

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17256

研究課題名(和文) 下顎頭軟骨破壊機序の解明とコールドレーザーを応用した変形性顎関節症治療法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of mandibular condylar cartilage destruction mechanism and establishment of treatment method for osteoarthritis of the temporomandibular joint using cold laser

研究代表者

柄 優至 (Tsuka, Yuji)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：50737682

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)：正常ヒト膝関節軟骨細胞を使用した、変形性顎関節症(TMJ-OA)のモデルを用いて、スーパーパルスレーザーの抗炎症作用の検討を行った。結果、IL-1 刺激により軟骨細胞のIL-1、MMP-1、MMP-3の遺伝子発現および蛋白発現が有意に上昇したのに対し、レーザー照射を行うとその発現上昇が有意に減弱した。さらに、IL-1 の添加によりNF- $\kappa$ Bの核内移行が認められたのに対し、レーザー照射群においては核内移行が有意に抑制された。以上のことより、軟骨細胞に対しスーパーパルスレーザーを照射することで、抗炎症作用が確認され、その機序として、IL-1 の下流シグナルであるNF- $\kappa$ Bの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科臨床において、顎関節症を伴う患者に遭遇することがしばしばある。変形性顎関節症(TMJ-OA)は、治療が困難な疾患である。今回の実験から、スーパーパルスレーザー照射が、NF- $\kappa$ B調節を介して、正常なヒト関節軟骨細胞におけるIL-1 誘発炎症を阻害することが確認され、これらの結果は、スーパーレーザー照射がOAの炎症を軽減できる可能性を示している。これは、レーザー照射による作用機序の一部が解明されたとともに、本研究で用いたレーザーは生体組織への熱的損傷がほとんどなく安全性の高いものであり、顎関節の治療においてはTMJ-OAに対する治療の有効性が確立されれば、社会的にもとても意義のあることである。

研究成果の概要(英文)：we aimed to assess the biological effects of high-frequency diode laser irradiation on Interleukin (IL)-1-induced chondrocyte inflammation in an in vitro osteoarthritis (OA) model. Normal Human Articular Chondrocyte-Knee (NHAC-Kn) cells were stimulated with human recombinant IL-1 and irradiated with a laser. Laser irradiation significantly reduced the IL-1-induced expression of IL-1, MMP-1, and MMP-3. Laser irradiation decreased the protein expression levels of inflammatory cytokines in IL-1-treated chondrocytes. Also decreased phosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding activity of NF- $\kappa$ B in IL-1-treated state, but the irradiation alone did not affect NF- $\kappa$ B activity. This mechanism can be considered as the inhibition of NF- $\kappa$ B activity. Laser irradiation might inhibit IL-1-induced inflammation in normal human articular chondrocytes through NF- $\kappa$ B regulation. These results indicate that high-frequency diode laser irradiation can reduce inflammation in OA.

研究分野：矯正歯科

キーワード：顎関節症 ダイオードレーザー 疼痛緩和 変形性顎関節症 コールドレーザー 矯正歯科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

TMJ-OA は関節軟骨の破壊を初期病変とする退行性疾患で、治療が困難な疾患である。

下顎頭の進行性吸収による関節機能障害に加えて、重篤な開咬や顎偏位および顔面変形が引き起こされ、矯正歯科治療をより複雑にすることになる。下顎頭軟骨は表層から線維層、軟骨層、骨層に分けられ、各層が異なる機能を発揮しながら下顎運動により生じる機械的刺激に応答している。また、線維軟骨である下顎頭軟骨は、他の関節における硝子軟骨とは異なり、表層の線維層が層板状構造を呈し、関節軟骨全層に対する線維層の割合が大きいという特徴を有している。これによって、下顎頭軟骨の線維層は、サイトカインや機械的負荷などに抵抗し、下層の骨領域を保護する重要な役割を果たしている。TMJ-OA の初期変化として、下顎頭軟骨線維層の断裂や剥離などの器質的変化が起こり、その結果として関節潤滑機能の低下が生じることが報告されている。そこで、我々は過度な機械的負荷は SZP 産生を低下させ、摩擦係数を増加させるとともに、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -1, 3, 9 の産生を亢進させ、Ⅰ型コラーゲン、アグリカン、ヒアルロン酸 (HA) などの基質破壊を惹起するとして一連の OA 発症機序を明らかにした (Tanne K. Jap Dent Sci Rev, 2008)。

一方、現在の TMJ-OA の治療法としては、関節負荷の軽減を目的としたスプリント療法、理学療法等があるが対処療法であり根本的な改善にはならない。また、変形性膝関節症および肩関節周囲炎には、ヒアルロン酸ナトリウム (NaHA) の関節注入療法などが推奨されている。しかしながら、進行した OA 関節では軟骨組織そのものの修復能力が乏しいため、関節腔内への NaHA 注入療法だけでは、損傷した関節軟骨組織の再生には至らない。患者の負担が少なく、有効な治療法の確立が望まれる。

レーザーは、医療分野に広く応用されており、その有効性が報告されてきた。現在、半導体レーザーは生体親和性が高く、優れた組織浸透性を有するため、関節損傷や骨折の治癒促進等に用いられている。近年、パルス幅を短縮化し、スーパーパルスとすることで生体組織への熱的ダメージを最小限に、かつ深部到達性を高める様に設計された半導体レーザー (コールドレーザー) の臨床応用が進み、平成 27 年に、医科領域において、新規に保険適用された。さらに、歯科臨床において、顎関節症の理学療法や疼痛緩和を目的とした臨床応用が試みられている (Manfredini D *et al.*, Cranio. 2017)。しかしながら、実際に生体内でどのような機序で疼痛緩和が生ずるかは、立証されておらず、科学的根拠に基づいた治療 (Evidence-Based-Medicine; EBM) とは言えない。TMJ-OA においては、軟骨細胞などに炎症性サイトカインである COX-2 の発現が認められる。COX-2 はプロスタグランジン E2 の発現を誘導し、疼痛や炎症を増長させる。もし、コールドレーザーを適用することにより、COX-2 の発現が抑制されれば、関節軟骨における COX-2 の発現を抑制し、プロスタグランジン E2 の産生抑制に働くことにより、プロスタグランジン E2 誘導性のマトリックスプロテアーゼ (MMPs) の産生を抑制し、軟骨基質破壊を直接抑制する効果も推察される。さらに、TMJ-OA は下顎頭表層で治癒反応が生じており、ここにレーザー照射による治癒促進の効果も期待され、新たな治療法になることを期待した。

## 2. 研究の目的

歯科臨床において、変形性顎関節症 (TMJ-OA) を伴う患者に遭遇する。顎関節症の治療法は主に对症療法であり、患者の負担が少なく、有効な治療法の確立が急務である。

近年、レーザーは医療分野に広く応用されており、特に半導体レーザーは優れた組織浸透性を有するため、関節炎や骨折の治癒促進等に用いられている。関節炎や骨折へのレーザー治療は、生体内でどのような作用機序で治癒促進されるかは立証されておらず、臨床が先行し、科学的根

拠に基づいた治療 (Evidence-Based-Medecine; EBM) には至っていない。

今回、従来よりもパルス幅を短縮化することにより、生体組織への熱的損傷を最小限にし、かつ深部到達性を高めたコールドレーザーを用いて、顎関節軟骨破壊機序に対するコールドレーザーの影響を検討するとともに、下顎頭軟骨細胞の基質代謝に及ぼす影響とその作用機序を解明する。さらに、TMJ-OA に対する新規治療法を確立することを最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養下顎頭軟骨細胞の基質代謝に対する半導体レーザー照射の影響

ヒト膝関節関連細胞を用いて以下の検討を行う。なお、スーパーパルス半導体レーザーとして、Lumix 2 (USA Laser Biotech Inc)を使用する。各培養細胞に対し、半導体レーザー照射による軟骨代謝マーカー (アグリカン、Ⅱ型コラーゲン、Sox-2 など) の発現レベルについて定量 PCR を用いた遺伝子解析および定量 Western blot 解析を行う。

#### (2) 機械的刺激および炎症性サイトカイン添加時におけるレーザー照射の影響

正常なヒト膝関節関連細胞を培養し、培養細胞圧縮装置 (Flexercell Compression Plus Unit)を用いて機械的圧縮刺激を負荷する。機械的圧縮刺激の負荷条件は、我々のこれまでの研究結果より、15 -20 kPa、毎分 30 サイクルとする。また、機械的刺激の負荷開始時期についても併せて検討を行うため、機械的刺激を培養開始 2 および 5 日目から開始し、24 時間負荷する。また、過度な機械的刺激下における軟骨細胞に対して、レーザー照射を行い、軟骨形成関連マーカーおよび炎症性サイトカインである COX-2、MMP1, 3, 9、プロスタグランジンの発現について定量 PCR 解析および定量 Western blot 解析を行う。さらに、IL-1 および TGF- $\beta$  などの添加時において、レーザー照射が基質代謝や炎症性サイトカインにどのような影響を及ぼすか、同様の検討を行う。

#### (3) 動物実験による検討

成長期および成長終了後のラットを用いて、浸潤麻酔下において下顎頭を切断し、TMJ-OA モデルを作製する (Fujita T *et al.*, J Period Res, 2010)。なお、右側をレーザー照射群、左側を対照群とする。下顎頭切断後、レーザー照射を毎日行い、経時的に現有のマイクロ CT を用いて、下顎頭を含めた顎関節形態の変化について経日的に三次元解析を行う。また、ラットを灌流固定し、摘出・脱灰した後、パラフィン包埋し、組織切片を作製する。HE 染色を行うとともに、Ⅱ型コラーゲン、アグリカン、IL-1、TNF- $\alpha$ 、COX-2 および PGE2 の免疫組織化学染色を用いて評価する。

#### (4) 中枢での TMJ-OA モデルへのレーザー照射時の疼痛緩和の検討

(3) で屠殺後に、中脳路核や三叉神経節部を凍結させる。その後、マイクロトームにて連続凍結切片を作製し、免疫染色ならびに蛍光免疫染色を行い、反応部位におけるマイクログリア、アストロサイト及びそれぞれの神経ペプチドや c-fos 蛋白の局在を評価し、コールドレーザー照射が、痛みの下行抑制系に及ぼす影響について評価する。

### 4. 研究成果

ヒト初代培養軟骨細胞 (NHAC-Kn) に IL-1 刺激により In Vitro における炎症モデルを作成した。軟骨細胞の IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-1、MMP-3 の遺伝子発現が有意に上昇したのに対し、スーパーパルスレーザー照射を行うとその発現上昇が有意に減弱した。また MMP-1、MMP-3、および IL-1 の蛋白発現においても IL-1 刺激により有意に発現レベルが上昇したのに対し、スー

パーパルスレーザー照射を行うと、発現上昇が有意に減弱した。IL-1 の下流シグナルである NF- $\kappa$ B のリン酸化は、スーパーパルスレーザー照射により減弱した。蛍光免疫染色にて細胞内の NF- $\kappa$ B の局在を検出したところ、IL-1 の添加により NF- $\kappa$ B の核内移行が認められたのに対し、スーパーパルスレーザーを照射した群においては核内移行が有意に抑制されていた。スーパーパルスレーザーの照射は IL-1 刺激により誘導される軟骨細胞炎症を減弱することが示唆された。またその機序として、IL-1 の下流シグナルである NF- $\kappa$ B の活性化の抑制が考えられた。以上の結果より、軟骨細胞に対するスーパーパルスレーザーの抗炎症作用が認められ、顎関節症については変形性顎関節症に対する有用な治療法となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Nakajima K, Kimura A, Hiraki T, Nakatani A, Tanimoto K                                      | 4. 巻<br>34 (1)      |
| 2. 論文標題<br>Effects of Nd:YAG low level laser irradiation on cultured human osteoblasts migration and ATP production: in vitro study. | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Lasers in Medical Science  | 6. 最初と最後の頁<br>55-60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10103-018-2586-6. Epub 2018 Jul 12.   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-           |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Nakajima K, Hiraki T, Nakatani A, Tanimoto K                   | 4. 巻<br>28;61(1)    |
| 2. 論文標題<br>Molecular biological and histological effects of Er:YAG laser irradiation on tooth movement. | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>Janal of oral science   | 6. 最初と最後の頁<br>67-72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2334/josnusd.17-0472. Epub 2019 Feb 1.                                   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sakata Shuzo, Kunimatsu Ryo, Tsuka Yuji, Nakatani Ayaka, Hiraki Tomoka, Gunji Hidemi, Hirose Naoto, Yanoshita Makoto, Putranti Nurul Aisyah Rizky, Tanimoto Kotaro              | 4. 巻<br>9               |
| 2. 論文標題<br>High-Frequency Near-Infrared Diode Laser Irradiation Attenuates IL-1 -Induced Expression of Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases in Human Primary Chondrocytes | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Medicine  | 6. 最初と最後の頁<br>881 ~ 881 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/jcm9030881  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yuji Tsuka, Ryo Kunimatsu, Hidemi Gunji, Abe Takaharu, Cynthia Concepcion Medina, Kengo Nakajima, Aya Kimura, Tomoka Hiraki, Ayaka Nakatani, Kotaro Tanimoto |
| 2. 発表標題<br>Effect of Nd:YAG laser irradiation and Mechanical force on osteoblast-like cells.  |
| 3. 学会等名<br>2018 Taiwan International Orthodontic Forum (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|