

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792376

研究課題名(和文) ナノバブルを用いた新しい顎関節内遺伝子導入療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new gene transfer therapy using nanobubbles in temporomandibular joint

研究代表者

土生 学 (HABU, MANABU)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00360058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：慢性顎関節炎は、慢性炎症が顎関節に持続することにより骨軟骨が変化し、痛みと開口障害という症状が持続する疾患です。この疾患に対する治療は、現在対症療法に終始しています。申請者らは慢性炎症を抑制するタンパク質を発現する遺伝子を顎関節腔内に直接導入することで、持続的に炎症を抑える方法の確立を目指しています。今回の研究では、顎関節組織に対して治療用遺伝子導入の可能性を検証しました。方法は、ナノバブルという小さな殻に遺伝子を詰め込み、超音波を当てることによって効率よく組織に遺伝子を導入するというものです。結果として治療に適する量の遺伝子導入が確認されました。今後は、動物実験にて効果を検証する予定です。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation in the temporomandibular joint alters bone and cartilage, which gives patients long term pain and trismus. Only symptomatic treatments are currently available for this dysfunction. We aim to establish a method for long term reduction in inflammation, by directly delivering a gene which produces an inflammation reducing protein in the temporomandibular joint. In this study, we investigated the possibility of a therapeutic gene application for temporomandibular joint tissues. As the method, the gene is placed in a nano-bubble, a very small shell, and then ultrasound is applied in order for efficient gene delivery to the tissues. The results show a sufficient amount of gene delivery for treatment. We plan to evaluate the effect of the method by testing in animals.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：超音波遺伝子導入 ナノバブル 慢性顎関節炎 抗サイトカイン療法 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

近年の遺伝子工学の進歩により、遺伝子導入による難治性疾患の治療の試みは癌治療を中心に広く行われている。それら遺伝子の導入方法としては導入効率の安定性の面からウイルスを媒体とする方法が最も普及しているが、ウイルスによる未知の有害作用など安全性の面で未だ明らかでない点も多く、非悪性疾患の治療では非ウイルスベクター法が適している。申請者は難治性慢性顎関節炎の治療のために抗炎症性サイトカイン抗体遺伝子を非ウイルスベクター法で導入する方法を検討している。実際、平成 16,17,18 年度の科学研究費(若手研究 B)でエレクトロポレーション法を用いた遺伝子導入法を検討した結果、一定の抗炎症性サイトカイン(抗 TNF-)抗体の導入効果をあげ、ウサギ慢性顎関節炎モデルに対する抗炎症作用があることを明らかにした。しかし、それほど大きくない電力とはいえ、比較的高い電圧を局所にかけるためその刺激も大きく、特に脳に近い部位に存在する顎関節にこの方法を応用するのは臨床的に解決し難い部分が多いことも併せて明らかになった。そこで、より副作用が少なく遺伝子が導入できる方法として超音波による遺伝子導入法に着目し、平成 19,20,21 年度の科学研究費(若手研究 B)で In vitro の実験系で滑膜細胞 HIG-82 細胞に抗炎症性サイトカイン遺伝子 pCI-anti-TNF を導入したところ、滑膜細胞の炎症反応が導入群では抑制された。さらに遺伝子の運搬体に超音波造影剤であるマイクロバブルを併用することで導入効率の増強を認めた。しかしながら顎関節炎モデルを用いた In vivo の実験系では、顎関節腔内での抗炎症性サイトカインの発現は確認されたものの、その濃度は有効濃度に達せず十分な治療効果を得ることができなかった。原因を調査したところ、遺伝子導入された細胞は主に顎関節滑膜細胞であったが、遺伝子の発現は極めて表面に限定的であった。これは遺伝子の運搬体であるマイクロバブル(直径 2-4.5  $\mu\text{m}$ )の直径が大きく組織深部に到達できなかったことが考察された。そこで遺伝子の運搬体により直径の小さい超音波造影ガスを封入した新規リポソーム(400~500 nm)を応用することで深部組織への導入効率を増強することを計画し、今回の研究の構想に至った。リポソームに超音波造影ガスを封入した 1  $\mu\text{m}$  以下の新規リポソーム(ナノバブルリポソーム)は、その内部に薬剤や遺伝子などを封入することができ、超音波照射によるバブルの圧壊で生じるジェット流により細胞に一過性の小孔が生じ、細

胞内に遺伝子が導入される DDS (Drug Delivery System) として使われている。またポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームを用いて標的細胞表面に過剰発現している受容体を認識する抗体を付与することもできる。これらのバブルを用いれば、ターゲットとなる組織にバブルを集積させ、より効率よく薬剤および遺伝子を導入することができる。

本申請では、このナノバブルと超音波照射を用い、導入効率が不十分であった In vivo の実験系に応用し、慢性顎関節炎治療のモデルとする予定である。この研究により慢性顎関節炎に対する抗サイトカイン治療の可能性を切り開き、対症療法に終始している現在の難治性の慢性顎関節炎に対しての関節洗浄療法や関節鏡視下手術時に炎症の強い局所に集中的に目的とする遺伝子を導入するという治療が可能となり、この領域の患者に安全で副作用の少ない新しい遺伝子治療を提供できる可能性が大きいと考えられた。

## 2. 研究の目的

申請者は難治性慢性顎関節炎の治療のために抗炎症性サイトカイン遺伝子を顎関節局所に超音波遺伝子導入法を用いて直接導入する方法を検討している。しかしながらその導入効率の点に大きな問題があり、in vivo の実験系では治療に有効なタンパク濃度を得ることができなかった。これは、遺伝子の運搬体であるマイクロバブル(直径 2-4.5  $\mu\text{m}$ )の直径が大きく組織深部に到達できなかったことが分かった。そこで遺伝子の運搬体により直径の小さい超音波造影ガスを封入した新規リポソーム(400~500 nm)を応用し、深部組織への導入効率を増強することで、慢性顎関節炎治療に有効なタンパク濃度の発現を目指す。

## 3. 研究の方法

In vitro にて導入効率を検討するために確認遺伝子 pVIVO1-GFP/LacZ をナノバブルおよびマイクロバブルを併用し、超音波発信装置(Sonitron2000)を用いて HIG82 細胞に導入後、導入効率を X-gal 染色およびフローサイトメーターにて確認する。

次に実際に GFP プラスミドを付与した抗炎症性サイトカイン発現遺伝子(pCI-anti-TNF)をナノバブルおよびマイクロバブル併用にて HIG82 細胞に導入後、蛍光光度計および免疫組織化学染色にて細胞への導入効率および ELISA 法にて anti-TNF タンパク質発現量を確認する。

in vivo においてウサギ顎関節に対し

て GFP プラスミドを付与した抗炎症性サイトカイン発現遺伝子(pCI-anti-TNF)をナノバブルおよびマイクロバブル併用し顎関節腔に注入後、超音波発信装置(Sonitron2000)を用いて経皮的に遺伝子導入を行い、免疫組織化学的染色にて細胞への導入効率およびマイクロダイアリーシスプローブにて顎関節滑液を採取し、ELISA 法にて anti-TNF タンパク質発現量を確認する。

#### 4. 研究成果

マイクロバブル併用群に比べて2倍以上の遺伝子導入細胞が確認された。

タンパク質発現量においてもマイクロバブル群に比べて2.5倍以上の発現が確認できた。

滑膜の深部細胞まで多層的な遺伝子導入が確認できた。また、顎関節軟骨の表層細胞にも導入が確認できた。顎関節滑液中のタンパク質発現量においては、マイクロバブル群に比べてナノバブル群は3倍以上の発現を認めた。

以上の結果によりナノバブル併用による顎関節への超音波遺伝子導入は、マイクロバブル併用よりも効率的であることが判明した。今後はさらに実際の抗炎症作用を検討すべく、われわれが開発した疾患モデルであるウサギ顎関節炎モデルに対して同様に遺伝子導入を行い、効果を確認予定である。

実際予備実験においては、炎症初期における炎症細胞の浸潤などの抑制が病理組織学的に確認された。しかし一定の効果は認められるものの、完全な炎症の抑制には至っていない傾向にあった。今後はさらに経時的な抗炎症性サイトカインタンパク質発現などをモニターしながら実験個体数を増やして検討を行う予定としている。

現在のところ顎関節滑液における抗TNFタンパク質発現量としては、抗TNF

直接投与による治療モデルの実験において最も効果のあったタンパク量(1.04×10<sup>5</sup>mol/ml)には及ばないものの、今回の検討で0.6-0.8×10<sup>5</sup>mol/mlの発現量が確認されており経時的な持続発現が確認できれば、効果はさらに上がると考えている。

さらに導入効率を上げる方法の検討も必要と考えており、その一例として、ナノバブル表面に標的細胞抗体を接着させることにより、ナノバブルが遺伝子導入標的細胞に効率的に密着させ、遺伝子導入高率を上げる方法なども検討してゆく予定である。

#### 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)

Ohtani,T.,Habu,M., Khanal,A., Yoshioka,I.,Matsukawa,A.and Tominaga,K : Local effects of intra-articular injection of anti-rabbit tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. J Oral Pathol Med. 41, 96-105, 2011.

〔学会発表〕(計 2件)

土生学 富永和宏 大谷泰志 福田仁一:抗原誘発顎関節滑膜炎に対する抗炎症性サイトカイン治療の検討 第56回日本口腔外科学会総会. 2011 Habu,M.,Tominaga,K.,Kodama,M. and Fukuda,J : The sclerotherapy treatment of venous malformation of the upper lip with ethanolamine oleate. ACOMS 2012

土生学 富永和宏 國領真也 永尾史徳 吉岡泉:抗炎症性サイトカインIL-1ra 局所投与による慢性顎関節炎治療モデルの検討. 第26回日本顎関節学会総会. 2013

〔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

土生学 (実験・総括)

研究者番号： 00360058

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：