

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11378

研究課題名(和文) 口腔粘膜への炭酸ガスレーザー照射による創傷治癒促進効果の病理組織学的解明

研究課題名(英文) CO2 laser therapy accelerates the healing of ulcers in the oral mucosa

研究代表者

尾崎 正雄 (OZAKI, MASAO)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：10152472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CO2レーザー照射による創傷治癒の促進メカニズムについて、組織学的解析を行った。その中でもHeat Shock Proteinに着目し、HSP47、HSP70の、組織学的発現パターンと、Real time PCRを用いた遺伝子発現量について検索した。その結果、CO2レーザー照射によって、創部周囲上皮のHSP70の発現上昇が確認され、上皮細胞の活性化した。また間葉組織では、TenascinCの発現が上昇しており、創傷治癒を促進するのに効果的なのではないかと考えられた。そこで、口腔扁平上皮癌と歯根膜線維芽細胞を用いて、細胞培養実験をおこない遺伝子発現の変化を観察したところ同様な結果を得た。

研究成果の概要(英文)：The present study used a mouse model of ulceration to investigate the molecular mechanisms by which CO2 laser therapy accelerated the wound healing process. Immunohistochemistry experiments showed that heat shock protein-70 (HSP70) was expressed mainly in the epithelium of normal palatal tissue, whereas there was little tenascin C (TnC) expression in the epithelium and mesenchyme under normal conditions. Laser irradiation induced HSP70 mRNA and protein expression in the lamina propria as well as TnC expression in the mesenchyme underlying the renewing epithelium. Culture of fibroblasts in heated medium increased the expressions of both TnC and TGF-1, whereas laser irradiation induced only TnC expression. The present study indicates that CO2 laser irradiation exerts a photobiogenic effect to upregulate TnC expression without inducing TGF-1 expression. We suggest that CO2 laser therapy has an advantage over thermal stimulation.

研究分野：小児歯科学

キーワード：CO2 laser Immunohistochemistry Epithelial tissue CO2 laser wound healing tenascin C

1. 研究開始当初の背景

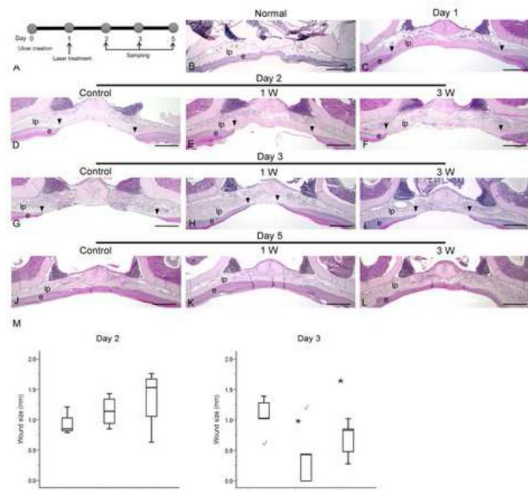
二酸化炭素(CO2)レーザー、多くの外科的処置に広く使用されており、創傷治癒を加速すると報告されている。実際の臨床においても口腔における外傷性かアフター潰瘍のためにCO2 レーザーを照射すると回復の加速や急速に痛みが招待するなど有効な治療法方法となっている。しかしながら、CO2 レーザー照射が創傷治癒を促進するメカニズムは未知のままである。上皮細胞の増殖と移動は間葉の密接に細胞外マトリックスに関連している(ECM)コンポーネントがある。また、ECM タンパク質の生産は組織再生で主要因であることが知られている。そこで我々は、レーザー療法による創傷治癒の加速がTnC(唯一熱運動のためでない HSP70 と TGF 1)の表現における変化に関連していると考えた。

2. 研究の目的

以上の仮説を検証するために我々は TnC(創傷治癒の間の HSP70 と TGF 1)の表現のときに熱刺激と CO2 レーザー照射の効果を比較し、その効果を免疫組織学的および細胞学的検索を目的とした。

3. 研究の方法

我々は、8週間目の雄 ICR ネズミを検体とし、潰瘍モデルを作成し実験に使用した。すべての動物実験は研究者のためのガイドラインに従って、福岡歯科大学研究倫理委員会で承認(許可 No.15006、15016)された。生体内の実験において、CO2 レーザー(Opelaser Pro;株式会社ヨシダ(日本))が、潰瘍作成後 24 時間後に口蓋粘膜の潰瘍周辺地域(約 1mm 潰瘍辺縁を超える部分まで)を、口蓋粘膜の表面から 10mm の距離からレーザー照射を行った。また、潰瘍に CO2 レーザーで照射されていないネズミは対照群として使用された。そして、治癒過程を 1w、3w で免疫染色による比較を行った。創傷治癒の過程は、組織学と免疫組織学を使用することで分析した。傷のサイズは半面の更新皮膚膜の情報と反対側の更新皮膚膜の情報の間の距離として決定した(これらのポイントは矢によって示される)。

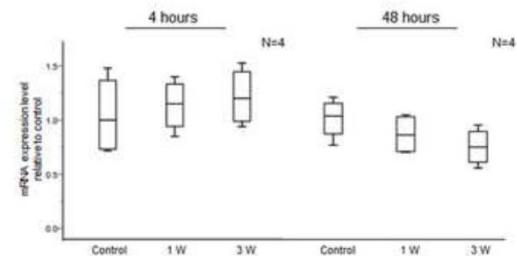
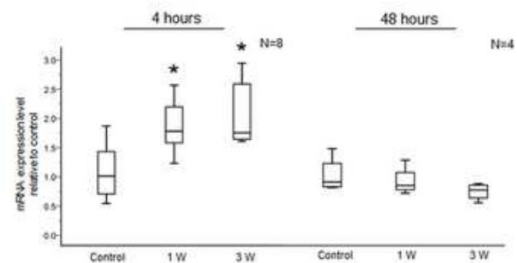
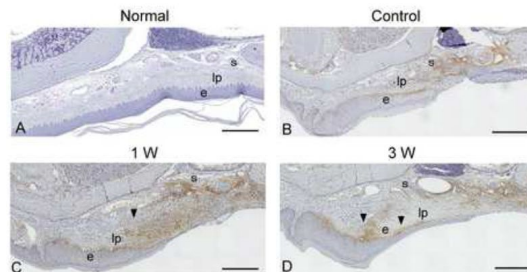


また、細胞活性については、人間の歯周靭帯の細胞培養を用いて、筋肉アクチン(-SMA)、HSP47、HSP70、血小板、および内皮の細胞接着分子-1(PECAM-1)の mRNA 発現、TnC、血管内皮成長因子(VEGF)、コラーゲン I1、periostin(Pstn)、TGF 1、TGF 2、および TGF 3 はリアルタイムの PCR により検索を行った。

4. 研究成果

1) CO2 レーザーによるマウス潰瘍モデルによる治癒促進効果の確認

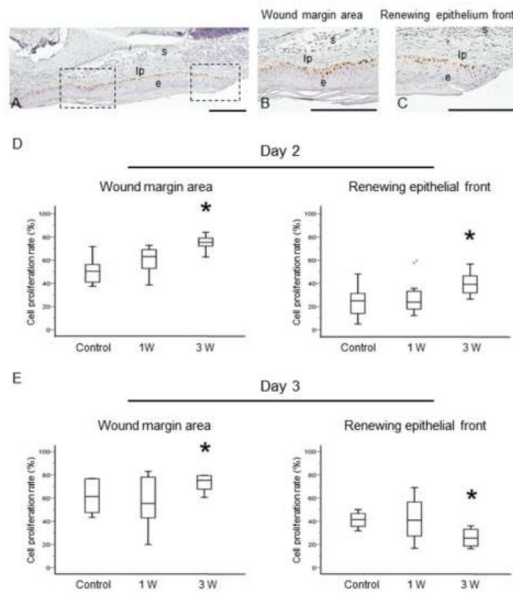
創傷治癒は 2、3、および 5 日目に次に、H&E と共に汚された組織切片で観測された。レーザー照射 2 日目に、傷の上皮の限界の間の距離は 1W のレーザーと、3W レーザーと対照群の間で有意差はなかった。しかしながら、3 日目に、傷のサイズは対照群より 1 つ W のレーザーと 3 つ W のレーザーグループで有意 ($P < 0.05$) に小さかった。



2) 3W CO2 レーザによる照射は上皮細胞増殖を引き起こしました。

皮膚の回復が CO2 レーザー照射で加速されたので、Ki67 の免疫組織化学的染色に基づくセル増殖分析を行った。3W レーザー照射の後の創縁領域の上皮細胞増殖率は 2 と 3 日目の対照群に対して有意 ($P < 0.05$) に高かった。1 W CO2 レーザー照射はコントロールと比べて創

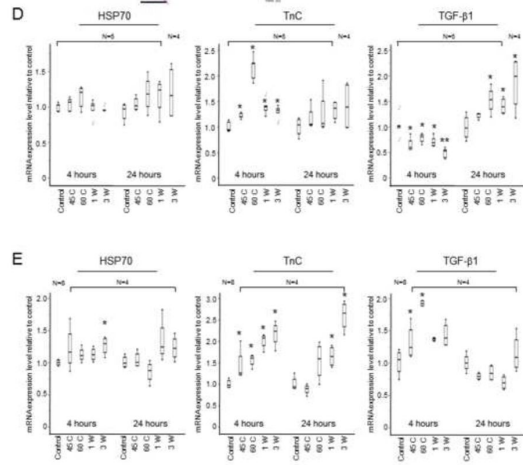
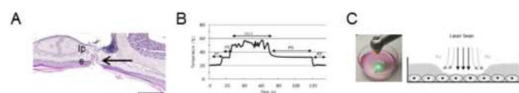
縁か更新の上皮の前部で上皮細胞増殖率に影響していなかった。



3) CO2 レーザー照射は HSP70 と TnC の mRNA 発現を増加させる。

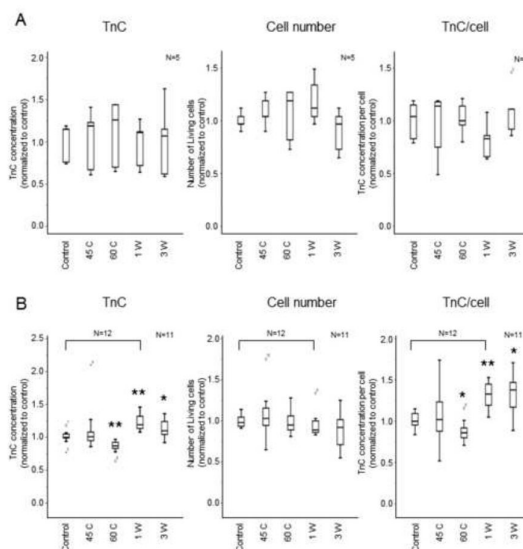
我々は、CO2 レーザー照射により組織学的な変化を検証した。検証項目は、Col-1 の HSP47、HSP70、 α -SMA、PECAM-1、VEGF、TnC、1、Pstn、TGF 1、TGF 2 または TGF- の mRNA 発現で探検した。その結果、1W の CO2 レーザー照射の 4 時間後に、HSP70mRNA 発現が急騰に起こっていたが、他の遺伝子には著しい変化なかった。また、HSP70mRNA 発現は 3W CO2 レーザー照射の 4 時間後に著しく増加しており、PECAM-1、VEGF、および TnC は小さい増加が伴っていた。

しかしながら、3W CO2 レーザー照射の 12 時間後に HSP70 と TnC の mRNA 発現はかなり高いままで残っていました、そして、また、HSP47、VEGF、TGF1、および TGF3 の mRNA 発現のかなりの増加がありました。サイトカインは創傷治癒に関連しているのが知られているが、興味深いことに、レーザー照射の 4 時間後に、TGF サイトカインのどれかの mRNA 発現における変化が全くありませんでした。対照的に、3W レーザー照射の 12 時間後に、TGF1 と TGF3 は正常組織と比べてかなり増加されていた。



4) CO2 レーザー照射は上皮細胞ではなく、培養線維芽細胞の中で TnC を引き起こす。

in vitro の結果は、CO2 レーザー照射が強く線維芽細胞における TnC の表現を引き起こしたのを示していた。さらにこれを調べるために、培地の次のサーマルに CO2 レーザー刺激後の TnC タンパク質の分泌を測定するのにエリサを使用した。サーマルがレーザー刺激が細胞にダメージを与える可能性があったので、生きた細胞の数は各グループで数えられました、そして、TnC タンパク質の発現は生存細胞数に反映されていました。上皮細胞による TnC 分泌は熱刺激か CO2 レーザー照射で影響を受けませんでした。しかしながら、生き残っている線維芽細胞の数に正常にされた TnC 分泌は、1W と 3W CO2 レーザー照射でかなり増加しました。



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 1 件)

Luo Gang, Kyoko Oka, Shirabe Ohki, Mihoko Rikitake, Kayoko Ogata, Shougo Tamura, Masako Toda-Nakamura, Satoshi Itaya, Michiko Kira-Tatsuoka and Masao Ozaki: CO2 laser therapy accelerates the healing of ulcers in the oral mucosa by inducing the expressions of heat shock protein-70 and tenascin C

(投稿中)

〔学会発表〕(計 2 件)

1) Luo Gang, Kyoko Oka, Satoshi Itaya, Shogo Tamura, Kayoko Ogata, Masako Toda, Masao Ozaki: Effect of CO2 Laser on promoting Wound Healing Mucosa of Ulcer in Mice Oral, 第 10 回アジア小児歯科学会 (Pediatric Dentistry Association of Asia: PDAA) および第 54 回日本小児歯科学 会大会, 2016, 東京
2) Luo Gang, 岡 暁子、松尾 聡、熊谷 徹也、栗原 調、尾崎正雄: マウス口内炎モデル・創傷治癒過程における CO2 レーザーの効果、第 23 回日本歯科医学会総会、2016、福岡

〔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

尾崎 正雄 (Masao Ozaki)
福岡歯科大学 口腔歯学部 教授
研究者番号：10152472

(2) 研究分担者

岡 暁子 (Kyouko Oka)
福岡歯科大学 口腔歯学部 准教授
研究者番号：60452778

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()