

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870678

研究課題名(和文) レジンモノマーの安全性を評価する先進的なセルベースアッセイ系の構築

研究課題名(英文) Establishing an advanced cell-base assay to evaluate the safety of resin monomers

研究代表者

折本 愛 (Orimoto, Ai)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：30710967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、解毒の中心的な遺伝子発現応答である「ARE (Anti-oxidant Responsive Element) 活性」を発光測定で定量する細胞株を樹立し、メチルメタクリレート (MMA) とジヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) のARE活性に対する作用の比較から、ARE活性を低濃度で上昇させるレジンモノマーは、相対的に毒性が高いことを示唆した。本課題では、歯科で頻用されるエチルメタクリレート (EMA) についてARE活性化における濃度依存性と細胞毒性の相関性を明らかにした。以上の結果より、レジンモノマーの細胞毒性が強いものほど低濃度でARE活性を上昇させることが実証された。

研究成果の概要(英文)：The anti-oxidant responsive element (ARE)-mediated transcription is a key event in cellular detoxification of electrophilic exnobiotics. We previously established a clonal cell line stably transfected with an ARE-destabilized luciferase reporter gene, and showed that 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), which is more toxic than methyl methacrylate (MMA), highly increased ARE-mediated transcriptional activity at low concentrations than MMA. We here showed the dose-dependent effects of ethyl methacrylate (EMA) on ARE activity and their relation to cytotoxicity. These results showed that the low concentration effects of resin monomers on ARE activity reflect their cytotoxicity probably due to their electroactivity to intracellular molecules.

研究分野：歯科保存

キーワード：ARE活性化 ルシフェラーゼ レジンモノマー 歯科材料 細胞毒性

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、汎用のレジンモノマーであるメチルメタクリレート (MMA) について、細胞の遺伝子発現応答を網羅的に解析した結果、MMA はグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) に代表される、異物代謝酵素群の発現を増大させることを見出した (Ishikawa A, et al., Dent Mater J, 2006) (図 1)。

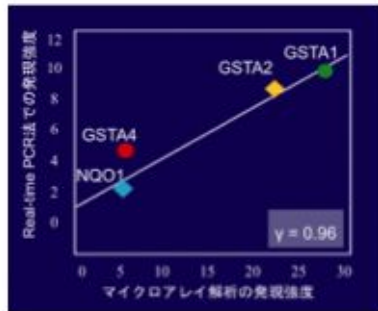


図 1 MMA 刺激時の遺伝子発現

このことから、MMA が細胞内に侵入すると GST の発現が増大し、グルタチオン抱合による MMA の無毒化が促進されるという一連の解毒応答が起きていると考えられた (図 2)。

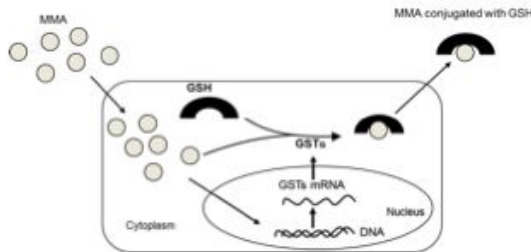


図 2 MMA の毒性に対する細胞の解毒応答(グルタチオン抱合)

さらに、生物発光タンパク質 (ルシフェラーゼ) を用いたレポーターアッセイにより遺伝子発現機構を解析し、MMA は、GST 遺伝子群に共通する転写応答配列である、抗酸化剤応答配列 (Anti-oxidant Responsive Element: ARE) に作用することで Gsta1 遺伝子の発現を誘導することを明らかにした (Hattori et al. J. Dent. Res, 2008) (図 3)。

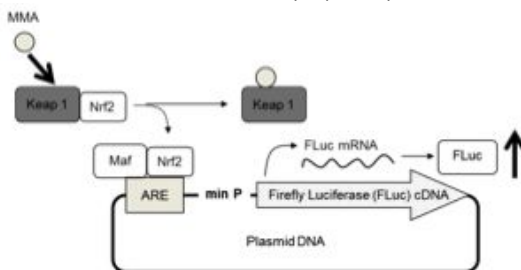
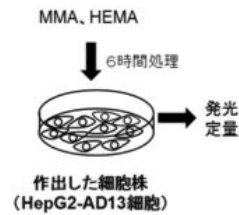


図 3 抗酸化剤応答配列 (ARE) を介した GST 遺伝子群の発現誘導

そこで、レポーターアッセイ系の改良に取り組み、MMA による ARE 活性誘導が 100 倍を超える (30 mM MMA で 220 倍) ARE-ルシフェラーゼ遺伝子の定常導入細胞株 (HepG2-AD13 細胞) を樹立した。この細胞評価系を利用して、MMA に比べ毒性の強いジヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) について解析を行った結果、HEMA は MMA よりも低濃度で ARE 活性を誘導した。また、HEMA は、高濃度側で細胞内グルタチオン濃度と細胞生存率の低下を引き起こした。MMA と HEMA の比較から、ARE 活性を低濃度で上昇させるレジンモノマーは、相対的に毒性が高いことを示唆した (Orimoto A, et al., PLoS One, 2013) (図 4)。



(6時間の30 mM MMA刺激で220倍の活性化)

図 4 「ARE 活性」を生物発光で定量する細胞株の樹立

## 2. 研究の目的

MMA と HEMA 以外のレジンモノマーによる ARE 活性化に関しては不明なままであった。そこで、歯科で頻用されるエチルメタクリレート (EMA) について、ARE 活性誘導の濃度依存性を明らかにし、さらには、低濃度の ARE 活性化は、細胞毒性の強さを反映することを実証することを目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) HepG2-AD13 細胞における ARE-ルシフェラーゼレポーター活性と細胞毒性に対する EMA の濃度依存的作用

高感度な ARE 活性測定が可能な、独自に有する HepG2-AD13 細胞を用いて、EMA のレジンモノマーについて、ルシフェラーゼ発光活性測定と、グルタチオン濃度測定・WST-8 を用いた生存率測定により、低濃度範囲での ARE 活性化能と高濃度範囲での細胞生存率の低下の相関性について解析を行った。

### (2) レジンモノマーの毒性検出の基盤となる ARE 活性化制御タンパク質 Keap1 の解析

GST を含む第二相異物代謝遺伝子群の発現誘導においては、センサータンパク質 Keap1 が異物を感知する。Keap1 システイン残基のスルフヒドリル (SH) 基が異物による修飾を受けると、Keap1 による分解制御から逃れた転写因子 Nrf2 が核内に移行して ARE を活性化する (Wakabayashi N, et al., PNAS, 2004)

(図3参照)。これまでに HEMA が多くの異物と同様に、この Keap1-Nrf2 経路で ARE を活性化することを報告している(Orimoto A, et al., PLoS One, 2013)。そこで、本研究では、ARE 活性制御タンパク質である、センサータンパク質 Keap1 と転写因子 Nrf2 強制発現によって、HEMA に加えて MMA, EMA による Keap1-Nrf2 経路における ARE 活性化を調べる事で、ARE 活性の基盤となる Keap1 によるレジンモノマー認識能の解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ARE 活性に対するレジンモノマーの濃度依存的な活性化作用と細胞毒性の関連性

MMA と HEMA についての作用の比較から、ARE 活性を低濃度で上昇させるレジンモノマーは、相対的に毒性が高い可能性を報告した(Orimoto A, et al., PLoS One, 2013)。そこで、レジンモノマーの濃度依存的な ARE 活性化能は、細胞毒性の強さを反映するかを検証するため、EMA について解析を行った。HepG2-AD13 細胞において、EMA の ARE 活性に対する濃度依存的な作用は、MMA と類似したものであり、高濃度(10-30 mM)で ARE 活性を顕著に誘導した(図5)。細胞毒性の評価指標として行った、細胞内グルタチオン濃度と細胞生存率の低下は、30 mM においても起こらなかった。このように EMA の結果からも、レジンモノマーの細胞毒性が強いものほど、低濃度で ARE 活性を上昇させることが支持された。従って、ARE 活性のレジンモノマー濃度依存性を解析することで、歯科用レジンモノマーの毒性を評価できる可能性が考えられた。上記の評価系に基づいて考える時、急性の細胞傷害性という観点からは、EMA は、MMA と同様にある程度多量に使用できる材料であること、一方、HEMA の使用は、低用量が安全上望ましいことが示唆された。

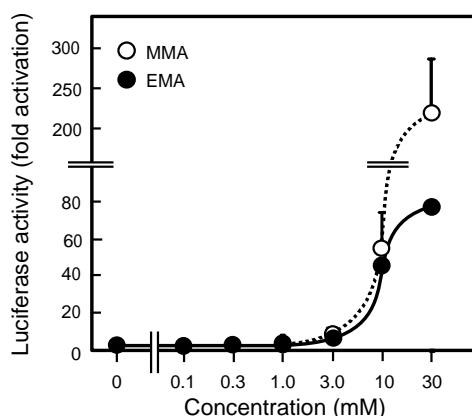


図5 HepG2-AD13 細胞におけるMMAとEMAの濃度依存的なARE活性化能

##### (2) レジンモノマーの毒性検出の基盤となる ARE 活性化制御タンパク質 Keap1 の解析

ARE 活性制御タンパク質である、センサータンパク質 Keap1 と転写因子 Nrf2 を HepG2 細胞に強制発現させ、各種レジンモノマーについての ARE 活性化能の解析を行ったところ、HEMA に加えて MMA, EMA も Keap1-Nrf2 経路で、有意に ARE 活性を上昇させることを明らかにした。このことから、レジンモノマーによる Keap1 の SH 基に対する直接結合を示唆しており、レジンモノマーの毒性 = 反応性の高さが、センサータンパク質 Keap1 に対する異物の親和性に反映され、低濃度範囲での ARE 活性化の分子機構であることを示唆した。

##### (3) HepG2 細胞と L929 細胞における MMA の ARE-ルシフェラーゼレポーター活性に対する作用

ISO 規格に細胞毒性評価に使用する細胞として記載され、歯科領域においても細胞毒性評価に使用されているマウス線維芽細胞由来の L929 細胞に、ARE-ルシフェラーゼレポーターベクター(pGL4.24-2E)を一過性に遺伝子導入した時の 10 mM MMA に対する ARE 活性化率は、2.4 倍と検出は容易であるが、HepG2 細胞における 10 mM MMA に対する ARE 活性の 7.6 倍と比較して有意に低いため、レジンモノマーの濃度依存的な ARE 活性化能の違いで、レジンモノマーの毒性の強さを解析することは、依然、困難である。HepG2 細胞は肝細胞由来であることから、解毒能力が高く、異物代謝系第 2 相解毒酵素とその遺伝子発現機構が高度に発現される傾向にあることが推察され、ARE 活性測定でレジンモノマーの毒性を解析するには、解毒応答を高感度にとらえられる HepG2 細胞を用いるのが最適であると考えられた。

##### (4) 結論

HEMA, MMA, EMA の比較から、レジンモノマーの細胞毒性が強いものほど、低濃度で ARE 活性を上昇させるということが実証された。

レジンモノマーの毒性 = 反応性の高さが、Keap1 への結合力として反映され、低濃度からの ARE 活性化として検出できている可能性を示唆した。

ARE 活性試験は、既存のレジンモノマーを安全に使用し、また安全な新規歯科材料を開発していく上で、高感度で有用性の高い細胞毒性試験としてとして発展する可能性が示された。

##### 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Orimoto A, Kurokawa M, Handa K, Ishikawa M, Nishida E, Aino M, Mitani A, Ogawa M, Tsuji T, Saito M. F-spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of TGF-activity. Archives of Oral Biology 2017; 79: 7-13 (査読有)

Egashira M, Suzuki T, Orimoto A, Obata T, Nakamura H, Tanaka M, Kanamori T, Kawai T. Structure-cytotoxicity relationship of methacrylate-based resin monomers as evaluated by an anti-oxidant responsive element-luciferase reporter assay. Dental Materials Journal 2016; 35(6): 946-951 (査読有)

Aino M, Nishida E, Fujieda Y, Orimoto A, Mitani A, Noguchi T, Makino H, Murakami S, Umezawa A, Yoneda T, Saito M. Isolation and characterization of the human immature osteoblast culture system from the alveolar bones of aged donors for bone regeneration therapy. Expert Opin Biol Ther. 2014 Dec;14(12):1731-1744. (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

折本 愛、齋藤 正寛  
ADAMTS superfamily による Marfan 症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析  
第 1 回エラスチン・関連分子研究会学術集会、東京、アルカディア市ヶ谷、2016 年 12 月 3-4 日

Ai Orimoto, Yousuke Murasawa, Zenzo Isogai, Miyuki Chijiwa, Satsuki Mochizuki, Kyoko Imanaka-Yoshida, Yasunori Okada and Masahiro Saito. ADAMTSL6 exacerbates tissue destruction of aortic aneurysm and dissection in Marfan syndrome mouse model through promotion of ADAMTS4 activity. The American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2016, Hilton St. Petersburg Bayfront, USA 2016 年 11 月 13-17 日

折本 愛  
ADAMTS superfamily による Marfan 症候群の解離性大動脈瘤悪化機構の解析  
第 4 回 MatoriCell フォーラム、東京、東京理科大学神楽坂キャンパス 2016 年 9 月 3-4 日

折本 愛、半田慶介、齋藤正寛

ADAMTS superfamily による新規結合組織破壊機構の解析  
第 37 回 日本歯内療法学会大会、ウインクあいち、名古屋  
2016 年 7 月 23-24 日

Ai Orimoto, Masaharu Futagi, Masaki Ishikawa, Keisuke Handa, Masahiro Saito  
ADAMTSL6 exacerbates marfan syndrome through the enhancement of ADAMTS4 activity. IADR/APR General Session & Exhibition, 2016 Seoul, Republic of Korea June 22-25, 2016  
IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko, ORIMOTO Ai, VENKATAIAH Venkata Suresh, KANEHIRA Masafumi, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro.  
The effect of S-PRG filler eluate on periodontitis models. The 6th International symposium for interface oral health science 2016 年 1 月 18 - 19 日、Sendai, Gonryo Kaikan.  
VENKATAIAH Venkata Suresh, ORIMOTO Ai, FUTAGI Masaharu, ZOU Wei, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro.  
Adipose derived stem cell therapy for periodontal tissue regeneration in micro-mini pig model. The 6th International symposium for interface oral health science 2016 年 1 月 18 - 19 日、Sendai, Gonryo Kaikan.

折本 愛、二木 正晴、石河 真幸、半田 慶介、齋藤 正寛  
ADAMTS superfamily による Marfan 症候群の解離性大動脈瘤悪化機構の解析  
第 12 回日本エラスチン研究会学術集会、東京、アルカディア市ヶ谷 2015 年 12 月 4-5 日

折本 愛、二木 正晴、石河 真幸、半田 慶介、齋藤 正寛  
ADAMTSL6 を介したマルファン症候群モデルにおける組織破壊機構の解析  
第 143 回日本歯科保存学会、東京、文京シビックホール  
2015 年 11 月 12-13 日

半田慶介、折本愛、小林洋子、齋藤正寛  
マルファン症候群モデルマウスにおける歯周炎の組織破壊機構に関する研究  
第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会、北九州、西日本総合展示場・北九州国際会議場、2015 年 6 月 25-26 日

折本 愛、半田慶介、村澤祐介、磯貝善蔵、齋藤正寛  
ADAMTSL6 が誘導する微細線維形成によるマルファン症候群モデルマウス大動脈瘤悪化機構の解析。

第 47 回日本結合組織学会、東京、コク  
ヨホール、2015 年 5 月 15-16 日  
半田慶介、藤枝宜泰、折本愛、齋藤正寛  
ADAMTSL6 は微細線維形成促進を介して  
大動脈瘤における組織破壊を促進する  
第 14 回日本再生医療学会総会、パシフィ  
コ横浜、横浜 2015 年 3 月 20 日  
藤枝宜泰、安倍翔太、折本愛、半田慶  
介、齋藤正寛  
ADAMTSL6 が誘導する微細線維形成異常  
による大動脈瘤の炎症悪化機構の解析、  
第 37 回 日本分子生物学会、横浜、パシ  
フィコ横浜 2014 年 12 月 19 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

折本 愛 (Orimoto Ai)  
東北大学・大学病院・医員  
研究者番号 : 30710967