

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792322

研究課題名(和文) 上皮由来CTGFは歯肉上皮細胞間結合因子を制御するか RNAiを用いた先駆的探索

研究課題名(英文) RNA interference research on the regulatory mechanism of intercellular binding factor in gingival epithelium

研究代表者

石田 雄之 (ISHIDA, Yuji)

東京医科歯科大学・国際交流センター・特任助教

研究者番号：00516297

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)：本研究は、口腔内において病原性微生物や化学物質などの外来要因の侵入に対し最前線に位置する歯肉のバリアー構造の機能的構造維持を制御するメカニズムを解明するために、口腔内を想定した湿潤条件下で短期間に効率的に核酸医薬を導入する方法を模索し、心血管系への導入がすでに確立しているマイクロバブル溶液と超音波刺激が歯肉上皮・結合組織に対し核酸医薬を導入する方法として有用であることが分かった。また、歯肉上皮の炎症を制御するためにNK-kBデコイの導入をマイクロバブル溶液と超音波装置を用いて行ったところ、ICAM-1、IL-6などの炎症性サイトカインの発現を効率よく抑制することができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to elucidate the mechanisms that control and maintain the elaborate structure of the barrier function of the gingiva, which is located in the frontier for the intrusion of the exogenous agents such as pathogenic microorganisms and chemical substances in the oral cavity. And, assuming in the oral cavity, we are looking for the effective ways to introduce the nucleic acid medicine in a short period under wet conditions. As a result, the transfection method established already in the field of the cardiovascular system using microbubbles solution and ultrasonic stimulation was found to be useful for the gingival epithelial and connective tissue. Furthermore, it was found that the transfection of NF-kB decoy to the gingival tissue using micro bubble solution and the ultrasound device effectively suppress the expression of the inflammatory cytokines such as ICAM-1 and IL-1 in the gingival tissue.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：歯肉 核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

矯正治療中の口腔内はワイヤーやブラケット、インプラントアンカー等の構造により器具周囲の清掃状態は不良になり、歯肉の炎症を生じやすい。歯肉の増殖は歯肉の炎症の代表的な症状であり、臨床的には仮性ポケットを形成し更にプラークコントロールが困難な環境を形成することで、炎症が増幅していく悪循環に陥ってしまうことが少なくない。すると、ワイヤーなどの装置が増殖歯肉により被覆されてしまったり、インプラントアンカーの脱落原因となったりするため、矯正治療のリスクファクターの一つと考えられる。そのため、歯肉の炎症への配慮は、矯正治療における重要な要素の一つであると言える。しかしながら、具体的な対応としては矯正器具周囲のプラークコントロール指導を行うにとどまり、積極的な対策は行われていないのが現状である。一方、清掃状態が良好であっても、歯肉の炎症性増殖を抑えることができず、プラークコントロールに苦慮することもある。歯肉の炎症については、詳細についての報告が少なく、炎症性歯肉増殖の病態の解明およびそのコントロール方法の開発が急がれる。

そこで私は、炎症性歯肉増殖に対し有効な治療法を開発することを研究の全体構想に据え、まずは歯周病原性細菌による実験的歯肉炎の初期病変進行に ICAM-1 が関与することを明らかにすることとし、実験を計画した。

## 2. 研究の目的

炎症性疾患の新規治療方法として decoy をはじめとした核酸医療が注目されている。歯周病の分野においても様々な研究がおこなわれているが、歯周組織への decoy の導入に関しては歯肉への注射等の侵襲のあるものにとどまっているのが現状である。そこで、マウス歯周組織への decoy 新規導入方法の開発を目的として、Microbubble 超音波導入装置を併用し、導入の評価を行った。また、炎

症を抑える目的で核酸医薬である NF- $\kappa$ B デコイを導入し、歯肉組織内の炎症性サイトカイン発現に与える影響について調査することとした。

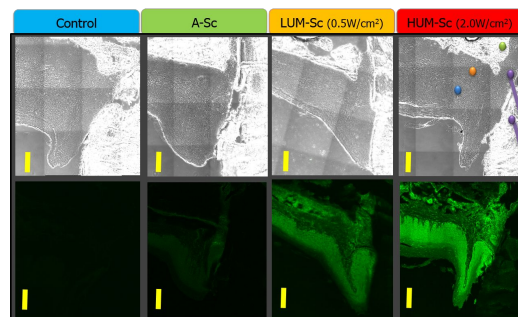
## 3. 研究の方法

(1)8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスの上顎臼歯部歯肉へ、遺伝子の 5'末端に蛍光標識である 6-FAM を付着させた Scrambled decoy ゲル (Gene design) を塗布し、Microbubble 超音波導入装置 (Nepagene) を 30 秒間照射し導入を行った。超音波の出力は、文献から低出力 ( $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ ) と高出力 ( $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ ) の二種類を採用し、未処置の対照群、スクランブルデコイを溶かしたマイクロバブル溶液を塗布のみする群との比較を行った。導入 2 時間後と 7 日後の歯周組織を採取し、連続凍結切片を作成したのち、組織学的に評価を行った。また decoy の導入効率に関しては共焦点蛍光顕微鏡を用い定量的な評価を行った。

(2) マウス歯周組織への NF- $\kappa$ B decoy 導入を Microbubble 超音波導入装置を用いて行い、歯肉組織の炎症性サイトカインの発現に与える影響について評価を行った。

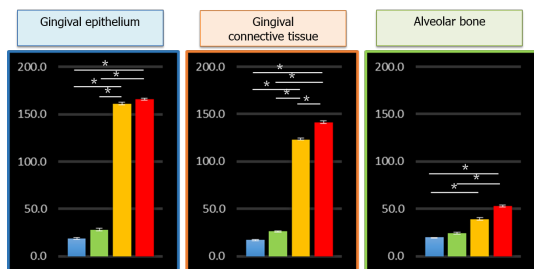
## 4. 研究成果

(1) マウス歯肉組織への核酸医薬導入の効率について導入効率の良い条件についての調査を行った。実験結果を以下に示す。



結果をまとめると、対照群と塗布を行っただけの群と比べ、マイクロバブル溶液と超音波装置を併用した群は強い蛍光強度を示した。また、高出力の超音波で行った群の方が、低

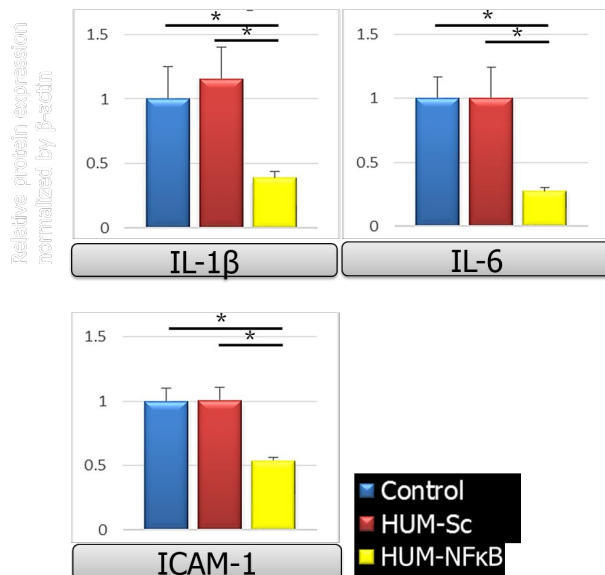
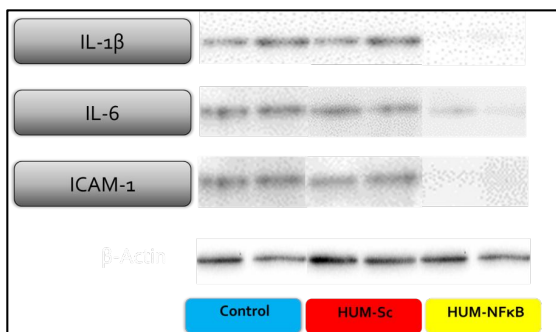
出力の群に比べ、蛍光強度が強かった。また、結果に対し定量評価を行った結果について下に示す。



蛍光強度を定量分析した結果より、対照群と比べ塗布だけ行った群の蛍光強度に有意差は、歯肉上皮、歯肉結合組織、歯槽骨どの部位においても認められなかった。また、全ての部位において超音波照射群はそうでない群と比べ有意に蛍光強度が強かった。一方、歯肉結合組織層においては、低出力群に比べ高出力群の蛍光強度が有意に強かった。以上のことから、歯肉組織へのデコイ導入の際、マイクロバブル溶液と超音波装置を併用することが有用であることが分かった。また、導入効率には超音波の出力が影響することが示唆された。

(2)NF-κB の歯肉組織への導入とその効果について検討を行った。(1)で導入効率の良かった高出力条件で、NF-κB デコイの導入を行い、歯肉組織内の炎症性サイトカインの発現に対し与える影響を調査した。

Western blotting の結果を以下に示す。



以上の結果より、NF-κB デコイ導入群は、対照群、スクランブルデコイ導入群と比較し、歯肉組織内の炎症性サイトカインである IL-1、IL-6、ICAM-1 量が有意に減少している結果となった。スクランブルデコイ導入群は、対照群と比較し有意な差は認められなかった。

つまり、核酸医薬である NF-κB デコイの歯周組織への導入に、マイクロバブル溶液と超音波装置を用いることで、短時間で効率的に導入を行えることが分かった。また NF-κB デコイの導入により、炎症性サイトカインを減少させることが明らかとなった。以上のことから、唾液に常にさらされる口腔内にとって、マイクロバブル溶液と超音波装置を組み合わせた導入法が、短時間で効率的に導入を行える方法であることが示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Hiroyuki Yamaguchi et al, Introducing Decoy into Periodontium by Using Ultrasound-Microbubble technique, 93<sup>rd</sup> General Session & Exhibition of the IADR,

2015年3月11-14日、Boston、USA

Hiroyuki Yamaguchi et al、Transfection Efficiency of Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells Decoy in Periodontium、91<sup>st</sup> Congress of the European Orthodontic Society、2015年6月13-18日、Venice、Italy

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石田 雄之 (Ishida Yuji)  
東京医科歯科大学国際交流センター・特任  
助教  
研究者番号：00516297

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

細道 純 (Hosomichi Jun)  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究  
科咬合機能矯正学分野・講師  
研究者番号：00420298

山口 博之 (Yamaguchi Hiroyuki)

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究  
科咬合機能矯正学分野・大学院生  
研究者番号：なし