

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

藤村 岳樹

論文題目

半導体レーザーの低出力照射が
口腔上皮細胞に与える影響

I. 緒言

Photodynamic therapy (PDT) は腫瘍細胞への特異的な集積性をもつ光感受性物質とレーザー照射を用いた癌治療の一つである。光感受性物質は最大吸収波長の光により励起され、一重項酸素を発生させる。PDT はこの一重項酸素のもつ細胞障害性により特異的に癌細胞を破壊するものである。また、細菌を標的とした PDT は antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) と呼ばれ、正常組織に影響を与えることなく病原性細菌を破壊する新しい手法であり、歯周病治療においても有効であることが示唆されている。他方、近年になり、著者らは最大吸収波長を 800nm にもつ光感受性物質であるインドシアニングリーン (ICG) に着目し、これを封入したナノ粒子を開発し、aPDT に関する基礎的研究を行ってきた。

近年、developmental endothelial locus-1 (Del-1) が interleukin-17 (IL-17) による炎症性歯槽骨破壊を抑制することが報告され、Del-1 が IL-17 関連の免疫応答で大きな役割を担っていることが示唆された。

また、上皮細胞由来の炎症性サイトカインである IL-6 と IL-8 は歯周病の発症と進行に関与していることが知られている。さらに、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) は好中球の血管内皮細胞への接着においてだけでなく、創傷治癒においても重要な役割を担う事が知られている。

本研究では ICG ナノ粒子を併用した低出力の半導体レーザー照射もしくは、低出力半導体レーザー照射単独の口腔上皮細胞への影響を検討するこ

とを目的とし、ヒト口腔上皮細胞株による基礎的研究を行った。

II. 材料および方法

1. 光感受性物質

ポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) を基剤とし、光感受性物質としての ICG を封入したナノ粒子を油中エマルジョン溶媒拡散法により調製した。さらに調製後の ICG 封入 PLGA ナノ粒子表面をキトサンで表面修飾した。調製後のナノ粒子は平均粒子径 560nm であった。ICG 封入ナノ粒子の使用濃度は 10mg/ml に調製して使用した。

2. ICG 封入ナノ粒子の組織への到達

被験者は愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科に来科し、本研究(愛知学院大学歯学部倫理委員会 承認番号 134)の主旨を理解し、協力に同意の得られた8名とした。

局所麻酔後、歯周ポケット内へ ICG 封入ナノ粒子を注入し、1分経過した後歯肉を切開し歯肉サンプルを得た。得られた歯肉サンプルは川本法(凍結切片作成法)に従い専用の包埋剤で包埋し、Cryostat を用いて厚さ 5 μ m の連続組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った後、光学顕微鏡で観察した。

3. 細胞培養

ヒト口腔上皮細胞株である Ca9-22 および SCC-25 を用いた。

Ca9-22 を 12well プレート上に播種し、培養開始より 24 時間の時点で interferon- γ (1,000IU/mL) で前処理を行った。さらに 24 時間後に Escherichia coli 由来の lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/mL) にて刺激した。LPS 刺激より 1 時間後に半導体レーザー照射を行い、その 2 時間後に qPCR に用いる細胞の回収、24 時間後にフローサイトメーターに用いる細胞の回収をそれぞれ行った。

SCC-25 は 6well プレートに播種し、wound healing assay に用いた。

4. 半導体レーザー

レーザーおよび照射条件は、これまでの基礎的研究と同様に行った。すなわち、使用した半導体レーザー (P-LASER[®]、パナソニック、大阪) は、中心波長 805 \pm 20nm であり、照射モードは繰り返しパルス照射モード (デューティ比: 10%、パルス幅: 100ms、ピーク出力: 5W) に設定し、照射距離 1 cm で照射時間は 60 秒間とした。

5. 定量的 Real-Time PCR 法 (qPCR)

Ca9-22 の TotalRNA を抽出し、通法に従い qPCR を行った。内在性コントロールとして 18S rRNA 特異的プローブ、プライマーを用い、De1-1、IL-

8 および IL-6 の遺伝子発現について $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて検討した。

6. フローサイトメトリー

Ca9-22 上の ICAM-1 発現の確認は、FACS Calibur を用いて行った。細胞を回収し、Phycoerythrin 標識抗ヒト ICAM-1 抗体により 4°C で 30 分反応させたのち解析を行った。

7. Wound healing assay

SCC-25 を 6 well プレートでサブコンフルエントになるまで培養し、直径 1.2 mm のピペットチップ先端にて細胞を剥離した。さらに ICG 封入ナノ粒子の添加と半導体レーザーの照射を行った後に培養した。培養開始時および培養後 48 時間の剥離部の閉鎖状態を画像解析ソフト Image J を用いて解析した。

8. 統計学的解析

統計学的解析には統計解析ソフト SPSS を用いた。one-way ANOVA (Bonferroni correction) を用いて検討し、危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. ICG 封入ナノ粒子の組織への到達

ICG 封入ナノ粒子は上皮組織の深層や結合組織には到達しておらず、上皮組織の表層においてのみ観察された。この結果より ICG ナノ粒子と半導体レーザー照射の併用による aPDT 効果は歯周ポケット内および歯肉上皮組織表層に限定されると考えられた。また、ICG 封入ナノ粒子の到達していない歯肉上皮組織においては半導体レーザー照射単独の影響がみられる可能性が示唆された。

2. 上皮細胞に対する aPDT および半導体レーザー照射の影響

aPDT 施術が歯周ポケットを含む上皮細胞の炎症反応に影響を与えるかどうか検討するために、炎症関連遺伝子発現の解析を行った。

炎症性サイトカインである IL-17 発現を抑制する抗炎症物質であると考えられている Del-1 mRNA 発現は、半導体レーザー照射群においてコントロール群と比較して有意に増強していた ($p < 0.01$)。また、LPS 刺激群においても同様に Del-1 mRNA 発現は増強していた。次に炎症性サイトカインである IL-6 および IL-8 について検討した。IL-6、8 ともに LPS 刺激群においてコントロール群と比較して有意な mRNA 発現の上昇を認めた。また LPS 刺激により上昇した IL-6、8 の mRNA 発現は半導体レーザー照射を行った群において有意に減少していた ($p < 0.01$)。

本研究では ICAM-1 を創傷治癒のマーカーとして用い、LPS で刺激した上

皮細胞への半導体レーザー照射により ICAM-1 発現がどう変化するかを検討した。すべての実験群においてコントロール群と比較して有意な ICAM-1 発現の上昇が認められた ($p < 0.01$)。さらに、LPS 刺激+レーザー照射群では LPS 刺激群と比べ ICAM-1 の発現が約3倍増強していた。

aPDT 施術後の上皮組織における創傷治癒を検討するため、SCC-25 を用い wound healing assay を行った。細胞剥離部位が遊走、増殖した後に閉鎖された割合では、コントロール群と比較してレーザー照射群および aPDT 群において有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。

IV. 考察

今回の研究で、口腔上皮細胞に対する低出力の半導体レーザー照射により Del-1 mRNA および ICAM-1 の発現が上昇すること、LPS 刺激により誘導された IL-6 および IL-8 mRNA 発現が抑制されることが示唆された。口腔上皮細胞で低出力の半導体レーザー照射により Del-1 mRNA 発現が上昇したことは、aPDT 施術後の歯周組織においても Del-1 発現の上昇に伴い、IL-17 関連の炎症反応が抑制される可能性を示唆している。また、本研究では、IL-6 および IL-8 mRNA 発現が低出力の半導体レーザー照射により抑制されることを明らかにしており、この結果は Low-level laser therapy (LLLT) により IL-1、6、8 や TNF- α 発現が抑制されるという Iocono らや Braham らの報告と合致している。これらの報告と今回の結果をふまえると、低出

力の半導体レーザー照射は過度な炎症の抑制と創傷治癒の促進に寄与する可能性が考えられる。

また、今回の研究の結果より、ICG 封入ナノ粒子が到達していない歯肉上皮組織の深層では半導体レーザー照射のみによる創傷治癒という面で有利な効果が得られることが考えられる。創傷治癒の促進に関しては、LLLT が線維芽細胞の増殖を促進することや、ラットの創傷治癒を促進することが知られている。また、Nagaoka らは ICAM-1 ノックアウトマウスにおいて創傷治癒が遅延することを報告している。今回の研究では、半導体レーザー照射を行った口腔上皮細胞において ICAM-1 発現の上昇が認められた。ICAM-1 は創傷治癒においても重要な役割を担っている可能性があり、aPDT 施術により歯肉上皮組織は創傷治癒の促進という効果も得られる可能性を示唆している。

V. まとめ

本研究では、ICG 封入ナノ粒子を応用した aPDT により、口腔上皮細胞内において IL-6 および IL-8 発現の抑制、De1-1 および ICAM-1 発現の促進、口腔上皮細胞の遊走と増殖の促進が生じる可能性が示唆された。この結果より、ICG ナノ粒子を応用した aPDT はこれまでに報告した歯周病関連細菌に対する殺菌能に加え、過度な炎症の抑制や創傷治癒を促進する効果が得られることが期待される。本研究により、ICG 封入ナノ粒子を応用した aPDT

(論文内容の要旨)

No.8.....

愛知学院大学

は新しい歯周病治療として有用である可能性が示唆された。

平成26年 1月15日