

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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791923

研究課題名（和文） アミノ酸誘導体による酸化ストレスの制御

研究課題名（英文） Control of oxidative stress by an amino-acid derivative

研究代表者

上野 剛史（UENO TAKESHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30359674

研究成果の概要（和文）：

外科的侵襲や炎症状態時に増加する活性酸素種により生じる酸化ストレスを実験的にシミュレートし、活性酸素種の細胞機能抑制効果を明らかにした。細胞はラット大腿骨由来の骨芽細胞様細胞を用いて、AADの抗酸化能を検討した。まずAAD自体の細胞毒性について、フローサイトメトリーによるCell viabilityを評価することで毒性がないことを確認した後、酸化ストレスにより減少させられた接着細胞数、細胞増殖能、および分化機能に対する回復効果について評価した。その結果、酸化ストレスにより70%程度に抑えられたViable cell数は、AADによりほぼコントロールと同様まで回復し、増加されたアポトーシスも約40%回復させることができた。酸化ストレスにより50%程度まで減少した接着細胞数も、コントロールと有意差のないレベルまで回復した。分化機能についてみると、骨芽細胞に特異的なアルカリフォスファターゼ活性や、カルシウム生成量が、酸化ストレスにより50%以下まで減少させられたのに対し、AADの投与によりコントロールと同じかそれ以上のレベルまで回復させることができた。この得られた結果のメカニズムを考察する一つの方法として、細胞内活性酸素量および細胞内グルタチオン生成量を測定したところ、AADが細胞内における抗酸化システムに大きく寄与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This project tested the protective potential of N-acetyl cysteine, an antioxidant, amino acid derivative (AAD), in controlling oxidative stress against osteoblasts. Osteoblastic cells extracted from rat bone marrow were cultured. Oxidative stress was induced by adding H₂O₂ into the culture media. Then, some H₂O₂-treated cultures were cotreated with AAD. Addition of H₂O₂ decreased the number of cells to 50% of untreated cultures at days 2. Addition of AAD into H₂O₂ cultures resulted in a dose-dependent increase in the number of cells, with the cell number being 50% greater than that in the H₂O₂ culture. The gene expression levels of type I collagen, osteopontin, and osteocalcin were downregulated threefold by H₂O₂ on day 7. The H₂O₂-suppressed gene expression was fully recovered by AAD cotreatment. The mineralizing capability, assessed by Von Kossa staining on day 15, were approximately 1.8 times greater in the AAD+H₂O₂ cotreated group than in the culture with H₂O₂ alone. These AAD-mediated restorations were associated with an AAD dose-dependent increase of intracellular glutathione and a AAD dose-dependent decrease of intracellular reactive oxygen species. In conclusion, oxidative stress induced by H₂O₂ substantially impairs the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts. More importantly, the addition of AAD into the culture was found to restore these damages to a near normal level due to the improved redox balance, warranting further in vivo studies to test its therapeutic potential as a local antioxidative stress drug.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2000000	600000	2600000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	930000	4030000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：

酸化ストレス、抗酸化物質、骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

先端歯科治療であるインプラント治療や骨再生医療には、外科的侵襲による多くの活性酸素種の発生を伴う炎症の誘発は避けられず、過剰に発生した活性酸素種は、正常細胞の代謝に障害を与え、ひいては治癒の遅延、骨組織においては骨形成の遅延や不全を引き起こすことが知られている。本研究は、この酸化ストレスを制御することに焦点をあてたものである。

2. 研究の目的

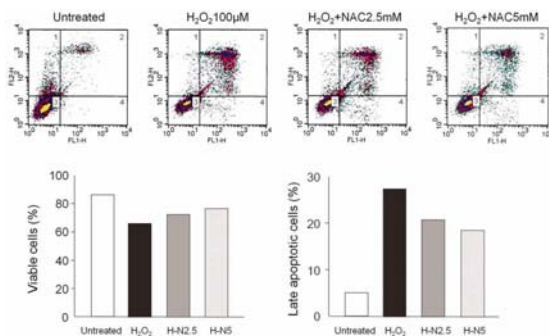
本研究は、抗酸化物質であるアミノ酸誘導体 (Amino-Acid Derivative: AAD) の、歯科臨床応用に向けた評価と最適化を目的とした。酸化ストレスを制御することで、抗炎症効果による早期創傷治癒の獲得や骨形成が促進されるという仮説を立て、実験的に酸化ストレスをシミュレートし、それによる細胞機能抑制効果と、AAD による回復効果を評価することによって、信頼性の高い生物学的エビデンスを提示する。

3. 研究の方法

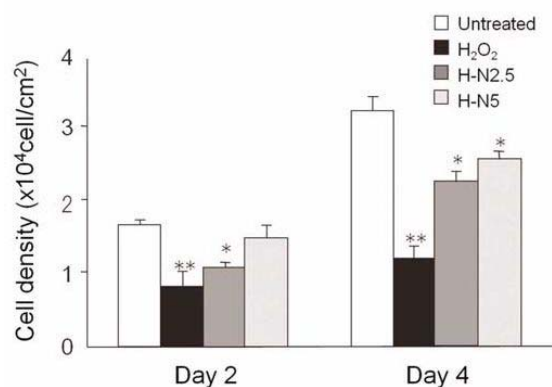
酸化ストレスを制御することで、抗炎症効果による早期創傷治癒の獲得や骨形成が促進されるという仮説を立て、実験的に酸化ストレスをシミュレートし、それによる細胞機能抑制効果と、AAD による回復効果を評価することによって、信頼性の高い生物学的エビデンスを提示する。

4. 研究成果

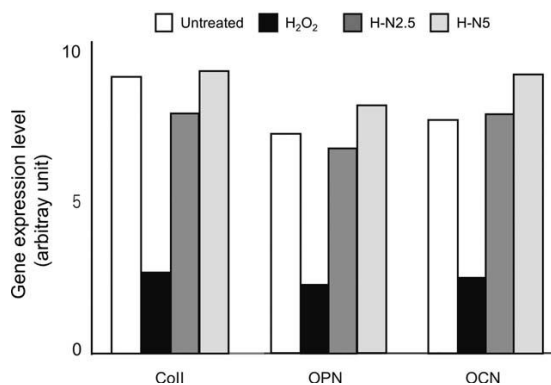
(1) 酸化ストレスにより 70%程度に抑えられた Viable cell 数は AAD により回復し、アポトーシスのレベルも有意に回復した。



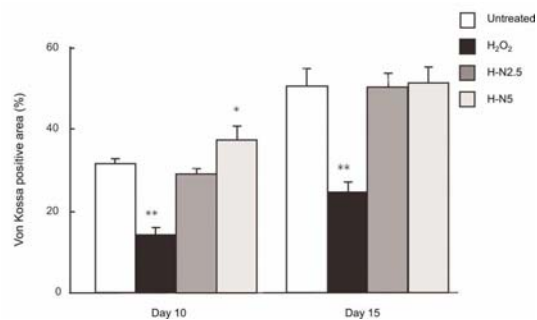
(2) 酸化ストレスにより減少した細胞数は、AAD の添加により、コントロール群と有意差のないレベルまで回復した。



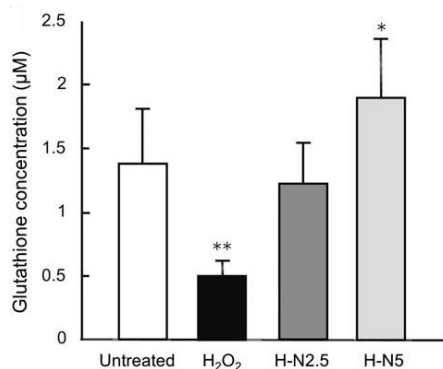
(3) 遺伝子発現について評価したところ、酸化ストレスにより、Collagen I、Osteopontin、Osteocalcin の発現が 30%以下まで減少した。しかし AAD 添加により、酸化ストレス下においても、遺伝子発現がコントロール群と同等のレベルまで回復した。



(4) 骨形成の分化マーカーであるリン酸カルシウム生成量は、酸化ストレスにより約 50% まで減少したが、AAD 処置によりコントロール群と同等かそれ以上のレベルまで回復した。



(5) 抗酸化物質である細胞内グルタチオン生成量を測定したところ、酸化ストレス下でグルタチオンが大きく消費されているのに対し、AAD 処理群では、酸化ストレス下にもかかわらず、コントロール群と同等かそれ以上にグルタチオンレベルが上昇した。この結果より、AAD が細胞内における抗酸化システムに大きく寄与していることが示唆された。



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 9 件)

- ① Ueno T (co-first), Iwasa F, Hori N, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T, Enhancement of osteoblast adhesion to UV photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials*, 31(10): 2717-2727, 2010.
- ② Ueno T (co-first), Hori N, Iwasa F, Takeuchi K, Tsukimura N, Yamada M, Hattori M, Yamamoto A, Ogawa T, Selective cell affinity of biomimetic micro-nano-hybrid structured TiO₂ overcomes the biological dilemma of osteoblasts. *Dental Materials*, 26(4): 275-287, 2010.
- ③ Ueno T (co-first), Hori N, Yamada M, Att W, Suzuki T, Okada S, Ohno A, Aita H, Kimoto K, Ogawa T. Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity. *International Journal of Maxillofacial Implants*, 25(1): 49-62, 2010.
- ④ Ueno T, Yamada M, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. Effect of ultraviolet photoactivation of titanium on osseointegration in a rat model. *International Journal of Maxillofacial Implants*, 25(2): 287-294, 2010.
- ⑤ Yamada M, Ueno T, Minamikawa H, Sato N, Iwasa F, Hori N, Ogawa T. N-acetyl Cysteine alleviates cytotoxicity of bone substitute. *Journal of Dental Research*, 89(4): 411-416, 2010.
- ⑥ 山田将博, 上野剛史, 岩佐文則, 堀 紀雄, 小川隆広, コラーゲン創被覆用スポンジによる培養骨芽細胞のアポトーシス誘導および機能障害と N-アセチルシステインによるその改善 日本口腔インプラント学会雑誌 23 巻 1 号: 3-11, 2010.
- ⑦ Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Iwasa F, Yoshino F, Kimoto K, Lee MC, Ogawa T. Electrostatic control of protein adsorption to UV-photofunctionalized titanium. *Acta Biomaterialia*, 6(10): 4175-80, 2010.
- ⑧ Minamikawa H, Yamada M, Iwasa F, Ueno T, Deyama Y, Suzuki K, Yawaka Y, Ogawa T. Amino acid derivative-mediated detoxification and functionalization of dual cure dental restorative material for dental pulp cell mineralization. *Biomaterials*, 31(28): 7213-25, 2010.
- ⑨ Yamada M, Kubo K, Ueno T, Iwasa F, Att W, Hori N, Ogawa T, Alleviation of commercial collagen sponge- and membrane-induced

apoptosis and dysfunction in cultured osteoblasts by an amino acid derivative. International Journal of Maxillofacial Implants. 25(5); 939-46, 2010.

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① Ueno T, Hori N, Igarashi Y, Ogawa T, Gamma-ray treatment enhances bioactivity and osseointegration capability of titanium. The IADR 88th general session & exhibition, Barcelona, July 14-17, 2010.
- ② Iwasa F, Ueno T, Minamikawa H, Kodari Knuruyu R, Sugita Y, Ogawa T, Micro-nano-hybrid surface is resistant to biological aging of titanium. The IADR 88th general session & exhibition, Barcelona, July 14-17, 2010.
- ③ Minamikawa H, Yamada M, Ueno T, Iwasa F, Ogawa T, N-acetyl cysteine-mediated detoxification and functionalization of resin-modified glass ionomer cement. The IADR 88th general session & exhibition, Barcelona, July 14-17, 2010.
- ④ Tsukimura N, Hori N, Suzuki T, Aita H, Ueno T, Yamada M, Morokuma M, Ishigami T, Ogawa T, Synergistic enhancement of biological capability by micro-nano-hybrid structure and UV-photofunctionalization The IADR 88th general session & exhibition, Barcelona, July 14-17, 2010.
- ⑤ 上野剛史、堀 紀雄、五十嵐順正、小川隆広、ガンマ線照射によるチタンの骨結合能の向上 口腔先端応用医科学研究会第3回学術会議 東京 2011年1月22日
- ⑥ 岩佐文則、堀 紀雄、山田将博、鈴木丈夫、上野剛史、馬場一美、小川隆広、チタンは初期細胞接着における細胞内応答を活性化する 口腔先端応用医科学研究会第3回学術会議 東京 2011年1月22日
- ⑦ 石崎 憲、月村直樹、上野将也、上野剛史、山田将博、南川 元、杉田好彦、Rajita Kodali Kanuru、中川かほり、Hafiz Hasnain、櫻井 薫、小川隆広、骨再生のための末梢血単核球細胞治療 口腔先端応用医科学研究会第3回学術会議 東京 2011年1月22日
- ⑧ Ueno T, Sugita Y, Yamada M, Igarashi Y, Ogawa T, N-acetyl cysteine protects function of TMJ chondrocytes from oxidative stress. The IADR 89th general session & exhibition, San Diego, March 16-19, 2011.
- ⑨ Tsukimura N, Ueno T, Hori N, Suzuki T, Yamada M, Morokuma M, Akita D, Ishigami T, Ogawa T. Osseointegration capability of alkaline- and heat-created nanotufted titanium. The IADR 89th general session & exhibition, San Diego, March 16-19, 2011.

- ⑩ Ishizaki K, Tsukimura N, Ueno M, Ueno T, Yamada M, Minamikawa H, Sugita Y, Kanuru R, Nakagawa K, Hasnain H, Ogawa T. Peripheral Blood Mononuclear Cell Therapy for Pre-prosthetic Bone Regeneration. The IADR 89th general session & exhibition, San Diego, March 16-19, 2011.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

上野 剛史 (UENO TAKESHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：30359674