

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890194

研究課題名（和文）炎症制御による骨組織再生誘導を目指した NF- κ B 阻害剤徐放性ゼラチンの検討研究課題名（英文）Effects of controlled release of NF- κ B inhibitor on bone regeneration

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

研究成果の概要（和文）：本研究の最終目標は、慢性炎症を制御し骨形成を促進する治療法の確立である。まずNF- κ B選択的阻害剤BAY11-7082の徐放システムの構築を目指す前に、同じくNF- κ Bを阻害するステロイド剤のデキサメサゾンとステロイド受容体コアクチベータMTI-IIの骨形成と炎症抑制効果への影響を検討した。細胞にMTI-IIを遺伝子導入後、炎症性サイトカインTNF α で刺激をした結果、MTI-II濃度依存的にNF- κ Bの転写活性が抑制された。またMMP-9の発現は、MTI-IIによって抑制された。以上の結果は、MTI-IIが抗炎症剤として有効であることが示唆している。

研究成果の概要（英文）： We examined effects of steroid-coactivator, MTI-II, on inflammatory responses in MG63 cells. Overexpression of MTI-II in the cells failed to increase TNF α -induced NF- κ B-luciferase activity in a dose-dependent manner, as well as TNF α -induced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) mRNA, a target gene of NF- κ B. These results suggest that MTI-II may have an potential as an anti-inflammatory drug.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：炎症、NF- κ B、骨形成

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QOLを維持・向上することにあり、従来の「抜髄・抜歯・補綴」という不良組織を除去・補完する方向から、

国民の生活サポートを目的として口腔環境を維持する方向にシフトしている。

歯を保存する方法の一つとして、進行した辺縁性あるいは根尖性歯周炎に対する再生療法がある。辺縁性歯周炎治療に関しては、全顎的に感染と炎症を制御後、局所的に進行した骨欠損に対して Guided Bone

Regeneration 法等の局所的再生療法が臨床応用されている。一方、根尖性歯周炎に関しては、機器・器材の高精度化はみられるものの、感染源の可及的除去後は貼薬剤を用いるのみで、生体の自然治癒を待つことが主体の従来型歯内治療法が依然として続いている。抜歯の原因として、骨性治癒に至らない大きい根尖部骨欠損や治癒機転に到らない慢性炎症が多いにも関わらず、それに対する再生療法の研究は十分に進んでいないのが現状である。

近年、代謝性疾患、発癌、動脈硬化性疾患の発症における「慢性炎症」の関与がクローズアップされている。疾患発症時の組織リモデリングにおける自然炎症という概念も提起されるようになり、慢性炎症における分子プロセスに関する研究が活発になっている。難治性根尖歯周組織疾患の主たる要因は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が存在することから、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、骨組織再生療法の確立を目的として、歯科臨床現場で疼痛緩和や抗炎症作用、骨形成等に効果的とされ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- 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 (投稿中)。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、歯根周囲に生じた病変に対する治療において慢性炎症を制御し骨形成を促進する治療法の確立である。最終目標達成に向け、本研究では炎症抑制効果のある BAY11-7082 を徐放するシステムを構築し *in vitro* および *in vivo* で明らかにすることを目的としている。NF- κ B 阻害剤 BAY11-7082 を徐放することで、骨形成誘導・促進がさらに認められれば、少なからず慢性的な炎症が存在

している口腔内での骨形成促進剤としての臨床応用に期待できることが想定される。

3. 研究の方法

石灰化能を誘導した骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に炎症反応を誘導する TNF α を添加する際に BAY11-7082 徐放性ゼラチンを加え、BAY11-7082 徐放骨芽細胞株の炎症応答に与える影響を検討する。その後、マウス頭蓋骨に形成した骨欠損部に BAY11-7082 徐放性ゼラチン・スポンジを埋入し、BAY11-7082 徐放骨形成に与える影響を検討する。

まず NF- κ B 選択的阻害剤 BAY11-7082 の徐放システムの構築を目指す前に、同じく NF- κ B を阻害するステロイド剤のデキサメサゾンとステロイド受容体コアクチベータ MTI- II (Macromolecular Translocation Inhibitor II) の骨形成と炎症抑制効果への影響を検討する。

(1) 骨形成への影響の検討

骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を β グリセロリン酸およびアスコルビン酸で刺激し石灰化能を誘導後、TNF α を加えることで炎症応答を誘導する。その際、デキサメサゾンを同時に加え、細胞増殖能および石灰化能におよぼす影響を解析する。

細胞増殖能は、細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩 (MTT) のホルマザン色素への変換を測定することにより解析を行う。また石灰化能は、骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性の測定と染色を行い解析する。

(2) 炎症抑制効果の検討

ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 細胞に TNF α を加えることで炎症応答を誘導する。その際、MTI- II を遺伝子導入し、NF- κ B の転写活性への影響を NF- κ B ルシフェラーゼ活性にて検討する。炎症反応は、NF- κ B の標的遺伝子である Matrix metalloproteinase-2, 9 (MMP-2, 9) の発現をリアルタイム PCR 法により解析する。

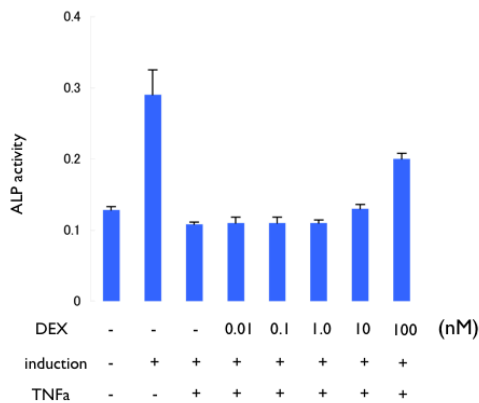
4. 研究成果

研究計画当初は、炎症抑制効果のある BAY11-7082 を徐放するシステムを構築し *in vitro* および *in vivo* で明らかにすることを目的としていたが、BAY11-7082 を徐放するシステムの構築に時間がかかることがわかり、まずは同じく炎症抑制効果のあるデキサメ

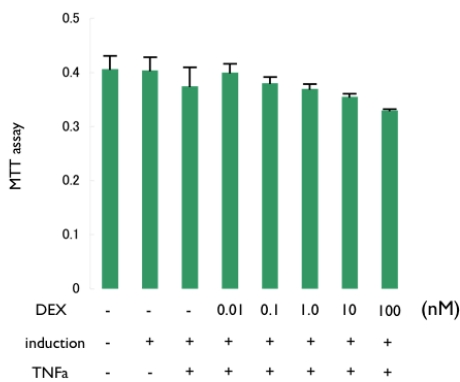
サゾンや MTI-II に着目し研究を進めるよう、変更した。

(1) デキサメサゾンの骨形成への影響の検討

β グリセロリン酸およびアスコルビン酸を添加することで石灰化能を誘導したマウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞を炎症性サイトカイン TNF α で刺激した。その際、デキサメサゾンを加え、石灰化能に関与する細胞内分子の発現・活性化を検討したところ、TNF α によって抑制された骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性が、デキサメサゾン濃度依存的に解除された(図1)。一方、デキサメサゾンはMC3T3-E1細胞の増殖能には影響しなかった(図2)。



(図1) デキサメサゾンはALP活性を促進する

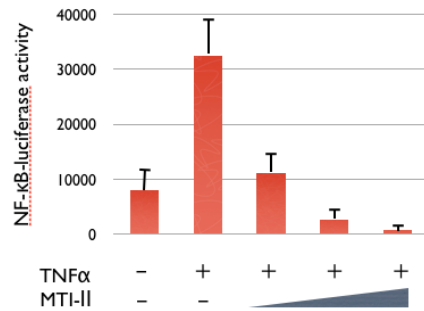


(図2) デキサメサゾンは細胞増殖能には影響しない

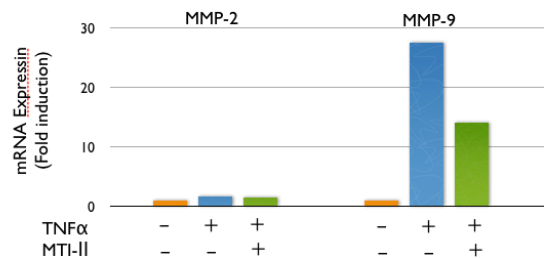
(2) MTI-II の炎症抑制効果の検討

ヒト骨肉腫細胞株 MG-63 細胞に TNF α を加えることで炎症応答を誘導する。その際、MTI-II を遺伝子導入し、炎症性サイトカイン TNF α で刺激後の NF-kB の転写活性を測定した結果、MTI-II 濃度依存的に NF-kB の転写活性

が抑制されることがわかった(図3)。また NF-kB の標的遺伝子である MMP-2, 9 の発現をリアルタイム PCR 法により解析したところ、MTI-II は MMP-2 の発現には影響しなかったが、MMP-9 の発現を抑制した(図4)。



(図3) MTI-II はTNF α 刺激によるNF-kB 転写活性の上昇を解除する



(図4) MTI-II はMMP-9の発現を抑制する

今後は、MTI-II を中心に炎症抑制効果だけではなく、骨形成への影響についても検討して行く予定である。

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)

- ① Jimi E, Hirata S, Osawa K, Terashita T, Kitamura C, Fukushima H: The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. Special issue "Tissue Engineering in Dentistry", International Journal of Dentistry, volume 2012, Article ID 148261, 7 pages, 2012. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 平田-土屋志津, 岡本一起, 寺下正道, 北村知昭: ステロイドコアクチベーター MTI-II による骨芽細胞様細胞への影響. 第137回日本歯科保存学会2012年秋季学術大会, 広島(11月22, 23日), 2012.

- ② Hirata-Tsuchiya S, Jimi E, Terashita M, Kitamura C: A role of MTI-II in osteoblast differentiation. The Fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, Kitakyushu, Japan (October 26), 2012.
- ③ 平田-土屋志津, 寺下正道, 岡本一起, 北村知昭: MTI-II の骨芽細胞様細胞に対する抗炎症作用の検討. 第 10 回日本再生歯科医学会学術大会, 神戸 (9月1, 2日), 2012.
- ④ 平田志津, 岡本一起, 寺下正道, 北村知昭: 骨芽細胞様細胞の炎症応答において MTI-II が示す抗炎症作用の検討. 第 136 回日本歯科保存学会 2012 年春季学術大会, 沖縄 (6月28, 29日), 2012.
- ⑤ 平田志津, 自見英治郎, 寺下正道, 北村知昭: ステロイドコアクチベーターMTI-II による抗炎症作用の検討. 第 72 回九州歯科学会総会, 北九州(5月19, 20日), 2012.

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: