

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20409

研究課題名(和文)NF- κ B阻害因子MTI- を用いた炎症制御による歯髄・根尖歯周組織再生法の開発研究課題名(英文)Development of pulp and hard tissue regeneration by the novel NF- κ B inhibitor, MTI-II.

研究代表者

土屋 志津(Tsuchiya, Shizu)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：60610053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗炎症作用を有するMacromolecular Translocation Inhibitor (MTI-) (J Biol Chem, 2005)に着目し、歯髄・根尖歯周組織の効果的な再生を誘導するための炎症制御因子として応用し、炎症抑制・組織誘導を同時に行う再生療法の開発を行っている。MTI- が炎症の伝達経路であるNF- κ Bシグナルを直接抑制すること(Endocrinology, 2016)、MTI- とMTI- 酸性アミノ酸領域を利用したペプチド(MPAID)がTNF 刺激による象牙芽細胞様細胞の石灰化抑制を解除することを明らかにした(J Cell Biochem, 2016)。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that the inflammatory cytokine, tumor necrosis factor (TNF) inhibits BMP-induced osteoblast differentiation via NF- κ B signaling. In the present study, we examined the effects of a steroid-coactivator, Macromolecular Translocation Inhibitor II (MTI-II), on inflammatory responses(Endocrinology, 2016). MTI-II was previously demonstrated as an enhancer of the transcriptional activity of glucocorticoid-bound glucocorticoid receptor. We examined the effects of MTI-II on the inhibition of odontoblastogenesis by TNF . When the cells were treated with TNF , ALP activity was inhibited, while MTI-II restored TNF -mediated inhibition of the activity in a dose-dependent manner (J Cell Biochem, 2016). MTI-II potentially acts as an anti-inflammatory drug.

研究分野：歯内治療学

キーワード：炎症 硬組織

1. 研究開始当初の背景

現代歯科医療の目標は、多くの国民が生涯自分の歯で食事できるよう歯を保存することで口腔環境の健全化を図り、国民の QOL を維持・向上することにある。

近年の歯内治療は、歯科用顕微鏡やコーンビーム CT といった機器の登場により、今まで見えなかったものが視覚化されるようになり、治療の精度が高まっている。しかしながら、歯髄炎や根尖性歯周炎に対する治療法の原理は変わっておらず、象牙質や根管内に存在する感染源を可及的に除去した後は、貼薬剤を用いるものの、基本的には生体の自然治癒を待つという従来型治療法が依然として続いている。根尖性歯周炎が難治化する要因として特定細菌の関与が示唆されているが、細菌の検出されない難治症例や難治性歯根膜炎も多く存在する。これらの難治症例に対応するため、今後の歯内治療は器材のさらなる進化に加えて、生体の治癒に委ねる受動的治療から、積極的に治癒を誘導する能動的治療へと変革する必要がある。そこでこれまでに注目されている感染制御と再生療法技術に加え、「慢性炎症制御」が重要となる。

これまでに私は、慢性炎症の場では BMP による骨形成誘導効果が低いという報告から、炎症反応時の主たるシグナル伝達経路である NF- κ B シグナルと BMP シグナルの相互作用に着目し、NF- κ B シグナルの選択的阻害剤である BAY11-7082 を用いて NF- κ B サブユニットと Smad との相互作用を明らかにした (Mol Endocrinol, 2014)。

2. 研究の目的

「慢性炎症制御による硬組織再生誘導」という視点から、ステロイド剤と同等に NF- κ B シグナルの活性を抑制することで抗炎症作用を有するステロイドコアクチベーター Macromolecular Translocation Inhibitor (MTI-) に着目した。聖マリアンナ医科大

学の岡本らの報告によると MTI- は、直接的に NF- κ B シグナルの転写活性を抑制する。また、MTI- だけでは転写因子として働かないため、ステロイド剤のような副作用が少ない。そこで私は、歯髄・根尖歯周組織の効果的な再生を誘導するための炎症制御因子として MTI- を応用できないかと着想するに至った。本研究では MTI- を用い、炎症抑制・硬組織誘導の両者を同時に行う再生療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

in vitro 実験系において、象牙芽細胞様細胞および骨芽細胞に対する MTI- の影響を検討する。セルライン化された細胞において MTI- の抗炎症効果が確認できない場合は、ラットあるいはマウスから初代培養細胞を採取し MTI- の効果を検証する。

(1) MTI- 融合タンパク質の精製と MTI- を恒常的に発現する細胞の樹立

MTI- は低タンパク質であるため、そのままでは細胞内に取り込まれない。そこで、共同研究者である岡本らが作成した MTI- の N 末端側に 11 個のアルギニンから成るタンパク質細胞内導入配列を付与した融合タンパク質を大腸菌内で発現させ、タンパク精製を行う。ただしタンパク質の精製には時間と費用がかかることが予想されるため、これと同時に、MTI- 発現ベクターを使用し、象牙芽細胞様細胞および骨芽細胞内で MTI- を恒常的に発現する細胞の樹立を行い、以後の実験にて使用する。

(2) MTI- による抗炎症効果の検討

TNF α 刺激で炎症応答を誘導した象牙芽細胞様細胞および骨芽細胞を MTI- 存在・非存在下で一定時間培養後、位相差顕微鏡下で形態変化の観察を行うと共に、WST-8 assay により細胞増殖能について検討する。また、

real-time PCR 法、Western Blotting 法で NF- κ B の標的遺伝子である Interleukin-6,8 (IL-6,8) または Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を確認する。

(3) MTI-1 による石灰化能への影響の検討
石灰化能を誘導した細胞を TNF で刺激し、MTI-1 存在・非存在下で一定時間培養した際の各細胞の細胞増殖能、および石灰化能への影響を細胞形態観察、WST-8 assay、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定、real-time PCR 法、および Western Blotting 法で検討する。

4. 研究成果

TNF α で象牙芽細胞を刺激すると、細胞増殖能に影響することなく ALP 活性が抑制されるとともに、NF- κ B の転写活性が亢進した。次に、象牙芽細胞に MTI-II 発現プラスミドを導入し MTI-II を過剰発現させると、TNF α あるいは NF- κ B のサブユニットである p65 によって誘導された NF- κ B 転写活性の亢進が抑制された。一方、MTI-II の過剰発現は TNF α による I κ B α の分解や p65 の核移行を阻害しなかった。MTI-II と同様に、細胞内導入配列を付与して化学合成した MTI-II ペプチド抗炎症薬 ; MTI-II Peptide Anti-Inflammatory Drug (MPAID) は TNF α による NF- κ B 転写活性の亢進を抑制するとともに、NF- κ B の標的遺伝子である IL-6 および -8 の mRNA 発現を抑制した。さらに、MPAID は TNF α 刺激によって生じた ALP 活性の抑制を解除することが確認された。

以上の結果は、MTI-II および MPAID が TNF α によって象牙芽細胞様細胞に誘導された NF- κ B の転写活性を阻害することを示しており、MTI-II および MPAID が新しい抗炎症薬として歯髄に生じた炎症の制御に有用である可能性を示唆している。

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 3 件)

- (1) Tsuchiya-Hirata S, Kokabu S, Fukushima H, Jimi E, Fine-tuning between BMP and NF- κ B pathways regulates osteoblastic bone formation, Journal of Oral Biosciences, 査読有, 58(3), 73-77, 2016. DOI: 10.1016/job.2016.02.003
- (2) Nakayama K, Hirata-Tsuchiya S, Okamoto K, Morotomi T, Jimi E, Kitamura C, The Novel NF- κ B Inhibitor, MTI-II Peptide Anti-Inflammatory Drug, Suppresses Inflammatory Responses in Odontoblast-Like Cells, 査読有, J Cell Biochem, 117(11), 2552-2558, 2016. DOI:10.1002/jcb.25548
- (3) Okamoto K, Hirata-Tsuchiya S, Kitamura C, Omoteyama K, Sato T, Arito M, Kurokawa M, Suematsu N, Kato T: A Small Nuclear Acidic Protein that Inhibits NF- κ B and its Application to Anti-Inflammatory Drugs : Endocrinology, 査読有, 157(12), 4973-4986, 2016. DOI: 10.1210/en.2016-1746

[学会発表](計 7 件)

- (1) Hirata-Tsuchiya S, Shiba H: Anti-inflammatory effects of MTI-II peptides 第 49 回広島大学歯学会総会, 広島, (7月2日) 2016.
- (2) 平田-土屋志津, 自見英治郎, 諸富孝彦, 北村知昭: NF- κ B 阻害剤 MPAID による骨芽細胞分化への影響. 第 75 回九州歯科学会総会, 北九州, (5月23・24日), 2015.
- (3) 中山皓平, 平田-土屋志津, 自見英治郎, 北村知昭: 象牙芽細胞様細胞の

- 炎症応答に対する MTI-II の作用 .第
75 回九州歯科学会総会 ,北九州 ,(5
月 23・24 日), 2015.
- (4) 平田-土屋志津 ,岡本一起 ,中山皓平 ,
永吉雅人 , 諸富孝彦 , 北村知昭 :
MTI-II ペプチドの骨芽細胞における
抗炎症効果の検討 . 第 143 回日本歯
科保存学会学術大会 , 東京 , (11 月
12・13 日), 2015.
- (5) 中山皓平 ,平田-土屋志津 ,永吉雅人 ,
諸富孝彦 , 北村知昭 : TNF α 誘導性
NF- κ B シグナルは象牙芽細胞様細胞
の石灰化能を阻害する . 第 143 回日
本歯科保存学会学術大会 , 東京 , (11
月 12・13 日), 2015.
- (6) 平田-土屋志津 ,岡本一起 , 諸富孝彦 ,
自見英治郎 , 北村知昭 : NF- κ B 阻害
剤 MPAIDs による骨芽細胞への影響 .
第 57 回歯科基礎医学会総会 , 新潟 ,
(9 月 11・12・13 日), 2015.
- (7) 平田-土屋志津 ,岡本一起 , 諸富孝彦 ,
北村知昭 : 骨再生促進剤としての可
能性 : MTI-II は NF- κ B シグナル阻害
により BMP 誘導性骨芽細胞分化を
促進する . 第 36 回日本歯内療法学会
学術大会 , 横浜 , (7 月 11・12 日),
2015 .

6 . 研究組織

(1)研究代表者

土屋 志津 (TSUCHIYA SHIZU)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科
(歯)・助教
研究者番号 : 60610053