

令和元年9月1日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18192

研究課題名(和文) ナノレドックス粒子によるアフタ性口内炎に対する抗酸化療法の新規開発

研究課題名(英文) New development of antioxidative therapy for aphthous stomatitis with nanoredox particles

研究代表者

齋田 牧子 (SAITA, MAKIKO)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70612943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種：Reactive oxygen species (ROS) は、過剰に発生すると細胞膜の脂質過酸化を引き起こし、口内炎の病巣にROSが生じていることが報告されている。過剰に発生したROSを効果的に除去させるナノレドックス粒子は、特異的に作用し、正常なミトコンドリア電子伝達系を破壊しない為に副作用が少ないという特長を持つ。我々は、37℃でフラワーミセルが崩壊した後にゲル化し、ROSスカベンジャーとしてニトロキシドラジカルが特異的に作用するレドックスインジェクタブルゲル(RIG)を設計した。そして、アフタ性口内炎モデルに対する抗炎症・抗酸化の効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔粘膜疾患であるアフタ性口内炎の発症経験率は、超高齢社会に伴い今後さらに発症率が増加することが予想される。全身疾患の一部として生じることもあるアフタ性口内炎は、発生機序は明らかとなっておらず、現時点では特効薬は存在しない。本研究は、アフタ性口内炎に対し、抗酸化という新たな視点による治療法を開発することを目的とする。本研究が新規治療法の一躍となれば、予防的治療法の一環としての社会的貢献度は極めて高いと言える。

研究成果の概要(英文)：Excessive generation of reactive oxygen species (ROS) causes lipid peroxidation of the cell membrane. ROS have been reported to occur in stomatitis lesions. Nano redox particles that effectively eliminate excessive ROS exhibit specific actions and have the advantage of causing fewer adverse reactions, as these particles do not destroy the normal mitochondrial electron transport system. We designed a redox-injectable gel (RIG) that gels after collapse of the flower micelle at 37℃ the nitroxide radicals act specifically as ROS scavengers. We then assessed the anti-inflammatory and anti-oxidant effects on an aphthous stomatitis model.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：義歯性潰瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜疾患であるアフタ性口内炎の発症経験率は53%とされ、超高齢社会に伴い今後さらに発症率が増加することが予想される。全身疾患の一部として生じることもあるアフタ性口内炎は、発生機序は明らかとなっておらず、現時点では特效薬は存在しない。アフタ性口内炎が繰り返し生じると再発性アフタとなり、潰瘍化して治癒が困難となる。高齢者においては、栄養補給がさらに困難となり、全身健康状態がさらに悪化してしまうといった悪循環に陥る。このアフタ性口内炎に対する既存の治療法は、刺激を除去して免疫力を向上させたり、軟膏を塗布して回復を待機するのが現状である。この様に、原因が明らかとなっていないことから特效薬が存在せず、対症療法が主流として用いられている。しかしながら、近年、病巣に炎症と密接に関わる活性酸素種 (ROS) が生じていることが明らかとなった (Yoshino et al., 2013, PLOS ONE)1)。そこで、申請者らは、この現症に着目し、副作用を生ぜずに ROS を消去する新しいナノテクノロジーを用いたマテリアルの作製に取り組んできた (Saita et al, 2015, Biomaterials)2)。本研究では、これらの基盤をさらに発展させ、アフタ性口内炎に対する新たな抗酸化療法への新規開発へと挑んだ。

## 2. 研究の目的

本研究は、現在特效薬がないアフタ性口内炎に対して、抗酸化という新たな視点からの治療法を開発することが目的である。申請者らは潰瘍性大腸炎の抗酸化療法に用いられるナノレドック粒子を歯周炎に応用することを目指して、その効果について報告を行ってきた (Saita et al, 2015, Biomaterials)2)。本研究では、対象疾患をさらに広げて、アフタ性口内炎に対する抗酸化療法の可能性を検討する。アフタ性口内炎は、原因及び治療法が確立されていないが、病巣に活性酸素種が生じていることが報告されている。そこでこの現症に着目し、体温下でゲル化し活性酸素種を効果的に消去するナノレドックス粒子を設計し、アフタ性口内炎モデルに対する抗炎症・抗酸化の効果を検証する。この新たな治療方法の開拓は、既存の対症療法とは異なり、真に患者に有用な治療法の基盤創出が期待されると予測した。

過剰に発生した ROS を効果的に消去させるナノレドックス粒子は、特異的に作用し、正常なミトコンドリア電子伝達系を破壊しない為に副作用が少ないという特長を持つ。我々は、37℃ でフラワーミセルが崩壊した後にゲル化し、ROS スカベンジャーとしてニトロキシドラジカルが特異的に作用するレドックスインジェクタブルゲル (RIG) を設計した。本研究では、口内炎モデルに対する RIG の抗酸化作用について検討した。

## 3. 研究の方法

本研究の目的である、アフタ性口内炎モデルに対する抗炎症・抗酸化の効果を評価するため、まず、申請者がこれまで報告してきた抗炎症・抗酸化能を示す材料工学の手法を活かし、口腔内粘膜へ適応させたナノレドックス粒子を作製した。そして、アフタ性口内炎モデルの確立と炎症度合を確実に評価していくことを目標とした。これらの過程を踏まえ、本ナノレドックス粒子のアフタ性口内炎に対する抗炎症・抗酸化の効果について評価した。

(1) ナノドックス粒子の作製（筑波大学 長崎研究室にて作製）

[ 評価 ]

ナノドックス粒子は、37°Cの体温下にて、ゲル化（液体⇒固体）することで、患部への操作性と停滞性の両方を示すことが可能となる。停滞性と抗炎症・抗酸化効果に関連することから、これらの手法を用いて作製したナノドックス粒子の口腔内への停滞性を ESR（電子スピン共鳴法）にて確認した。

(2) ラットアフタ性口内炎モデルの確立

Yoshino (2013, PLOS ONE)1) らの方法を用いて、ラットアフタ性口内炎モデルを作製し、炎症及び酸化の評価を行った。

上記モデルを用いて、ナノドックス粒子によるラットアフタ性口内炎モデルに対する抗炎症・抗酸化の評価を行った。

酸化の評価

アフタ性口内炎周囲の粘膜面の酸化を測定した。

組織切片作製と組織学的評価：炎症・酸化の組織学的評価

凍結切片を作製し、HE 染色を行い、炎症細胞を評価した。

ナノドックス粒子の口内炎に対する効果のメカニズムの解明

< ROS 除去能（抗酸化）評価、抗炎症評価 >

In Vivo

(1) スピントラップ法による ROS の直接的な評価

Minley (J Control Release, 2013) らの方法を用いて、ROS の定量を行った。

ESR の X-band 法を用いて、アフタ性口内炎周囲組織のホモジェナイズされたサンプルより、ROS（ヒドロキシドラジカル、スーパーオキシド等）の測定を行った。

(2) 炎症及び脂質過酸化による評価

ホモジェナイズした組織による炎症及び酸化マーカーの定量測定

MDA（酸化ストレス損傷マーカー）による ROS の定量を行った。

凍結切片による組織評価

ニトロチロシン、HEL（蛋白酸化損傷マーカー）により酸化を評価した。

In Vitro

Ueno (2013, Biomaterials)3) らの方法を用いて、歯肉線維芽細胞のナノドックス粒子における細胞挙動を評価した。

細胞接着・増殖能：細胞増殖試験 (Cell Proliferation Reagent WST-1), Cell count

細胞分化能：アルカリホスファターゼ (ALP) 活性

さらに、細胞培養に過酸化水素等を加えることで、酸化ストレス環境下を再現し、ナノドックス粒子による酸化ストレス除去能を評価した。

#### 4 . 研究成果

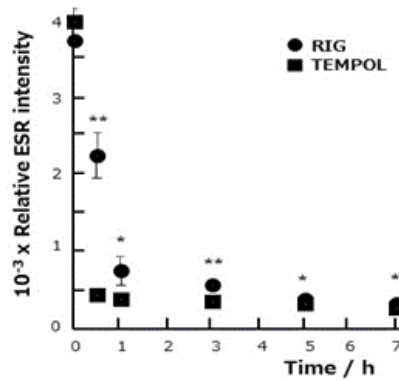


図 . 1 ROS の測定 (停滞性)

まず、ROS 検出により、疾患部位における停滞性を評価した。結果として、ROS の停滞性がコントロール群 (TEMPOL) と比較して、向上していることが確認された (図.1)。次に、吉野らの方法に従い、口内炎モデルを作製し、口内炎周囲の酸化の評価を行った結果、RIG の抗酸化効果が確認された。また、歯肉繊維芽細胞を培養し、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) による酸化状態を再現した。そして、RIG の抗酸化能による細胞接着能・増殖能、ならびに分化能 (アルカリフォスファターゼ活性・染色) の変化を調べた。結果として、接着細胞数、細胞増殖率、アルカリフォスファターゼ活性は、RIG 添加群において増加した。また、アルカリフォスファターゼ染色により、RIG 添加群では石灰化等の分化も有意に促進した。以上の結果から、口内炎モデル及び酸化状態を再現した繊維芽細胞に対する RIG の抗酸化作用が示された。

#### 引用文献

- 1) Yoshino F et al., Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. PLoS One. 2013 Dec 20;8(12):e82834.
- 2) Saita M., et al. Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption. Biomaterials, 2016, 76, 292-301.
- 3) Ueno T et al. N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress. Society For Biomaterials 2011; 99A: 523-531.

Atsuta I et al. Ultrastructural localization of laminin-5 (gamma2 chain) in the rat peri-implant oral mucosa around a titanium-dental implant by immuno-electron microscopy. Biomaterials 2005; 26: 6280-6287.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。