

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861806

研究課題名(和文)ステロイドコアクチベーターMTI-IIを用いた炎症制御による骨組織再生療法の開発

研究課題名(英文)Development of bone regeneration by steroid-coactivator, MTI-II

研究代表者

土屋 志津(Tsuchiya, Shizu)

九州歯科大学・歯学部・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)：近年、発癌や動脈硬化症の発症に慢性炎症が関与することが注目されている。歯内治療においても慢性炎症が根尖部に持続していることが難治性の根尖性歯周炎の原因の一つと考えられる。今回、炎症の主たるシグナル伝達経路であるNF- κ Bシグナルを抑制するMTI-IIに着目し、骨芽細胞分化への影響について検討した。骨芽細胞様細胞にMTI-IIとTNF- α 、BMP4で刺激したところ、BMP4刺激によってALP活性上昇が誘導されたが、TNF- α で刺激するとその活性は抑制された。しかし、MTI-IIで刺激した細胞ではその抑制が解除された。以上より、MTI-IIはBMPによる骨形成の有効な補助薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that the inflammatory cytokine, tumor necrosis factor (TNF- α) inhibited BMP-induced osteoblast differentiation via NF- κ B signaling. In the present study, we examined effects of steroid-coactivator, MTI-II, on inflammatory responses in osteoblasts. When the cells were treated with MTI-II, TNF- α -induced NF- κ B-luciferase activity failed to increase in a dose-dependent manner, as well as TNF- α -induced expression of MMP-9 and IL-6 mRNA, a target gene of NF- κ B. We next examined effects of MTI-II on the inhibition of BMP-induced osteoblastogenesis by TNF- α . When the cells were treated with TNF- α , BMP-induced ALP activity was inhibited, while MTI-II restored TNF- α -mediated inhibition of the activity in a dose-dependent manner. These results suggest that MTI-II involves in the inhibition of BMP-induced osteoblastogenesis by TNF- α , and that MTI-II may have an potential as an anti-inflammatory drug.

研究分野：歯周組織

キーワード：炎症 骨

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会における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。

歯科用顕微鏡、コーンビーム CT、およびニッケル・チタン製ファイルといった器材の登場により、近年の歯内治療は高精度化し進歩を遂げている。しかしながら、根尖性歯周炎に対する治療法の原理は変わっていない。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。抜歯の原因となる、骨性治癒に至らない大きい根尖部骨欠損や、症状が持続し治癒機転に到らない難治性慢性炎症に対する治療法の研究は十分に進んでいないのが現状である。

根尖性歯周炎が難治化する要因として特定細菌の関与であること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。このことから、根尖歯周組織において十分にコントロールされていない「慢性炎症」の存在・持続があることは容易に想像できる。根尖歯周組織疾患によって生じた骨欠損部や根尖部歯根膜の創傷治癒とその再生を確実にするためには、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、「**慢性炎症制御による骨組織再生誘導**」という視点から、歯科臨床現場で多用されているレーザーに着目し、筋芽細胞株 C2C12 細胞の BMP 誘導性骨芽細胞分化が半導体レーザー照射により増強することを明らかにした(J Cell Biochem,2010)。また、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-κB シグ

ナルと BMP シグナルの相互作用に着目し、NF-κB シグナルの選択的阻害剤である BAY11-7082 を用いて NF-κB 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

聖マリアンナ医科大学の岡本らの報告によると、ステロイドコアクチベーターである MTI- は、直接的に NF-κB シグナルの転写活性を抑制する。また、低分子量タンパク質 (分子量 11.5 kDa) であるため、ステロイド剤の様に全身に拡散することなく、副作用が抑制される。私は、MTI- を根尖歯周組織という局所に用いることで、根尖歯周組織疾患によって生じた骨欠損部や根尖部歯根膜の創傷治癒とその再生を考えている。

3. 研究の方法

in vitro 実験系において、BMP による石灰化能を誘導した骨芽細胞株に対し、炎症反応を誘導する TNF を添加する。その際に MTI- を加え、骨芽細胞株の炎症応答や石灰化能に与える MTI- の影響を検討する。

(1) MTI- による抗炎症効果の検討

TNF 刺激で骨芽細胞の炎症応答を誘導し、MTI- 存在下・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することで抗炎症効果を検討する。炎症反応は、NF-κB の標的遺伝子である Interleukin-6(IL-6) または Matrix metalloproteinase-9(MMP-9)の発現をリアルタイム PCR 法、ウエスタンブロッティング法により解析する。

(2) MTI- による石灰化能への影響の検討

BMP と TNF 刺激で骨芽細胞の石灰化能と炎症応答も誘導し、MTI- 存在下・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。また、細胞増殖能に及ぼす影響を WST-1 assay で、石灰化能へ及ぼす影響をアルカリフォスファターゼ活性で検討する。さらに、骨芽細胞分化マーカーである型コラーゲン、オステオネクチン、オステオカルシンの発現をリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法で検討する。

4. 研究成果

(1) MTI- の抗炎症効果

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に NF- κ B ルシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入し、MTI- で前処理した後、TNF (10 ng/ml) で刺激して NF- κ B の転写活性を分析した。TNF 刺激によって NF- κ B の転写活性が著しく上昇したが、MTI- によってその活性の上昇が解除・抑制された。次に、MMP-9 と IL-6 の発現を分析した。その結果、MTI- によって MMP-9 や IL-6 の発現が抑制されることがわかった。

(2) MTI- による石灰化能への影響

MTI- と TNF、BMP4 (10 ng/ml) で刺激し、アルカリフォスファターゼ活性測定を行った。BMP4 刺激によってアルカリフォスファターゼ活性上昇が誘導されたが、TNF で刺激するとその活性は抑制された。しかし、MPAIDs で刺激した細胞ではその抑制が解除された。

以上より、MPAIDs は TNF 刺激による NF- κ B シグナルを抑制することで、BMP 誘導性の骨芽細胞分化を促進することから、MPAIDs は BMP による骨形成の有効な補助薬となる可能性が示唆された。

今後は、*in vivo* 実験系において生体への MTI- の影響を検討することを計画している。

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1件)

Hirata-Tsuchiya S, Fukushima H, Katagiri T, Ohte S, Shin M, Nagano K, Aoki K, Morotomi T, Sugiyama G, Doi T, Takeuchi H, Ohya K, Terashita M, Hirata M, Kitamura C, Jimi E. Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF- κ B via an interaction with Smad4. *Mol Endocrinol.* 2014, 28(9):1460-1470

(学会発表)(計11件)

Nakayama K, Hirata-Tsuchiya S, Jimi E, Okamoto K, Kitamura C: Effects of MTI-II on inflammatory responses of odontoblast-like cells. 2nd Asian Pacific International Conference, Kitakyushu (January 25th), 2014.

Hirata-Tsuchiya S, Okamoto K, Jimi E, Kitamura C: Effects of steroid-coactivator MTI-II during bone formation. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu (November 5th-7th), 2014.

平田・土屋志津, 岡本一起, 諸富孝彦, 北村知昭: MTI- による BMP 誘導性骨芽細胞分化への影響. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 山形 (10 月 30, 31 日), 2014.

平田・土屋志津, 岡本一起, 北村知昭: MTI- は骨芽細胞様細胞に対し抗炎症作用を示す. 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会, 滋賀 (6 月 19, 20 日), 2014.

中山皓平, 平田・土屋志津, 岡本一起, 北村知昭: 象牙芽細胞様細胞の炎症応答に対する MTI- の影響. 第 139 回日本歯科保存学会 2013 年秋季学術大会, 秋田

(10月17, 18日), 2013.

平田-土屋志津, 岡本一起, 寺下正道, 北村知昭: MTI- が示す骨芽細胞への影響-抗炎症剤としての可能性の検討-.第138回日本歯科保存学会 2013 年春季学術大会, 福岡(6月27, 28日), 2013.

Hirata-Tsuchiya S, Terashita M, Kitamura C: Anti-inflammatory role of steroid-coactivator MTI-II during bone formation. The 9th World Endodontic Congress (International Federation of Endodontic Association; IFEA), Tokyo, Japan (May 23-26), 2013.

平田-土屋志津, 自見英治郎, 寺下正道, 北村知昭: ステロイド受容体コアクチベータ MTI- の骨芽細胞における抗炎症効果の検討. 第73回九州歯科学会総会, 北九州(5月18, 19日), 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

土屋 志津 (TSUCHIYA SHIZU)
九州歯科大学・歯学部歯学科・助教
研究者番号: 60610053

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: