

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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2011

課題番号：22792004

研究課題名（和文） ナノフラーレンと超音波を用いた新規変形性顎関節症治療法

研究課題名（英文） Development of next-generation therapy for temporomandibular joint arthrosis by gene transfer technique using nanofullerene and ultrasonic wave

研究代表者

馬杉亮彦 (BASUGI AKIHIKO)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80351922

研究成果の概要（和文）：ナノフラーレンと超音波を用いた新規変形性顎関節症治療法を開発する。ウサギ膝関節由来滑膜細胞HIG82細胞にメカニカルストレス（伸展刺激）を与え、所定の時間に培養上清を回収し、ELISA Kit（R&D system社）を用いてIL-1 β 、IL-1ra、PGE2の濃度を測定した。次いでHIG82細胞にフラーレンを作用させたところ、これらの炎症性メディエーターが明らかに減少した。超音波導入装置（ソニトロン2000）を用い口腔癌細胞にDNA・フラーレンを導入し、導入効果が高い条件を検討した。導入効率を比較検討したところ、フラーレン単独に比較して、ソノポレーション法を用いた群で、明らかな導入効率の増加を認めた。

研究成果の概要（英文）：We develop the next-generation therapy for temporomandibular joint arthrosis by gene transfer technique using the nanofullerene and ultrasonic wave. HIG-82 cells were seeded into silicon chambers. The chambers were attached to a stretching apparatus which applied a uniaxial sinusoidal stretching force. The amounts of IL-1 β , IL-1ra, PGE2 released into the culture medium were determined using ELISA. Nanofullerene pretreatment suppressed PGE2 synthesis induced by mechanical stretch. We used sonoporation to transfect DNA-nanofullerene into HIG-82 cells and examined the transfection efficiency. Transfection efficiency was significantly increased when the cells were ultrasonicated with nanofullerene.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|-----------|---------|-----------|
| 22年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 23年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ソノポレーション，フラーレン，ナノバブル，遺伝子導入，

1. 研究開始当初の背景

これまで顎関節症患者滑液中に存在するサイトカインを同定し、フリーラジカルの一

つであり、強力な炎症反応物質である一酸化窒素（NO）が顎関節症患者において上昇していること、炎症サイトカイン（特に IL-1 β ）

が NO と密接に関連していること、成熟ウサギの抗原誘発慢性顎関節炎モデルの滑膜表層細胞において、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) が強く発現していることを見出してきた。

このように、変形性関節症の病因とされる酸化ストレスが関節構成細胞の活性・寿命の低下や機能の低下に関連していることが明らかとなっており、この疾患成立に関与する酸化ストレスを抑制する研究がなされている。その中でナノカーボン素材のフラージェンが強い抗酸化作用を持つことが報告されている。また、フラージェン類は DNA と結合し、ベクターとしての高い能力を持つ事も報告されており、顎関節症の遺伝子治療への応用の可能性も持っている。また、申請者の研究室では、超音波遺伝子導入法 (sonoporation 法) を用いて滑膜細胞に IL-1ra 遺伝子を導入したところ、滑膜細胞の炎症反応が IL-1ra 遺伝子導入によって抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

申請者はナノカーボン素材のフラージェンが顎関節における変形性関節症に対して有用な抗軟骨変性因子となり、また IL-1ra 遺伝子等の遺伝子治療のベクターとなり得る可能性に注目した。本研究では顎関節内にフラージェンを投与し変形性関節症の病態である軟骨変性の抑制を明らかにし、また同時にフラージェンおよび、ソノポレーション法を用いて滑膜細胞に IL-1ra 遺伝子導入を行い、抗炎症効果も明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

① *In vitro* の実験系におけるフラージェンの投与と細胞への影響の解析：ウサギ膝関節由来滑膜細胞 HIG82 細胞にメカニカルストレスを与え、所定の時間に培養上清を回収し、ELISA Kit (R&D system 社) を用いて IL-1 β , IL-1ra, PGE₂ の濃度を測定する。次いで HIG82 細胞にフラージェン (三菱化学より供与予定) を作用させ、これらの炎症性メディエーターがどのように変化するか調べる。

② *In vitro* の実験系におけるフラージェンの遺伝子導入効果の検討：まず、フラージェンを用いたトランスフェクションの条件の最適化を行う。 β -galactosidase 発現プラスミドとフラージェンを混合し、DNA・フラージェン複合体を調製する。HIG82 細胞に対しその複合体を添加し培養する。数日培養後固定し、X-gal 染色を行い導入細胞を観察する。蛍光を持つ細胞の数を全細胞数で割ることでトランスフェクション効率とする。また申請者の研究室では以前、別プロジェクトとして超音波遺伝子導入法 (Sonoporation 法) を用いて滑膜細胞や口腔扁平上皮癌細胞へ遺伝子

導入を行った経験があり、フラージェン単独で導入効率が悪い場合は Sonoporation 法の併用も検討する。

③ *In vitro* の実験系における抗炎症性サイトカイン発現プラスミドの導入 (IL-1ra, TNF- α など) と細胞状態の分子生物学的解析：フラージェンを用い HIG82 細胞に IL-1ra 発現プラスミドを導入する。IL-1ra 発現プラスミドは本大学感染分子生物学分野から供与をうける。IL-1ra 導入後、IL-1ra 免疫染色法やウェスタンブロット法にて細胞内 IL-1ra タンパクの発現を確認する。ELISA Kit (R&D system 社) を用いて IL-1 β , IL-1ra, PGE₂ の濃度を測定する。

④ *In vivo* の実験系におけるフラージェンの投与と成績評価：変形性顎関節症の抑制効果を検討するため、顎関節炎モデルウサギの顎関節にフラージェン溶液を週 1 回注射する。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行う。また、IL-1ra 発現プラスミドまたは抗 TNF- α 抗体発現プラスミドとフラージェンの混合溶液を同様に顎関節に注入し、関節炎の抑制効果を検討する。フラージェンのみで導入効率が悪い場合は、Sonoporation 法の併用も検討する。IL-1ra 発現プラスミド・フラージェン複合体とマイクロバブル溶液を混合し、DNA・フラージェン/マイクロバブル複合体溶液を調製する。この調製した混合溶液をウサギの顎関節に注入し、超音波導入装置 (ソニトロン 2000) の超音波発振端子を直接顎関節にあて、超音波照射する。

4. 研究成果

① ウサギ膝関節由来滑膜細胞 HIG82 細胞にメカニカルストレス (伸展刺激) を与え、所定の時間に培養上清を回収し、ELISA Kit (R&D system 社) を用いて IL-1 β , IL-1ra, PGE₂ の濃度を測定した。次いで HIG82 細胞にフラージェン (三菱化学より供与) を作用させたところ、これらの炎症性メディエーターが明らかに減少した。

② フラージェン単独でトランスフェクションの条件の最適化を図ったが、フラージェン単独で導入効率が悪かったので、Sonoporation 法を併用した。超音波導入装置 (ソニトロン 2000) を用い口腔癌細胞に DNA・フラージェンを導入し、導入効果が高い条件を検討した。導入効率を高めるため、超音波造影剤 (マイクロバブル) を併用した。まず、DNA・フラージェン複合体とマイクロバブル溶液を混合し、DNA・フラージェン/マイクロバブル複合体溶液を調製する。この調製したフラージェン溶液を細胞懸濁液に加え、さまざまな条件で超音波を照射する。24 時間培養後、X-gal 染色により導入細胞を測定し、導入効率を比較検討したところ、フラージェン単独に比較して、

ソノポレーション法を用いた群で、明らかな導入効率の増加を認めた。

③フラレン単独で IL-1ra 発現遺伝子導入を試みたが、導入効率が悪かったため、ソノポレーション法を併用したところ、導入効率が増強するのを確認した。HIG82 細胞に抗炎症性サイトカインである抗 TNF- α 抗体発現プラスミドを用いた。結果として in vitro にて効率のよい超音波の出力、照射時間、バブルリポソームの混入量、表面抗原 (CD44) に対する抗体の混入比率を検討し、抗 TNF- α 抗体発現遺伝子の滑膜細胞への導入効率を 20%以上となる条件を確立した。

④フラレンのみで導入効果が悪いため、Sonoporation 法を併用した。正常ウサギ顎関節での抗 TNF- α 抗体発現を確認したところ、正常ウサギ顎関節滑膜細胞での抗 TNF- α 抗体発現は確認されたものの、治療効果の得られる抗 TNF- α 抗体の顎関節局所濃度 $1.0^4 \times 100000$ M/ml 以上の濃度を安定して検出できなかった。これは、関節滑液の採取方法に問題がある可能性があるため、再度採取方法および検出方法を検討する必要がある。また、さらに導入効率を上げる方法としてナノバブルに付着させる滑膜表面抗体を変更することも視野に検討する予定である。

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 2 件)

- ① 馬杉亮彦 吉岡泉 鶴島弘基 石川文隆
松尾拓 富永和宏 下顎骨中心性巨細胞
肉芽腫の 1 例 日本口腔外科学会雑誌 57
2011 294-298

<http://ci.nii.ac.jp/naid/40018862920>

[学会発表] (計 1 件)

- ① 馬杉亮彦、土生学、他 本邦における下
顎非対称治療の実態調査 日本顎変形症
学会総会 2010 年 6 月 15 日 札幌

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 馬杉亮彦
(BASUGI AKIHIKO)

研究者番号 : 80351922

- (2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

- (3) 連携研究者 ()

研究者番号 :