

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11706

研究課題名(和文) NSAIDsリポジショニングによるNF- κ B阻害を介した歯髄炎治療法の開発研究課題名(英文) Development of endodontic treatment through the NF- κ B inhibition by the NSAIDs repositioning

研究代表者

土屋 志津 (Tsuchiya, Shizu)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：60610053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、非ステロイド性抗炎症薬Aspirinのドラッグリポジショニングに着目し、炎症抑制・組織再生・鎮痛を同時に行う新たな歯髄炎治療薬の開発を目的とする。実験当初はAspirinの歯髄組織への効果を調べることで、新たな歯髄炎治療薬の開発を目指していたが、硬組織形成に対するAspirinの効果の詳細なメカニズムを解明するために骨芽細胞株を用いた研究に変更した。骨形成誘導因子BMPで分化誘導した骨芽細胞株に低濃度のAspirinを添加すると、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現増加やALP活性の上昇が確認できたことより、低濃度のAspirinはBMP誘導による硬組織形成を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の平均寿命が長くなるにつれ、生涯自分の歯で食事できることを望む人が増え、歯髄も保存したいという意識が向上している。抜髄に至らないように歯髄を保存するために生体の炎症応答を積極的に制御することが重要であり、さらに一度歯髄炎に罹患した歯髄をより確実に保存するために炎症制御と歯髄組織の再生に加えて「疼痛制御」も可能な新しい治療法の開発が期待されている。本研究結果は、Aspirinをドラッグリポジショニングとして、炎症抑制・組織再生・鎮痛を同時に行う新たな治療薬として利用するための基礎研究として意義のある成果となったと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the effect of aspirin on osteoblast differentiation and its mechanism, and simultaneously demonstrated its potential as a newly repositioned drug in bone tissue formation and suppressing inflammation. Low-dose aspirin enhanced bone morphogenetic protein (BMP)-induced ALP activity. Low-dose aspirin enhanced BMP-induced expression of Osteocalcin, Osterix, and Runx2 mRNA, markers of osteoblasts. These results suggest that low-dose aspirin accelerates the differentiation of BMP-induced osteoblasts.

研究分野：歯内治療

キーワード：炎症抑制 硬組織誘導 ドラッグリポジショニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

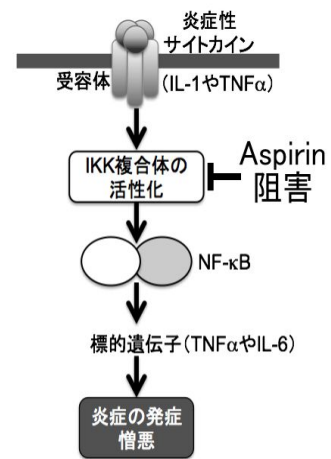
1. 研究開始当初の背景

歯髄は歯に加わる刺激を脳に伝える働き、歯への栄養供給や生体防御などの機能を有するほかに、優れた修復能力を有する組織である。しかし、歯髄炎などの炎症が生じると、その解剖学的な特徴から炎症の状態や程度を判断することが難しく、臨床症状が強い場合は抜髄に至ることが多い。そこで、歯髄炎を発症した場合でも積極的に局所の炎症と痛みを鎮静化し、抜髄せずに歯髄の修復能力を高める治療法の確立が望まれている。また近年、いろいろな疾患の発症に慢性炎症が関与していることが注目されており、歯内療法においても根尖歯周組織に生じた骨欠損の再生を確実にするためには、感染制御と再生療法技術に加え慢性炎症制御が重要であると考えている。そこでこれまでに、炎症のシグナル伝達経路であるNF- κ Bと骨誘導因子BMPシグナルのクロストークに着目し、NF- κ Bサブユニットであるp65がSmad4と結合することでBMPシグナルを抑制していることを明らかにした (*Mol Endocrinol*, 2014)。

NF- κ Bは、免疫応答、炎症反応、細胞増殖、細胞分化などの様々な生命現象に深く関わっている。NF- κ BはIL-1やTNF α などの炎症性サイトカインがIKKキナーゼ (IKK) 複合体を活性化することで、活性化されTNF α やIL-6などの標的遺伝子の発現を誘導する。NF- κ Bは炎症反応を仲介する中心的役割を担うことから、抗炎症剤の多くはNF- κ Bの阻害効果を持つものが多い。

我々はこれまでに、ステロイド剤と同等に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-II (MTI-II) がNF- κ Bの転写活性を抑制すること (*Endocrinology*, 2016) MTI-IIが濃度依存的にTNF α 刺激による象牙芽細胞様細胞 (KN-3細胞) 石灰化抑制を解除することを明らかにした (*J Cell Biochem*, 2016)。また、MTI-IIがTNF α 刺激によるNF- κ Bを抑制することでBMPによる骨芽細胞分化を促進することを明らかにした (*Mol Cell Biochem*, 2020)。

このようにNF- κ Bを標的とした抗炎症作用が骨芽細胞分化や象牙芽細胞分化に対して有効であることを明らかにしてきたが、これらの実験試薬やタンパクを薬剤として臨床応用するには、法律など多くの問題を解決しなければならない。さらにこれらの試薬の鎮痛効果については不明である。そこでNSAIDsに着目した。NSAIDsの分類の一つであるサリチル酸系は、シクロオキシゲナーゼ活性を阻害し、プロスタグランジン (PGs) の産生を抑制することで鎮痛消炎作用を示すことが知られている。その中でもAspirinは、すでに臨床の現場や市販薬としても使用されており、さらに、NF- κ Bの転写活性に重要であるIKK複合体の活性を阻害してNF- κ Bシグナルを抑制することが報告されている (図1)。以上のことからAspirinが「ドラッグリポジショニング」として歯髄の保存治療、および硬組織再生療法に利用できるのではないかと考えた。



(図1)NF- κ Bの活性化機構と Aspirinの作用点

2. 研究の目的

日本人の平均寿命が長くなるにつれ、生涯自分の歯で食事できることを望む人が増え、歯を保存したいという意識が向上している。現在の歯髄炎に対する治療は、臨床症状および歯科医師の技術や経験をもとに「歯髄の保存が可能」と判断した場合、感染象牙質を除去した後に覆髄を行い、歯髄の自然治癒を期待する。しかし、患者が痛みを訴えれば歯髄の保存を諦め抜髄へ移行する。歯内治療に使用するマイクロスコープ、コーンビームCTおよびニッケル・チタン製ファイルなどの機器や器具が急速に進化し、歯内治療がよりスムーズに行えるようになった

が、根管の解剖学的形態は非常に複雑であり、すべての根管に対して完璧な抜髄治療を行うのは難しい。また、治療に反応せず治癒機転に至らない難治性の根尖性歯周炎や、歯根端切除術後などの広範囲な骨欠損を伴う症例に対して、局所炎症の慢性化抑制と組織治癒としての硬組織再生を誘導する予知性の高い治療法の開発が望まれている。

このことから、抜髄や抜歯に至らないように生体の炎症応答を積極的に制御することが重要であり、さらに一度炎症が惹起した歯髄や歯周組織をより確実に再生・治癒させるために炎症制御と歯髄・歯周組織の再生に加えて「疼痛制御」も可能な新しい治療法の開発が期待されている。そこで本研究では、炎症の主たるシグナル伝達経路であるNF- κ Bシグナルの阻害効果を持つ非ステロイド性抗炎症薬Aspirinのドラッグリポジショニングに着目し、炎症抑制・組織再生・鎮痛を同時に行う新たな歯髄や硬組織再生療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

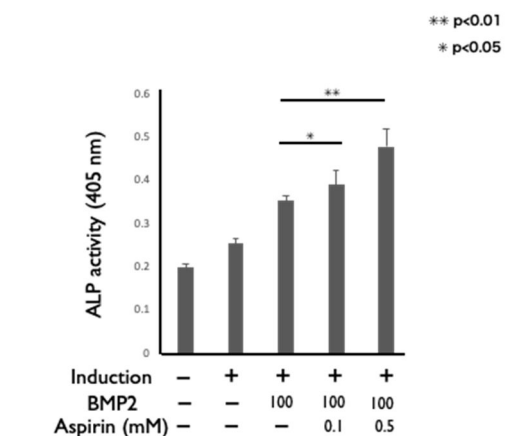
実験当初は Aspirin の歯髄組織への効果を調べることで、炎症抑制・組織再生・鎮痛を同時に行う新たな歯髄炎治療薬の開発を目指していたが、まずは硬組織形成に対する Aspirin の効果の詳細なメカニズムを解明するために骨芽細胞株を用いた研究に変更した。

骨芽細胞株に NF- κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子を遺伝子導入し、様々な濃度の Aspirin で前処理した後に、TNF α で刺激し、NF- κ B の転写活性が抑制されることを確認する。次に骨芽細胞株を Aspirin で前処理後、BMP2 で分化誘導後にアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定する。また、骨分化マーカーである Runx2、Osterix、および Osteocalcin のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、発現を分析する。さらに局所的な硬組織再生治療への応用を目指して異所性骨化モデルを作製し、骨形成誘導効果を検討する。BMP2 と Aspirin をコラーゲンペレットに含有し凍結乾燥後、マウス背筋膜下に埋入する。2週間後にペレットを摘出し、 μ CT を用いて異所性骨形成能を定量し、組織学的および免疫組織学的解析も併せて行い評価する。

4. 研究成果

骨芽細胞株を TNF α で刺激すると NF- κ B の転写活性が著しく上昇したが、高濃度の Aspirin の添加によって NF- κ B の転写活性上昇が抑制された。次に、骨芽細胞株を BMP4 で刺激すると ALP 活性が促進されたが、低濃度の Aspirin 添加によりその活性は促進された(図2)。また、骨芽細胞株を BMP2 と Aspirin で刺激したところ、Runx2 や Osteocalcin、および Osterix の遺伝子発現は低濃度の Aspirin 存在下で有意に増加した。さらに、BMP2 と Aspirin 含有のコラーゲンペレットは、BMP2 のみ含有のコラーゲンペレットと比較し、異所性骨の形成が促進していた。 μ CT 画像でも Aspirin 含有コラーゲンペレットでは海綿骨が充実している様子が観察された。

これらの結果から、低濃度 Aspirin は Osterix などの骨分化マーカーの発現を介して BMP 誘導性の骨芽細胞分化を促進し、硬組織形成を誘導する可能性が示唆された。このことから本研究は、非ステロイド性抗炎症薬 Aspirin がドラッグリポジショニングとして、炎症抑制・組織再生を同時に行う新たな歯髄や硬組織再生療法に利用するための基礎的研究となったと考える。



(図2) AspirinはBMP刺激によるALP活性を促進する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Jimi Eijiro, Takakura Nana, Hiura Fumitaka, Nakamura Ichiro, Hirata-Tsuchiya Shizu	4. 巻 8
2. 論文標題 The Role of NF- B in Physiological Bone Development and Inflammatory Bone Diseases: Is NF- B Inhibition “Killing Two Birds with One Stone”?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1636 ~ 1636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8121636	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Suzuki Shigeki, Fukuda Takao, Nagayasu Shintaro, Nakanishi Jun, Yoshida Kazuma, Hirata-Tsuchiya Shizu, Nakao Yuki, Sano Tomomi, Yamashita Akiko, Yamada Satoru, Ohta Kouji, Shiba Hideki, Nishimura Fusanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Dental pulp cell-derived powerful inducer of TNF- comprises PKR containing stress granule rich microvesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-019-40046-2	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Urata Mariko, Kokabu Shoichiro, Matsubara Takuma, Sugiyama Goro, Nakatomi Chihiro, Takeuchi Hiroshi, Hirata-Tsuchiya Shizu, Aoki Kazuhiro, Tamura Yukihiko, Moriyama Yasuko, Ayukawa Yasunori, Matsuda Miho, Zhang Min, Koyano Kiyoshi, Kitamura Chiaki, Jimi Eijiro	4. 巻 233
2. 論文標題 A peptide that blocks the interaction of NF- B p65 subunit with Smad4 enhances BMP2-induced osteogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 7356 ~ 7366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/jcp.26571	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Suzuki Shigeki, Hoshino Hiroaki, Yoshida Kazuma, Nakanishi Jun, Tsuchiya-Hirata Shizu, Kobuke Seiji, Haruyama Naoto, Nishimura Fusanori, Shiba Hideki	4. 巻 495
2. 論文標題 Genome-wide identification of chromatin-enriched RNA reveals that unspliced dentin matrix protein-1 mRNA regulates cell proliferation in squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2303 ~ 2309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.136	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田 - 土屋志津, 鈴木茂樹, 岡本一起, 西藤法子, 山田聡, 柴秀樹, 北村知昭
2. 発表標題 NF-kB阻害薬MTI-IIIはp65-Smad4複合体のSmad binding elementへの結合に関する
3. 学会等名 第151回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田-土屋志津、鈴木茂樹、西藤法子、本山直世、柴 秀樹
2. 発表標題 AspirinがBMP誘導性骨芽細胞分化に与える影響
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田-土屋志津
2. 発表標題 歯内治療への応用を目指した炎症制御による硬組織再生法の開発
3. 学会等名 第39回日本歯内療法学会学術大会 シンポジウム2（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田 - 土屋志津, 岡本一起, 鈴木茂樹, 本山直世, 永安慎太郎, 小武家誠司, 柴秀樹, 北村知昭
2. 発表標題 BMP-SmadシグナルにMTI-II Peptide Anti-Inflammatory Drug (MPAID)が与える影響
3. 学会等名 第146回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浦田真梨子, 松原琢磨, 中富千尋, 平田 - 土屋志津, 古株彰一郎, 張皿, 北村知昭, 自見英治郎
2. 発表標題 BMPによる骨形成促進を目的としたSmad4とNF- B p65の会合領域の検討
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	自見 英治郎 (Jimi Eijiro) (40276598)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	鈴木 茂樹 (Suzuki Shigeki) (30549762)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	本山 直世 (Motoyama Naoyo) (70509661)	広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	柴 秀樹 (Shiba Hideki) (60260668)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	