

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09956

研究課題名(和文) 共役因子MTI- によるエストロゲンシグナル調節を介した硬組織再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of Hard Tissue Regeneration Therapy via Modulation of Estrogen Signaling by MTI-II

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲンは様々な疾患の発症・進展の抑制に寄与する。研究への同意が得られた患者の抜去歯から樹立した歯髄細胞にエストロゲンレセプター(ERα, ERβ)の発現が認められたため、性差による歯髄細胞の硬組織形成能を比較したが、ALP活性に有意な差は認められなかった。しかしどちらの細胞からも、BMP Response geneであるId1の遺伝子発現の上昇が認められた。また、Caspase3, 8遺伝子は発現が抑制された。さらにId1遺伝子の発現をノックダウンすると、細胞増殖の抑制とアポトーシス陽性細胞の増加が認められた。このことからId1はヒト歯髄細胞のアポトーシスに関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エストロゲンは、骨のリモデリングに関与し、更年期以降のエストロゲン欠乏が骨粗鬆症の原因となることが知られているように、様々な疾患の発症・進展の抑制に寄与する。本研究期間で行った、樹立したヒト歯髄細胞におけるエストロゲンレセプターの発現確認や、性差による硬組織誘導能の確認、および歯髄細胞では機能的役割が明らかでないId-1遺伝子の機能解析は、新しい硬組織再生療法の開発につながるのみならず、Gender-specific Medicine (GSM)としてそれぞれのライフステージに合わせた新しい治療法の確立につながる意義のある研究であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Estrogen contributes to the suppression of the onset and progression of various diseases. Since estrogen receptor (ERα, ERβ) expression was found in dental pulp cells established from extracted teeth of patients who consented to the study, we compared the hard tissue-forming ability of pulp cells by sex and found no significant difference in ALP activity. However, both cell types showed increased gene expression of Id1, a BMP response gene. The expression of Caspase 3 and 8 genes was also suppressed. Furthermore, knockdown of Id1 gene expression resulted in suppression of cell proliferation and an increase in apoptosis-positive cells. This suggests that Id1 may be involved in apoptosis of human dental pulp cells.

研究分野：歯内治療

キーワード：エストロゲン 硬組織形成 抗炎症

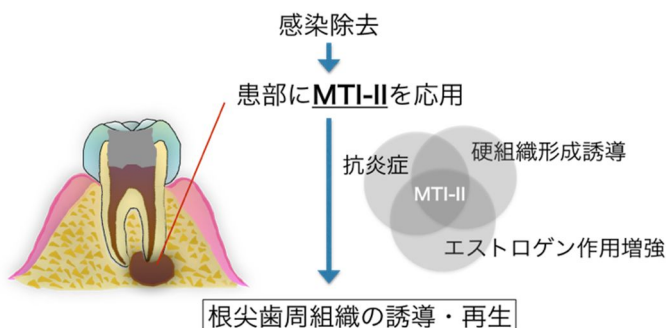
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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。

女性ホルモンであるエストロゲンは、骨のリモデリングにも関与し、更年期以降のエストロゲン欠乏が骨粗鬆症の原因となることが知られている (Turner RT et al., *Endocr Rev.* 1994)。骨破壊を主病態とする慢性歯周炎においては、エストロゲン欠乏により歯槽骨破壊が進行するという報告 (Yoshihara A et al., *J clin periodontal.* 2004) と、関連性はないという報告があり (Martinez-Maestre MA et al., *Menopause.* 2013)。エストロゲン欠乏の慢性歯周炎への関与は統一した見解が得られていない。一方で、卵巣摘出ラットでは炎症性サイトカイン発現上昇を伴う根尖性歯周炎の増悪化が引き起こされることが近年報告され (Romualdo PC et al., *J Endod.* 2018)、エストロゲンの減少抑制、つまりはエストロゲン依存性シグナルの活性化が、特に更年期以降の女性に対する予知性の高い根尖部治癒誘導に有用な手段の一つであることが示唆される。

エストロゲンは、エストロゲン受容体がリガンド依存性 DNA 結合転写因子として働き、共役因子の調節を受けながら細胞増殖やアポトーシス、炎症を制御する遺伝子発現を誘導する。これまでに、エストロゲン受容体と炎症の主なシグナル経路である NF- $\kappa$ B シグナルが、共通の共役因子である CBP や p300 への結合を競合することや (Harnish DC., *Endocrinology.* 2000)、エストロゲン受容体が NF- $\kappa$ B の共役因子 Bcl-3 の発現を抑制することで NF- $\kappa$ B シグナルを阻害すること (Pratt MA., *Mol Cell Biol.* 2003) が報告されている。これまでに申請者らは、「炎症制御による硬組織再生誘導」という視点から、グルココルチコイド受容体の共役因子 Macromolecular Translocation Inhibitor-II (MTI-II) が高い抗炎症および硬組織誘導能を持つことを報告した。エストロゲン受容体とグルココルチコイド受容体は高い相同性を有するため本研究では、このエストロゲン増強能・抗炎症能・硬組織誘導能の三者を併せ持つ候補薬剤として MTI-II に焦点をあてる (図 1)。



(図1) MTI-IIを応用した根尖性歯周炎治療法の開発

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、MTI-II がエストロゲンシグナルを増強する分子基盤を明らかにし、MTI-II の Bioengineered drug としての根尖部硬組織再生療法への有用性を検証することである。女性ホルモン・エストロゲンの分泌量変化に関連した Gender-specific Medicine (GSM: 性差に基づく医療) として根尖性歯周炎の発症や慢性化を捉え、それぞれのライフステージに合わせた治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

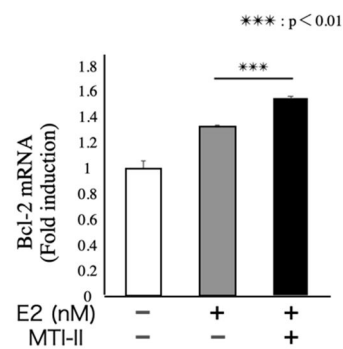
マウス骨芽細胞株において MTI-II がエストロゲンの標的遺伝子 Bcl-3 の発現に与える影響をリアルタイム PCR で確認した。また、MTI-II 遺伝子が骨芽細胞分化に与える影響を調べるために、骨分化マーカーである Osterix のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。次に、ヒト歯髓細胞へのエストロゲンの影響を調べるために、広島大学 疫学研究倫理審査委員会で承認

後（承認番号：E2021-2741）研究への同意が得られた患者の抜去歯から歯髄細胞を樹立し、エストロゲンレセプター（ $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ）の発現が見られるかをリアルタイム PCR で調べた。さらに、エストロゲンによる刺激を行い、それらの遺伝子発現の変化を確認した。次に、樹立した歯髄細胞の性差による硬組織形成能を比較するため、骨分化誘導因子 Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP4) 刺激によるアルカリホスファターゼ（ALP）活性と BMP 応答遺伝子 *Id-1* の発現やアポトーシス関連遺伝子である *Caspase3*, *8* 遺伝子の発現変化を調べた。最後に、*Id-1* 遺伝子の機能的役割を調べるために、樹立した歯髄細胞に対してターゲット遺伝子 *Id-1* の siRNA を遺伝子導入して細胞増殖能の測定と、フローサイトメトリーを使ってアポトーシス陽性細胞の割合を調べた。

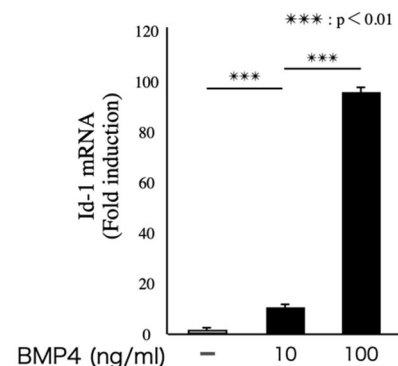
#### 4. 研究成果

マウス骨芽細胞株において MTI-II がエストロゲンの標的遺伝子 *Bcl-3* の発現に与える影響を調べた結果、エストロゲン（17 $\beta$ -Estradiol: E2）単独刺激群と比較し、E2+MTI-II 群では有意に *Bcl-3* の発現が上昇した（図2）。また、siRNA によって *MTI-II* 遺伝子の発現をノックダウンしたマウス骨芽細胞株を骨分化誘導因子 BMP4 で刺激したところ、*Osterix* の発現が抑制された。次に、抜去歯から樹立した歯髄細胞にエストロゲンレセプター（ $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ）の発現が見られるかを調べたところ、どちらの発現も確認できた。しかし、E2 刺激による  $ER\alpha$  と  $ER\beta$  の発現変化は見られなかった。さらに、樹立した歯髄細胞の性差による硬組織形成能を比較するため、BMP4 刺激による ALP 活性と *Id-1* 遺伝子の発現変化を調べたところ、ALP 活性に有意な差は認められなかったが、どちらの細胞からも *Id-1* 遺伝子発現の上昇が認められた（図3）。また、*Caspase3*, *8* 遺伝子は BMP4 刺激によってその発現が抑制された。さらに、*Id-1* 遺伝子をノックダウンさせた群で有意な細胞増殖能の抑制が見られた。また、フローサイトメトリーを使ってアポトーシス陽性細胞の割合を調べた結果、*Id-1* 遺伝子をノックダウンさせた群でアポトーシス陽性細胞の割合が上昇していることがわかった。このことから、*Id-1* は歯髄細胞の細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

近年、Gender-specific Medicine (GSM) が注目されており、性ホルモンが関与する疾患の研究は国内外で盛んに行われている。疼痛発症にエストロゲンや男性ホルモンであるテストステロンが関与するという報告から（Dance A., *Nature*. 2019）、性別やホルモン濃度によって痛みの治療法を変更する必要があるという議論がなされている。エストロゲンの関与が報告されている根尖性歯周炎においても、更年期以降の急激なエストロゲンの分泌量低下や、乳がんや子宮がん治療のための抗エストロゲン剤の投与が根尖性歯周炎の発症や増悪化を引き起こしている可能性がある。本研究は、新しい根尖性歯周炎治療法の開発につながるのみならず、GSM としてそれぞれのライフステージに合わせた新しい治療法の確立につながると考えている。



(図2) MTI-IIはエストロゲン標的遺伝子Bcl-2の発現を増強する



(図3) 歯髄細胞においてBMP4はBMP標的遺伝子Id-1の発現を増強する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hirata-Tsuchiya Shizu, Suzuki Shigeki, Okamoto Kazuki, Saito Noriko, Yuan Hang, Yamada Satoru, Jimi Eijiro, Shiba Hideki, Kitamura Chiaki	4. 巻 469
2. 論文標題 A small nuclear acidic protein (MT1-11, Zn2+-binding protein, parathymosin) attenuates TNF-inhibition of BMP-induced osteogenesis by enhancing accessibility of the Smad4-NF- B p65 complex to Smad binding element	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 133 ~ 142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-020-03734-6	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田-土屋志津、鈴木茂樹、中西 惇、武田克浩、柴 秀樹
2. 発表標題 Aspirinのドラッグリポジショニングによる硬組織再生誘導法の開発
3. 学会等名 日本歯内療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田-土屋志津、鈴木茂樹、中西惇、武田克浩、柴秀樹
2. 発表標題 Aspirinのドラッグリポジショニングによる骨形成促進効果の検討
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 2020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	柴 秀樹  (Shiba Hideki)  (60260668)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (15401)	
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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関