

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592903

研究課題名(和文)顎関節症への抗酸化治療をめざした基礎的研究

研究課題名(英文)Effect of anti-oxidant agent on TMJ chondrocytes

## 研究代表者

上野 剛史 (Ueno, Takeshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：30359674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯科治療はしばしば炎症のコントロールを必要とされる。炎症は酸化ストレスと密接に関係しており、この酸化ストレスは組織治癒の阻害や遅延を引き起こす。しかしながら歯科治療において酸化ストレスをコントロールすることに焦点をあてた研究は少ない。本研究は、あるアミノ酸誘導体(AAD)が、酸化ストレスを受けた顎関節頭由来の軟骨細胞に対して、保護的な効果を有するか検討するものである。炎症のシミュレーションは、培地に過酸化水素を追加することで行った。この酸化ストレスにより、細胞接着や遺伝子発現機能が阻害されることが示された。この状態にAADを作用させると、これらの細胞機能を回復させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dental treatment often requires management of inflammation. The inflammation is closely associated with oxidative stress which hinders and delays the healing process. However, therapeutic approach focused on controlling oxidative stress in dental treatment is seldom found. This study tested the protective potential of an anti-oxidant, amino-acid derivative (AAD), in controlling the oxidative stress against TMJ chondrocytes. The inflammatory condition was simulated by adding hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) into culture medium. The exposure of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased the number of the cells, and both aggrecan and collagen II gene expressions. AAD addition into the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cultures restored the number of the cells, and the gene expression and glycosaminoglycan deposition to the level equivalent to untreated control culture. However, more importantly, the addition of AAD into the damaged culture restores their proliferative and differentiation capacities even under oxidative stress.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：酸化ストレス 抗酸化能

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は、酸化ストレスと顎関節症との関連に着目した。持続的もしくは急激なメカニカルストレスやリウマチ性疾患などにより引き起こされた炎症状態において、過剰に発生した活性酸素種は、関節の軟骨細胞や骨芽細胞の代謝に障害を与え、ひいては治癒の遅延、軟骨・骨の degenerative な変性などを引き起こすことが知られている。難治性の顎関節疾患の治療においてはしばしば関節腔内洗浄が行われるが、この目的はあくまで炎症起因物質の洗浄による除去であり、酸化ストレスを制御することをターゲットにおいた治療法はこれまでに報告されていない。本研究では、上記のような基礎的な生物学的研究手法を用いて、顎関節の軟骨、骨における抗炎症作用および機能回復に効果的な方法を検討する。

本研究は、抗酸化物質であるアミノ酸誘導体 (Amino-Acid Derivative(AAD): N-アセチルシステイン使用予定) の歯科臨床応用に向けた評価と最適化を目的とした。N-アセチルシステインは、細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンの前駆物質である。前述の活性酸素種は、生命維持に不可欠なものである一方、メカニカルストレスなどの侵襲により細胞内の抗酸化システムの閾値を越えて発生すると、生体の炎症反応を誘発し、酸化ストレスとして、細胞機能抑制や細胞膜破壊を引き起こすことが報告されており<sup>1)</sup>、実際に顎関節症患者の滑液からも多くの活性酸素種が検出されている<sup>2)</sup>。細胞の基本的機能が酸化損傷によって妨げられることにより、疾患治癒の遅延や関節周囲の軟骨・骨形成の抑制が引き起こされる可能性がある。従って、N-アセチルシステインなどの抗酸化物質を用いて、酸化ストレスをコントロールすることができれば、細胞に対する酸化損傷が軽減されることで細胞接着・伸張、そして増殖・分化機能が相対的に亢進し、臨床的には抗炎

症効果による早期創傷治癒の獲得が期待できると考えられる。

### 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。炎症状態にある顎関節腔では、多くの活性酸素種が発生することが報告されている。過剰に発生した活性酸素種は、顎関節の軟骨細胞や骨芽細胞の代謝に障害を与え、ひいては治癒の遅延、軟骨・骨の変性など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で、抗炎症効果による早期疾患治癒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

まず本研究では、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検討した。この活性酸素種には、入手および取扱いが容易であり、かつ代表的な活性酸素種である過酸化水素を用いた。この酸化ストレスにより、接着や代謝などの、細胞の基本的な機能が阻害されるが、多量に作用させると細胞死を引き起こす。そのような高濃度ですべての細胞を死滅させてしまうと実験が成立しないため、低濃度で用いて細胞死までは誘導せず、生体の炎症状態をシミュレートするような実験系を設定した。次に、酸化ストレスにより抑制された細胞機能に対して、アミノ酸誘導体 (AAD) を用いた機能回復効果を評価した。具体的には、接着や代謝機能などの細胞の基本的な機能と、コラーゲン 遺伝子の発現量やグリコサミノグリカン生成量などの、軟骨細胞に特異的な分化機能の評価を行った。

#### 4. 研究成果

実験的な酸化ストレスのシミュレーションは100 $\mu$ Mの過酸化水素を作用させることとした。この濃度の過酸化水素は軟骨細胞の細胞死を20%程度に留めることができる(図1)。

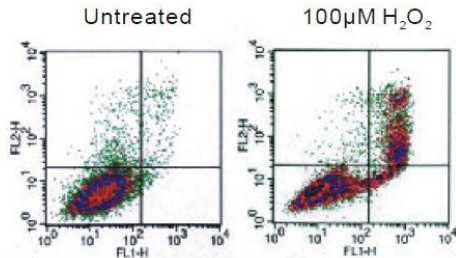


図1 細胞生存率(左下のマスが生細胞)

またこの濃度の酸化ストレス下では、細胞の基本的な機能である接着能も低下することがわかった(図2)

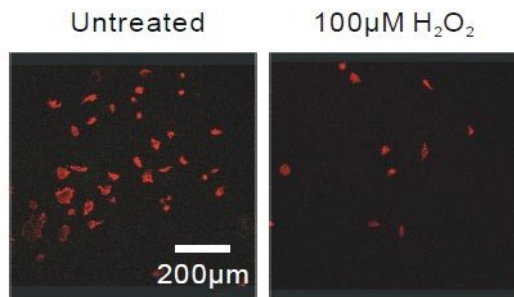


図2 接着細胞数の違い

生体内の組織細胞は、炎症下にあっても全ては死滅することはないが、機能の制限を酸化ストレスによって強いられることは推察できる。したがって本研究では、この濃度の酸化ストレスを基準として、アミノ酸誘導体(AAD)の機能回復効果を評価することとした。AADの濃度は、予備実験の結果もふまえて、2.5, 5, 10mMの3種類に設定した。その結果、酸化ストレス下でAADを添加した細胞の接着機能は、酸化ストレスのない通常の培養ディッシュに培養したものをほとんど差のないところまで回復した(図3)。

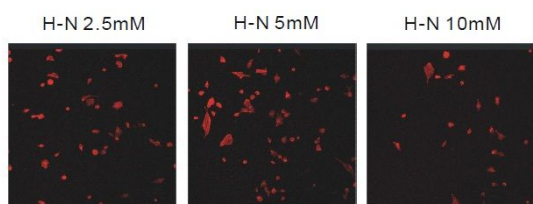


図3 回復した接着細胞数

このように、AADが細胞の初期の活動を回復させることが明らかになったため、実際に治療効果もしくは組織再生に重要な要素となる、遺伝子発現についても評価を行った。その結果、軟骨細胞に特異的なAggrecanやCollagenの遺伝子発現が、酸化ストレス下ではほとんど発現しない位に低下させられるのに対し、そこにAADを作用させると、酸化ストレス下でない細胞に比べても、多くの遺伝子量を発現することが示された(図4)。

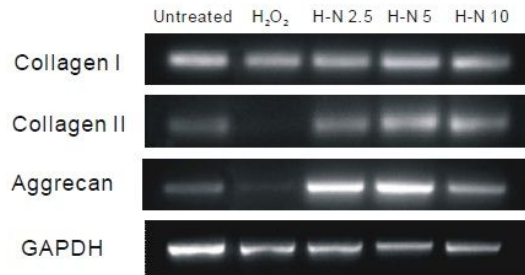


図4 酸化ストレスにより低下した遺伝子発現と、回復した遺伝子発現

また、軟骨組織に重要なグリコサミノグリカンを染色したところ、上記の遺伝子発現と同様に、AADの添加により、回復されることが示された(図5)。

これらの結果は、過酸化水素という代表的な活性酸素種に誘導される酸化ストレスが関節腔に存在する場合、顎関節内炎症の病因論の1つとなりえることを示唆している。実際に過去の研究から、顎関節症患者の関節腔内滑液から活性酸素種が検出されることが報告されている。

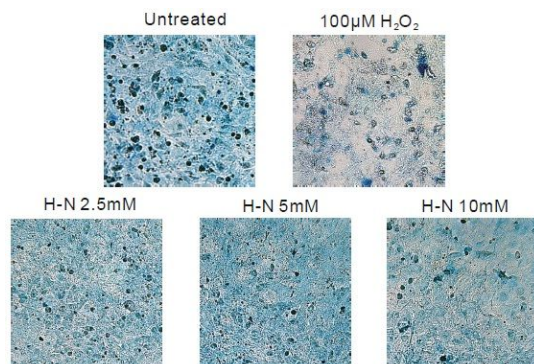


図5 酸化ストレスにより低下したグリコサミノグリカン生成能と、回復した生成能そして、本研究により示されたアミノ酸誘導体 (AAD) による細胞機能の回復効果は、過去の、膝関節の炎症にAADが良好な治癒効果を示した研究報告と併せて考えても、臨床的な応用の可能性を示唆していると考えられる。本研究の結果は、今後の生体内研究の計画を正当化するものと考えられる。具体的には、薬剤の投与方法も検討されるべきであり、また軟骨細胞のみでなく顎関節内の他の細胞の反応も評価する必要があると考えられ、今後の発展を期待されるものであると考えられる。

## 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 6件)

Hayashi R, Ueno T\*, Migita S, Tsutsumi Y, Doi H, Ogawa T, Hanawa T, Wakabayashi N. Hydrocarbon deposition attenuates osteoblast activity on titanium. J Dent Res. 査読有, 93(7):698-703, 2014.

\*Corresponding author.

doi: 10.1177/0022034514536578

Yamada M, Tsukimura N, Ikeda T, Sugita Y, Att W, Kojima N, Kubo K, Ueno T, Sakurai K, Ogawa T. N-acetyl cysteine as an osteogenesis-enhancing molecule for bone regeneration. Biomaterials, 査読有 34(26):6147-56,2013.

doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.064

Yamada M, Ueno T, Minamikawa H, Ikeda T, Nakagawa K, Ogawa T Early-stage osseointegration capability of a submicrofeatured titanium surface created by microroughening and anodic oxidation. Clin

Oral Implants Res, 査読有, 24(9): 991-1001, 2013.

doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02507.x.

Ueno T, Takeuchi M, Hori N, Iwasa F, Minamikawa H, Igarashi Y, Anpo M, Ogawa T. Gamma ray treatment enhances bioactivity and osseointegration capability of titanium. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 査読有, 100(8): 2279-2287, 2012.

doi: 10.1002/jbm.b.32799.

Yamada M\*, Ueno T\*, Tsukimura N, Ikeda T, Nakagawa K, Hori N, Suzuki T, Ogawa T. Bone integration capability of nanopolymorphic crystalline hydroxyapatite coated on titanium implants. Int J Nanomedicine, 査読有, 7: 859-873, 2012.

\*Co-first author because of equal contribution.

doi: 10.2147/IJN.S28082.

Yamada M, Minamikawa H, Ueno T, Sakurai K, Ogawa T. N-acetyl cysteine improves affinity of Beta-tricalcium phosphate granules for cultured osteoblast like-cells. Journal of biomaterials applications, 査読有, 27(1): 27-36, 2012.

doi: 10.1177/0885328210383598.

[学会発表](計 7件)

Akimoto T, Ueno T, Tsutsumi Y, Doi H, Hanawa T, Wakabayashi N. The corrosion resistance of Ti-Zr binary alloy with compositional change. The IADR 93<sup>th</sup> general session & exhibition, Boston, USA, March 14, 2015.

Ueno T, Hayashi R, Yoshihara C, Hanawa T, Wakabayashi N. Hydrocarbon attenuates osteoblastic activity on titanium. The 23<sup>rd</sup> Meeting of European Association of Osseointegration (EAO), Rome, Italy,

September 25-27, 2014.

Lee J, Ueno T, Nomura N, Wakabayashi N, Igarashi Y, Hanawa T. Compositional analysis on Mechanical properties and biocompatibility of titanium-zirconium alloy. The IADR 91<sup>th</sup> general session & exhibition, Seattle, USA, March 20, 2013.

Hayashi R, Ueno T, Wakabayashi N, Igarashi Y, Ogawa T, Hanawa T. Hydrocarbon deposition attenuates osteoblastic activity on titanium. The IADR 91<sup>th</sup> general session & exhibition, Seattle, USA, March 20, 2013.

林 遼、上野剛史、若林則幸、五十嵐順正、小川隆広、塙隆夫、チタン表層の炭化水素の堆積が骨芽細胞の生物学的活性を減弱する 口腔先端応用医科学研究会 第5回学術会議 東京 2013年1月26日

Ueno T, Hori N, Igarashi Y, Ogawa T. Gamma-ray treatment enhances osseointegration capability of titanium. The 9th World Biomaterials Congress (WBC), Chengdu, China, June 1-5, 2012.

Lee J, Nomura T, Kondo R, Ueno T, Hanawa T. Influence of compositional change on mechanical properties and magnetic susceptibility of Ti-Zr binary alloy as implant materials. The 9th World Biomaterials Congress (WBC), Chengdu, China, June 1-5, 2012.

〔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：  
出願年月日：  
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

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・講師  
研究者番号：303596674

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：