

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670842

研究課題名(和文) ナノバブルと超音波を用いた顎関節硬直症に対する新しい遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Drug delivery system using nano-microbubbles and ultrasound applicable to a gene therapy for temporomandibular joint ankylosis

研究代表者

近藤 綾 (KONDO, AYA)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：00646789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、顎関節強直症の治療に応用可能な、超音波とナノ・マイクロバブルを用いた関節組織への遺伝子導入システムの開発を関節強直症モデルマウスの関節組織を用いて検討した。その結果、関節強直症自然発症マウスの膝関節近傍の筋組織において、照射する超音波の周波数、超音波圧力、デューティ比、パルス数、照射時間などのパラメータと、ナノ・マイクロバブルの膜構成、気泡サイズ、内封ガス、ゼータ電位、細胞と気泡の比率などの条件を変化させることで、超音波場の気泡の動力学の物理的パラメータを最適化でき、細胞生存率、導入効率などを向上させ、組織障害性の軽減させることができる程度可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined a drug delivery system using nano-microbubbles and ultrasound applicable to a gene therapy for temporomandibular joint ankylosis. As a study model, the kinetics of luciferase gene expression was analyzed in the mice model for the joint ankylosis by using bioluminescence imaging. To improve transfer efficiency of transfection with minimum tissue damage, parameters such as irradiation time of ultrasound, ultrasonic frequency to be irradiated, ultrasonic pressure, the duty ratio, pulse number, structure of the nano-microbubbles, the zeta potential, bubble size, the inner sealing gas, and the proportion of cells and the bubble were tested. As a result, the luciferase gene activity was observed in the skeletal muscle close to the knee joint of the model mouse after the luciferase gene transfection.

研究分野：口腔外科学

キーワード：ナノ・マイクロバブル 超音波 顎関節 強直症 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

顎関節症が一般市民に認知されるようになり、開口障害や顎関節痛等の症状を訴え口腔外科を受診する患者が増加してきている。しかし、これらの患者の中には、関節強直症をきたす可能性のある関節リウマチ等の患者もしばしば認められる。

これまで、共同研究者の森らは、関節強直症を高頻度に自然発症する疾患モデルマウス3系統の樹立に成功した。McH/lpr-RA1マウスは、MRL/lpr × (MRL/lpr × C3H/lpr)F1のN2マウスの中で足関節に肉眼的に明らかな腫脹を示す雄のN2マウスと雌のN2マウスを交配させて作出された仔をF1世代とし、以後、足関節の関節腫脹認めたマウスをF54世代以上にわたり同様に兄妹交配し樹立した関節強直症モデルマウスである(Mori S, et al. Pathol Int 58(7):407-414, 2008)。他の2系統は、MRL/lprマウスのX染色体上のSAP遺伝子に変異をきたしたMRL/rplマウスを樹立し(J Immunol 2006, 176:395-400)、このマウスとC3H/lprマウスの雄のF1マウスが、足関節に著明な軟骨・骨増殖性の関節強直症を100%の頻度で発症することを見出し(Ann Rheum Dis 2006, 65:1273-1278)、以後、足関節の関節腫脹認めたマウスをF30世代以上にわたり兄妹交配し樹立した関節強直症モデルマウスであり、これら2系統のうちの1系統のY染色体は、MRL系マウス由来であるのに対し、別の1系統のY染色体はC3H系マウス由来である。

一方、生体組織への遺伝子導入法としては、これまで、ウイルスベクターを用いる方法や非ウイルスベクター系としてリポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法等が報告されている。しかし、ウイルスベクターを用いる方法は、免疫原性や発癌性等の観点から臨床応用が困難な状況にある。また、非ウイルスベクター系の方法には、導入効率が低いという問題がある。本研究においては、関節強直症に対する遺伝子治療実験も視野に入れ、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた関節組織への遺伝子導入システムの有効性を検証する。

超音波とナノ・マイクロバブルを使った分子導入法は、気泡が超音波照射により破壊される時に生じる衝撃波や液体ジェット等の衝撃圧を利用して、非侵襲的に標的組織に遺伝子などの高分子を導入することが可能であるが、我々の研究グループは、これまでの超音波による分子導入効率を向上させた高効率型超音波分子導入装置(発明者:小玉哲也、森 士朗、出願番号:特願 2006-109894、PCT/JP2007/057878)を開発した。上記の高効率型超音波分子導入装置とナノ・マイクロバブルを用いて、これまで腫瘍細胞や骨格筋

細胞等へのレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ、GFP)の遺伝子導入に成功している(Ultrasound Med Biol 2008, 34(3):425-434)。

2. 研究の目的

本研究は、ナノ・マイクロバブルと超音波を用いた新しい顎関節組織への遺伝子導入システムを開発し、この遺伝子治療システムを我々が樹立した関節強直症モデルマウスに適用して、関節組織への遺伝子導入効率を評価し、顎関節疾患に対する本法の臨床応用に向けての問題点を抽出することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および導入遺伝子

本研究では、上記3系統の関節強直症モデルマウスの足関節における関節強直症の形成過程を病理組織学的に検討した。McH/lpr-RA1マウスは、約4か月齢で足関節に発赤を伴った浮腫上の腫脹として発症し、急速に関節強直に移行していく。病理組織学的には、関節リウマチにみられるようなパンス形成により骨破壊がみられるとともに、急速に滑膜や靭帯が軟骨に置換され、さらに骨化し、関節腔は増生した骨のため消失してしまう。

一方、他の2系統の関節強直症モデルマウスは、約3か月齢において、McH/lpr-RA1マウスと同様な関節強直症を高頻度で発症する。当初、本研究では、関節腔内に治療遺伝子を導入する方法を考えていたが、上記関節強直症モデルマウスにおいては、急速に関節腔が骨増生により消失することから、関節腔内投与は困難と思われた。また、将来、治療分子の導入を想定した場合、滑膜や靭帯があまりにも急速に骨化すると治療分子の選択や投与のタイミングの決定が困難であることが想定された。従って、本研究では、上記3系統の中で、比較的、緩徐に関節強直が進行するMcH/lpr-RA1マウスを実験動物として用い、将来的には、関節周囲組織に治療用遺伝子を導入し、治療する方法を想定した遺伝子導入法を検討することとした。また、導入遺伝子としては、リポーター遺伝子で、生体発光イメージング装置を用いることにより、遺伝子導入の効率をリアルタイムで検討できるルシフェラーゼ遺伝子の導入を検討することとした。

(2) プラスミド DNA

本研究では、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターとしてpGL3-control (Promega)を使用した。プラスミド DNA は EndoFree Plasmid Mega Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で抽出し、1 mg/mL に調整し、実験をおこなった。

(3) ナノ・マイクロバブル

ナノ・マイクロバブルとして音響性リポソーム(AL)を使用した。リポソームは、

1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl choline (DSPC; NOF, Tokyo, Japan) と 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-methoxy-polyethyleneglycol (DSPE-PEG [2000-OMe]; NOF) の脂質を物質量が 94 : 6 の割合で梨型フラスコに入れて、クロロホルムで完全に溶解した。その後、ロータリーエバポレーター (NVC-2100/N-1000, Eyela, Tokyo, Japan) にてクロロホルムを完全に蒸発させてリポソーム膜を形成させた。4 下で一晩保存し、さらにフラスコ内を完全に乾燥させた後、PBS を 5 mL 加えてリポソーム膜を水和し、液体窒素で急速に凍結させて直ちに 65 °C の温浴槽にて凍結リポソームを融解した。この凍結・融解の操作を 3 回繰り返し、多重層リポソームを単層リポソームにした。リポソーム粒径を均一にするために、リポソームエクストルーダー装置 (Northern Lipids Inc., Vancouver, BC, Canada) を用いて、3 種類のフィルター (100, 200 and 600 nm; Nuclepore Track-Etch Membrane, Whatman plc, Maidstone, UK) を通すことで最終的に 100 nm 程度の粒径をもつリポソームを作製した。実験で使用する前に、0.45 µm の孔径をもつフィルター (Millex HV filter unit, Durapore polyvinylidene-difluoride [PVDF] membrane, EMD Millipore, Billerica, MA, USA) を通して滅菌処理をおこなった。脂質濃度は、リン脂質 C テストワコー (Phospholipids C assay, Wako) を使用して標準プロトコルにしたがって酵素法により測定した。ただし、DSPC-PEG は直接測定することができないため、DSPC の濃度から相対的に算出した。PBS で 1 mg/mL に濃度調整したリポソームは、1 mL を 7 mL 滅菌済み容器に移し、ハフツ化プロパン (C₃F₈) でバイアル中の空気を完全に置換した状態にした。このとき、20-kHz stick sonicator (130 W, Sonics & Materials, Newton, CT, USA) を用いて、振幅 50% で 1 分間リポソームに超音波照射をおこない、リポソーム内に C₃F₈ を封入し、音響性リポソームを作製した。音響性リポソームは脂質二重膜の内部に C₃F₈ が封入されていると考えられる。音響性リポソームの個数分布とゼータ電位は、ゼータ電位・粒径測定システム ELSZ-2 (zeta potential range: ± 200 µm, particle size/distribution range: 0.6 nm - 7 µm, laser source: laser diode (660 nm), Otsuka Electronics, Osaka, Japan) を使用して測定した。

(4) 培養細胞

本研究では、超音波照射条件を検討するために、ヒト胎児腎細胞(293T)を使用した。培地として、非動化済みのウシ胎児血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、および L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) をそれぞれ最終濃度 10 %、1 % となるように添

加した、Dulbecco's modified Eagle's 培地 (Sigma-Aldrich) を使用した。培養条件は、37 °C、5 % CO₂、95 % air とした。細胞は血球計算盤とトリパンブルー染色を用いてカウントし、99 %以上の生存率でのみ実験に使用した。

(5) 超音波照射条件および遺伝子導入法

細胞実験における AL の濃度検討

デューティ比 50 %、パルス数 2000、照射時間 10 秒、照射強度 1.0 W/cm² (MI = 0.12) でおこなった。AL 濃度 10 % (v/v) のルシフェラーゼ発現量で無次元化した (n = 3-4)。

細胞実験における超音波照射強度の検討

AL 濃度 10 % (v/v)、デューティ比 50 %、パルス数 2000、照射時間 10 秒でおこなった。照射強度 1.0 W/cm² (MI = 0.12) のルシフェラーゼ発現量で無次元化した。

細胞実験におけるデューティ比およびパルス数の検討

AL 濃度 10 % (v/v)、照射時間 10 秒、照射強度 1.0 W/cm² (MI = 0.12) でおこなった。デューティ比 50 %、パルス数 2000 のルシフェラーゼ発現量で無次元化した。

マウス実験におけるデューティ比およびパルス数の検討

AL 濃度 50 % (v/v)、デューティ比 20 %、パルス数 2000、照射時間 60 秒、照射強度 3.0 W/cm² (MI = 0.21) でおこなった。マウス関節周囲組織への総投与量は 30 µL とし、以下の通りに投与した。DNA を投与したのみの群 (DNA alone): DNA: 10 µL, 生理食塩水: 20 µL。DNA とナノ・マイクロバブルを投与したのみの群 (DNA + ナノ・マイクロバブル) および DNA とナノ・マイクロバブルを投与後、超音波を照射した群 (DNA + ナノ・マイクロバブル + US): DNA: 10 µL, ナノ・マイクロバブル: 15 µL, 生理食塩水: 5 µL とする。

(6) 生体発光イメージングによる遺伝子発現量の解析

ルシフェリン (Promega: マウス体重 (g) あたり 150 µg) をマウスの腹腔内に投与後、吸入麻酔 (イソフルラン) をかけ、in vivo イメージング装置 (IVIS100; Xenogen) 内に設置した。ルシフェリン投与 10 分後、左右後肢の生体発光シグナルを測定した (照射時間: 40 秒)。

4. 研究成果

本研究は、超音波とナノ・マイクロバブルを用いた関節組織への遺伝子導入システムを開発し、顎関節強直症の治療に応用するために、我々が樹立した関節強直症モデルマウスにこの遺伝子導入法を適用して、関節強直症の遺伝子治療の効果を評価し、顎関節疾患に対する本法の臨床応用の可能性を検討することを目的とする。これまでの研究により、我々の研究グループで樹立した関節強直症自然発症マウスの膝関節近傍の筋組織において、照射する超音波の周波数、超音波圧力、デューティ比、パルス数、照射時間などのパラメーターと、ナノ・マイクロバブルの膜構

成、気泡サイズ、内封ガス、ゼータ電位などの構成や、細胞と気泡の比率などの条件を変化させることで、超音波場の気泡の動力学的物理的パラメータを最適化でき、細胞生存率、導入効率などを向上させ、組織障害性の軽減させることが出来る程度可能となった。

しかし、本研究で用いた関節強直症モデルの病理組織学的検討においては、血管拡張や浮腫、炎症性細胞浸潤を伴った、関節炎が、パルス形成を伴った骨破壊病変へと移行し、さらには、靭帯や滑膜組織における軟骨・骨増生を来し、最終的には、炎症性細胞浸潤がみられない関節強直症を形成する所見がみられた。これらの病変の進行は非常に早く、目まぐるしく変貌する本病変に関して遺伝子治療を行う場合、どのような遺伝子が有効か、本研究で推測することは困難であった。

関節強直症の病因解明に関して、今後、多方面から詳細な検討が必要である。現在我々の研究グループにおいては、関節病変の発症時期をリアルタイムで非侵襲的に検出し、関節組織への薬剤投与のタイミングを決定する方法を検討している。方法としては、関節炎病巣部で産生されるサイトカイン等を、そのサイトカインと結合する物質に蛍光標識し、生体発光イメージング法で検出する手法を検討している。その結果、現在のところ、ある蛍光標識マーカーにより関節炎の発症を捕捉できる可能性が示唆されたが、検出感度にばらつきがみられ、現在も生体発光イメージング法による病変検出法を検討中である。また、本関節強直症モデルマウスの病理組織学的解析においては、病変の発症から強直症に至る時間がかかなり短いことや関節炎発症の初期と関節強直症の形成時期では組織像が全く異なること等から、それぞれの病期において治療効果が期待できる薬剤の検証の必要性が明らかとなった。

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3件)

1. 千葉雅俊, 廣谷拓章, 井筒崇司, 近藤 綾, 樋口景介, 野上晋之介, 高橋 哲: 特発性 First bite syndrome の臨床像. 第60回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2015/10/16-18 (名古屋)
2. 千葉雅俊, 廣谷拓章, 近藤 綾, 樋口景介, 吉田重之, 野上晋之介, 佐藤修一, 高橋 哲: 顎関節症の痛み期間が痛み強度, 破局的思考, 生活障害度に及ぼす影響. 第28回日本顎関節学会総会・学術大会・第20回日本口腔顔面痛学会学術大会. 2015/7/4-5 (名古屋)

3. 樋口景介, 千葉雅俊, 野上晋之介, 横田聡, 瀧澤 衆, 近藤 綾, 高橋 哲: 顎関節強直症に対する顎関節授動術における超音波切削装置 (VarioSurg®) の有用性. 第28回日本顎関節学会総会・学術大会・第20回日本口腔顔面痛学会学術大会. 2015/7/4-5 (名古屋)

〔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

近藤 綾 (KONDO AYA)
東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師
研究者番号: 00646789

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

森 士朗 (MORI SHIRO)
東北大学・病院・講師
研究者番号: 80230069

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)
東北大学・医工学研究科・教授
研究者番号: 40271986