入。

NF-kB decoy-FITC の放射状衝撃波による導入は照射数を増加することにより増強された。(Fig. 1A-D)

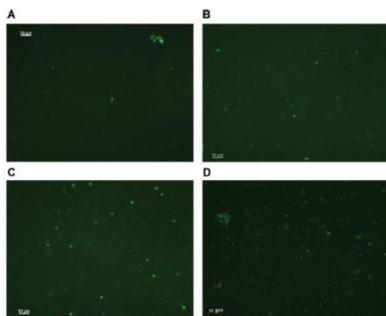


Figure 1. FITCでラベルされた1mg/mlの濃度のNF-kB decoyの導入後の蛍光顕微鏡像 (A) control (SW0); (B) SW1000; (C) SW2000; (D) SW3000.

1 mg/ml の naked NF-kB decoy-FITC を培養液中に注入した群では (体外衝撃波なし) $4.56 \pm 3.00\%$ の導入効率だった (Fig. 2)。体外衝撃波を加えることにより、体外衝撃波 1000 発では $9.83 \pm 1.49\%$ 、2000 発では $16.9 \pm 6.09\%$ 、3000 発では $53.1 \pm 1.61\%$ であった (Fig. 2)。4 mg/ml の NF-kB decoy を使用した際は前述の結果と同様な傾向であ

った。体外衝撃波なし群では $4.48 \pm 3.56\%$ で、体外衝撃波 1000 発では $9.67 \pm 3.15\%$ 、2000 発では $23.9 \pm 7.60\%$ 、3000 発では $55.4 \pm 4.59\%$ であった。以上より、NF-kB decoy の導入は 1mg/ml または 4mg/ml でも同様な結果だった。

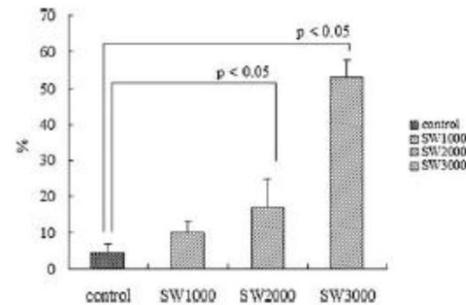


Figure 2. NF-kB decoy-FITC の体外衝撃波による効果。1mg/ml NF-kB decoy-FITC の導入は体外衝撃波により増強された。(* $p < 0.05$; value \pm SE).

(2) Radial Shock Waves 照射による NF-kB の活性化

放射状衝撃波を照射することにより、細胞の Viability が低下し、発数が増加することにより、viability は更に低下した。細胞の viability は 1000 発では $80.2 \pm 19.9\%$ 2000 発では $60.7 \pm 6.9\%$ 3000 発では $44.6 \pm 7.4\%$ に対し、非照射群では $100 \pm 13.3\%$ だった。生細胞数で正規化した NF-kB の活性化は [optical density (OD) 450 nm/ 10^5 cell] では、コントロールグループで 0.0038 ± 0.0017 、衝撃波 1000 発 0.0059 ± 0.0012 、衝撃波 2000 発 0.006 ± 0.002 、衝撃波 3000 発では 0.0074 ± 0.0035 だった (Fig. 3)。NF-kB の活性化は体外衝撃波群で軽度高く、コントロール群と衝撃波 3000 発群では統計学的有意に増加していた ($p < 0.05$)。

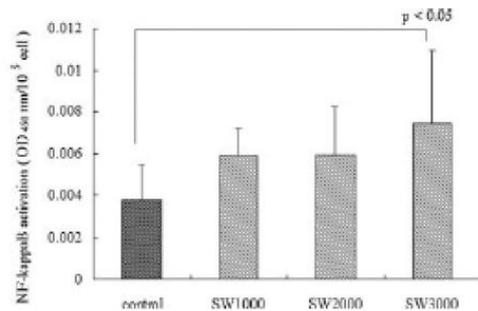
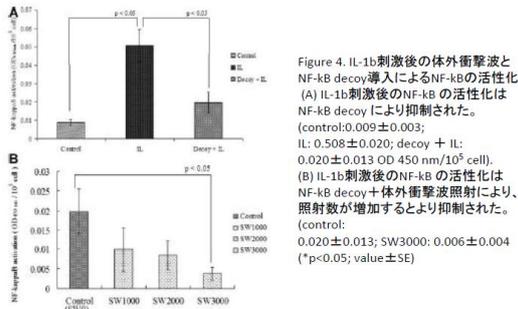


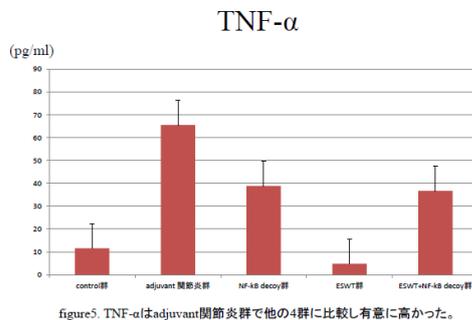
Figure 3. 体外衝撃波によるNF-kBの活性化の検討。NF-kB照射により、軽度の活性上昇を認めた。(* $p < 0.05$; value \pm SD).

(3) 放射状衝撃波と NF-kB decoy による NF-kB の活性化
IL-1b で刺激することにより NF-kB の活性化

は増強するが、NF-kB decoy を使用することにより、有意に活性を抑制した (Fig. 4A)。NF-kB decoy と放射状体外衝撃波照射による抑制は発数が増加することにより増強していた。3000 発の衝撃波と NF-kB decoy 群では 0.006 ± 0.004 でコントロール群の半分以下となっており、統計学的有意に低下していた (Fig. 4B)。

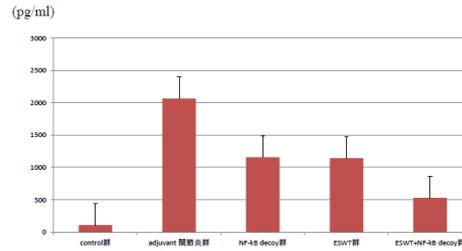


(4) ELISA 法による炎症性サイトカインの定量的評価
TNF- α ; ELISA 法による定量測定で、Adjuvant 関節炎群で他の 4 群に比較し有意に上昇していた。体外衝撃波、NF-kB decoy 両方とも TNF- α の抑制効果を示していた。(Fig.5)

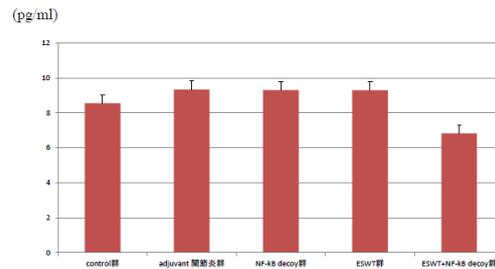


IL-1 β ; ELISA 法による IL-1 β の定量測定では、Adjuvant 関節炎群で他の 4 群に比較し有意に上昇していた。体外衝撃波、NF-kB decoy 両方とも IL-1 β の抑制効果を示しており、ESWT+Nf-kB decoy 群が最も抑制効果が高かった。(Fig.6)
NGF; ELISA 法による NGF の定量測定では、Adjuvant 関節炎群、ESWT 群、NF-kB decoy 群は control 群、ESWT+Nf-kB decoy 群に比較し有意に上昇していた。体外衝撃波と NF-kB decoy 両方を使用した群で抑制効果が高かった。(Fig.7)
以上より、体外衝撃波及び NF-kB decoy は炎症の抑制効果を認め、関節炎モデルを用いた実験から体外衝撃波及び NF-kB decoy を用いた方がより炎症性サイトカインを抑制する効果が高いと考えられた。

IL-1 β



NGF



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 1 件)

Sugioka K, Nakagawa K, Murata R, Ochiai N, Sasho T, Arai M, Tsuruoka H, Ohtori S, Saisu T, Gemba T, Takahashi K. Radial shock waves effectively introduced NF-kappa B decoy into rat achilles tendon cells in vitro. J Orthop Res. 2010 ;28(8):1078-83. doi: 10.1002/jor.21081. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 信靖 (OCHIAI NOBUYASU)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 40400931

(2) 研究分担者

大鳥 精司 (OHTORI SEIJI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 40361430

(3) 連携研究者

()

研究者番号: