

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24792150

研究課題名(和文)低出力レーザーの作用機序に関する基礎的研究—フリーラジカル制御による検討—

研究課題名(英文)Basic study on the action mechanism of low-energy laser: Control of free radicals

## 研究代表者

茂呂 祐利子 (MORO, YURIKO)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：90433549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：低出力レーザーのフリーラジカル制御機構に対する影響を調べるため、血管内皮細胞における一酸化窒素、活性酸素、活性酸素消去酵素、ニトロチロシンの動態について観察した。その結果、レーザー照射によりこれらのフリーラジカル発現は変化し、炎症下では非炎症下とは違った発現を見せた。本研究結果から、低出力レーザーはフリーラジカル発現に影響を及ぼし、抗炎症効果に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the influence of low-energy laser on the free radical control system, dynamics of nitric oxide, reactive oxygen, reactive oxygen-scavenging enzyme, and nitrotyrosine in vascular endothelial cells were observed. Laser irradiation changed these free radical expressions, and the expression in the inflammatory state was different from that in the non-inflammatory state. It was suggested that low-energy laser influences free radical expression, contributing to the anti-inflammatory effect.

研究分野：医歯薬学 歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：低出力レーザー 血管内皮細胞 フリーラジカル In vitro 炎症

### 1. 研究開始当初の背景

歯科治療において、低出力レーザーは創傷治癒の促進、歯周疾患における抗炎症作用、インプラント治療における手術後の疼痛軽減、顎関節症における血流の改善など幅広く応用されている。しかし、その作用機序の詳細については未だ十分に解明されておらず、治療の根拠のないまま臨床応用されているのが現状である。

低出力レーザーの生体への影響に関する研究では、細胞の増殖、遊走、接着、石灰化の促進、増殖因子等の発現亢進、カルシウムイオンの一過性の上昇などの知見は得られていたものの、何が最初のシグナルになり、その後の活性化が誘導されるのかについては不明であった。2008年に低出力レーザー照射が Src tyrosine kinase を活性化し、その活性化には活性酸素種 (ROS) が関与することが報告された (Zhang J *et al.* J cell physiol 217 518-528 2008)。しかし、研究開始当初の時期において、低出力レーザーの生体への作用機序とフリーラジカルとの関連についてほとんど明らかになっていなかった。

活性酸素をはじめとするフリーラジカルは通常フリーラジカル制御機構によって制御されている。申請者は、低出力レーザーの生体への作用機序に活性酸素種が関与するならば、活性酸素種と相互作用する他のフリーラジカルも変化するのではないかと考え、低出力レーザーがどのようにフリーラジカル制御機構に関与するかについて具体的に検討したいと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、低出力レーザー照射が血管内皮細胞のフリーラジカル制御機構に及ぼす影響について検討し、レーザー治療のエビデンスを得ることである。

歯科臨床において低出力レーザーは細胞活性化を期待して用いられる場合と抗炎症効果を期待して用いられる場合の大きく二

つがある。これらを想定して非炎症時と炎症時を設定し実験を行った。

フリーラジカル制御機構はストレスなどによって生成された毒性のあるフリーラジカルから生体を守る機構であり、生成された活性酸素は活性酸素消去酵素によって消去され、無害な水に還元される。一方、炎症等細胞に過剰なストレスがかかるとそのバランスは崩れ、細胞障害性のパーオキシナイトレイトを生成する。

本研究では、非炎症時と炎症時において、低出力レーザー照射後フリーラジカルがどのように変化するのかについて、具体的には一酸化窒素合成に対する影響、活性酸素合成と消去に対する影響、一酸化窒素と活性酸素の反応物質であるパーオキシナイトレイトの影響についてそれぞれ検討し、低出力レーザー照射の作用機序の一部を明らかにしたいと考えた。

### 3. 研究の方法

低出力レーザー照射がフリーラジカル制御機構に及ぼす影響について検討を行った(図1)。

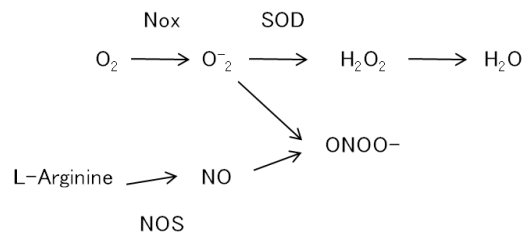


図1.フリーラジカル制御機構

#### (1) 実験条件の設定

レーザー照射条件を決定するために、0~2.6Jの範囲で細胞増殖率を測定し、検討を行った。

非炎症時を想定したレーザーの照射条件 (Control 群) について低出力レーザー照射時の細胞の増殖率を測定し、検討を行った。

炎症時を想定したレーザーの照射条件 (LPS 添加群) について LPS 投与量をそれぞれ変更し、細胞増殖率を測定し、検討を行った。

## (2) 非炎症時を想定した実験(Control 群)

### 一酸化窒素に対する影響

非照射群とレーザー照射群における一酸化窒素の活性について  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  を定量し、血管内皮細胞における一酸化窒素合成酵素 (NOS-1, NOS-2, NOS-3) の発現について免疫組織染色法を用いて観察した。

### 活性酸素合成に対する影響

非照射群とレーザー照射群における活性酸素合成酵素の活性 (NADPH オキシダーゼ活性) を定量し、血管内皮細胞における活性酸素合成酵素 (Nox-1, Nox-2, Nox-4) の発現について免疫組織染色法を用いて観察した。

### 活性酸素除去に対する影響

非照射群とレーザー照射群における活性酸素除去酵素 (Mn-SOD) のタンパク量を定量し、血管内皮細胞における活性酸素除去酵素 (Mn-SOD) の発現について免疫組織染色法を用いて観察した。

### パーオキシナイトレイトに対する影響

パーオキシナイトレイトについてニトロチロシンをマーカーとして定量した。非照射群とレーザー照射群におけるニトロチロシンのタンパク量を定量し、血管内皮細胞におけるニトロチロシンの発現について免疫組織染色法を用いて観察した。

## (3) 炎症時を想定した実験(LPS 添加群)

LPS 添加群の非照射群とレーザー照射群における一酸化窒素の活性、活性酸素合成に対する影響、活性酸素除去に対する影響、パーオキシナイトレイトに対する影響について上記と同様の方法にて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) レーザーの照射条件の検討

細胞の増殖率を指標に検討した結果、レーザーの照射条件は、血管内皮細胞で  $0.26\text{J}/\text{cm}^2 \sim 2.6\text{J}/\text{cm}^2$  において増加傾向を示し、 $0.26\text{J}/\text{cm}^2$  を非炎症時を想定した場合の至適条件とした。

レーザー照射後の細胞増殖率について検討した結果、至適条件での照射により、血管内皮細胞は非照射群と比較し、24、48時間後で細胞増殖は促進した。

$0.26\text{J}/\text{cm}^2$  で照射したとき、LPS  $0, 0.01, 0.1, 0.5, 10\mu\text{l}/\text{ml}$  添加時においてレーザー照射後の細胞増殖は促進した。したがって、培地中 LPS  $0.5\mu\text{l}/\text{ml}$  添加時を炎症時を想定した実験での条件とした。

## (2) 非炎症時を想定した実験(Control 群)

低出力レーザー照射時の一酸化窒素の動態について

一酸化窒素の活性について定量的結果、レーザー照射により活性に有意差は認められなかった。免疫染色の結果、血管内皮細胞には NOS-1, NOS-2, NOS-3 が発現し、照射 24 時間後において NOS-1, NOS-3 の発現の増強が認められた。

低出力レーザー照射時の活性酸素の合成の動態について

NADPH オキシダーゼ活性定量的結果、レーザー照射により活性は上昇した。免疫染色の結果、血管内皮細胞には Nox-1, Nox-2, Nox-4 が発現し、照射 24 時間後において Nox-1, Nox-2 発現の増強が認められ、Nox-4 は変化がなかった。

低出力レーザー照射時の活性酸素の除去の動態について

Mn-SOD のタンパク定量的結果、レーザー照射によりタンパク発現に有意差は認められなかった。免疫染色の結果、血管内皮細胞には Mn-SOD が発現し、照射 24 時間後において発現に変化はなかった。

低出力レーザー照射時のパーオキシナイトレイトの動態について

ニトロチロシンのタンパク定量的結果、レーザー照射によりタンパク発現に有意差は認められなかった。免疫染色の結果、血管内皮細胞にはニトロチロシンが発現し、照射 24

時間後において発現に変化はなかった。

### (3) 炎症時を想定した実験(LPS 添加群)

LPS 添加時における低出力レーザー照射時の一酸化窒素の動態について

一酸化窒素の活性について定量的結果、レーザー照射により活性は減少した。

免疫染色の結果、血管内皮細胞には NOS-1, NOS-2, NOS-3 が発現し、照射 24 時間後において NOS-2, NOS-3 発現の減弱が認められた。

LPS 添加時における低出力レーザー照射時の活性酸素合成の動態について

NADPH オキシダーゼ活性定量的結果、レーザー照射により活性に有意差は認められなかった。免疫染色の結果、血管内皮細胞には Nox-1, Nox-2, Nox-4 が発現し、照射 24 時間後において Nox-2 発現の増強が認められた。

LPS 添加時における低出力レーザー照射時の活性酸素消去の動態について

Mn-SOD のタンパク定量的結果、レーザー照射によりタンパク発現は減少した。免疫染色の結果、血管内皮細胞には Mn-SOD が発現し、照射 24 時間後において発現に変化はなかった。

LPS 添加時における低出力レーザー照射時のパーオキシナイトレイトの動態について

ニトロチロシンのタンパク定量的結果、レーザー照射によりタンパク発現に有意差は認められなかった。免疫染色の結果、血管内皮細胞にはニトロチロシンが発現し、照射 24 時間後において発現に変化はなかった。

以上の結果から、本研究において非炎症時、炎症時における低出力レーザー照射時のフリーラジカルの動態が明らかとなった(表 1)。

	Control		+LPS	
	Non Laser	Laser	Non Laser	Laser
n-NOS	+	++	++	++
i-NOS	+	+	+++	++
e-NOS	+	++	++	+
Nox-1	+	++	+	+
Nox-2	++	+++	++	+++
Nox-4	++	++	++	++
Mn-SOD	+	+	+	±
nitrotyrosine	++	+	+	+

+ : positive reaction

表1.低出力レーザー照射後のフリーラジカル発現の変化

両者を比較した結果、非炎症時、炎症時ともに低出力レーザー照射により一酸化窒素、活性酸素は変化するが、その反応物質であるパーオキシナイトレイトは変化しないことが明らかになった。一方、活性酸素消去酵素については、レーザー照射後、活性酸素の活性、合成が増加したにもかかわらず変化がない、もしくは活性酸素の活性に変化がないのに減少したことから、低出力レーザー照射により、活性酸素消去酵素の発現は活性酸素の増減には依存しないのではないかと推測された。

当初の予測では、低出力レーザーによる抗炎症作用に活性酸素活性やパーオキシナイトレイトの減少、あるいは、活性酸素消去酵素活性の上昇があるのではないかと推測されたが、本研究からはそのような知見は得られなかった。このことは Macedo AB らの低出力レーザーは活性酸素のスカルベンジャーを直接活性化し、酵素抗酸化システムとは独立しているというのではないかという推測とも一致する (Macedo AB *et al.* PLoS One. 2015 Jun 17;10(6))。このことから、低出力レーザーの生体への効果は、活性酸素と一酸化窒素のバランスがその後の反応にかかわるものと推測された。本研究結果はフリーラジカルの相互作用を観察した点において、他の研究とは異なっており、低出力レーザーの細胞への作用機序に関する基礎的研究として一つの知見となりうると考えられる。

低出力レーザーの作用機序に関する研究報告は4年前に比べ増加しているものの、まだ十分とは言えない。近年の報告でフリーラジカルの発現はレーザーの波長、出力、照射時間などにより異なること、*In vivo/In vitro*の実験系違いや細胞種、継代数、培養条件の違いなどによっても結果が異なるとされる。このことが現在まで報告されているレーザー研究における結果の多様性を生じていると考えられ、本研究結果についてもある一定条件下での結果であることを念頭に置かなければならない。この結果を直ちに臨床応用することは早計であり、今後、生体応用可能な条件についてさらなる検討をしていきたい。

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)

[学会発表](計 3 件)

Yuriko Moro, Takuya Harada  
Influence of low-energy laser irradiation on nitric oxide and VEGF expression in vascular endothelial cells 第58回歯科基礎医学会学術大会  
2016年8月24日~26日 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

茂呂 祐利子、原田 卓哉、渡部 剛史  
低出力レーザーによる血管内皮細胞における抗炎症作用 - 活性酸素発現に及ぼす影響 - 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016年3月27日~30日 ビックパレットふくしま(福島県郡山市)

茂呂 祐利子、原田 卓哉、渡部 剛史、鈴木 陽典  
低出力レーザーの抗炎症作用 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会 2014年3月27日~29日 自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

[その他]  
ホームページ等

<http://www.ohu-u.ac.jp/etc/newsletter.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂呂 祐利子 (MORO, Yuriko)  
奥羽大学・歯学部・助教  
研究者番号: 90433549