

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390522
 研究課題名（和文）金属イオンとモノマーによる免疫担当細胞の酸化ストレス、炎症反応と DNA 損傷の評価
 研究課題名（英文）Evaluation on oxidative stress, inflammation reaction and DNA damage of immunity-supporting cells by metal ions and monomers
 研究代表者
 平 雅之(TAIRA MASAYUKI)
 岩手医科大学・歯学部・准教授
 研究者番号:60179398

研究成果の概要：(1)酸性チタンイオンを細胞培養液中で中和し蛋白複合体にするとマクロファージが活発に貪食し酸化ストレスを惹起した。(2)単球はトリエチレングリコールモノマーを還元系酵素で化学代謝し生体防御することが遺伝子発現解析から明らかとなった。(3)マクロファージはチタン微小粉を貪食し酸化ストレスから炎症性サイトカインを産生し炎症と溶骨に繋がることが示唆された。(4)好中球による活性酸素産生は銅イオンによって濃度依存的に増加した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	1,5210,000

研究分野：歯科理工学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：マクロファージ、好中球、活性酸素、チタン微粒子、トリエチレングリコール、銅イオン、炎症性サイトカイン、DNA 損傷

1. 研究開始当初の背景

当研究の当初目的を下記に転記する。本研究(H18～H20 年度の3年間で実施)でこの70%程度を行えたと考えられる。特に、検討を加えたのは歯科医療(インプラントや口腔外科等)で多用されているチタンの細胞傷害性である。また、有機物のトリエチレングリコールの細胞傷害性と多くの貴金属合金に配合されていて口腔内に溶出し易い銅イオンの細胞傷害性である。これらの知見は他の金属材料やモノマーの細胞傷害性を考察する上で有益と考えられる。セラミックス系粉末の細胞傷害性の研究は行えず、将来、実施の予定である。

当初目的：歯科生体材料に配合されている金属イオンやモノマーの細胞傷害メカニズムには不明な点が多く詳細な解明が期待されている。本研究では、最新の細胞生物学と分子生物学的手法を駆使して、(1) 歯科生体材料に含まれる金属イオンやモノマーが免疫担当細胞に及ぼす為害作用を酸化ストレス、炎症反応と DNA 損傷の観点から評価し、(2) 免疫担当細胞の貪食に伴うファゴリソームの酸、活性酸素、酵素による分解を in vitro で再現し、金属系、高分子系、無機系の固形の歯科生体材料の分解・溶出過程に詳細な検討を加え、さらに(3) 当該分解・溶出物質と生体成分との反応生成物(蛋白錯体)

を明らかにした上で、それらを細胞培養液に配合し、免疫担当細胞の抗体認識反応や免疫応答に検討を加える。そして、これらの知見を反映した生物学的安全性評価基準を新たに設定し、歯科生体材料の安全性の保証と新材料の開発指針とする。さらに、患者にとって侵襲の大きいパッチテストに変わる培養細胞を用いたアレルギー反応評価法の確立を目指す。

2. 研究の目的

(1) 酸に溶解したチタンイオンを細胞培養液で中和化しチタンイオンと蛋白成分を反応させた複合体をマクロファージに貪食させ細胞生存率や炎症性サイトカイン産生量等に検討を加えた。

(2) トリエチレングリコールジメタクリレート (TEGDMA) モノマーが生体防御で重要な役割を担う単球細胞に及ぼす影響を検討する目的で DNA マイクロアレイを用いた遺伝子解析を行った。

(3) 化学発光法による活性酸素 (スーパーオキシドアニオンラジカル) の測定に関する基礎的検討を行った。

(4) ヒト単球様細胞 THP-1 を 2 日間 PMA 刺激しマクロファージに分化させてチタン・サブミクロン微粒子を貪食させ細胞の形態変化や生化学的性質に検討を加えた。LPS 刺激の有無の影響も調べた。

(5) 2 価の銅イオンが好中球の細胞生存率と酸化ストレスに及ぼす影響に検討を加えた。

(6) 2 価の銅イオンがマクロファージの細胞生存率と酸化ストレス及び DNA 損傷に及ぼす影響に検討を加えた。

3. 研究の方法

(1) チタン定量用標準液を希釈しチタンイオンを 1ppm 配合した細胞培養液で RAW264 を 2 日間培養し PIXE 法 (粒子励起 X 線分光法) によって元素分析を行った。また、細胞生存率と炎症性サイトカイン産生量を求めた。

(2) ① 無刺激の対照 THP1 細胞、② Lipopolysaccharide (LPS) (4h) に暴露された THP-1 細胞と ③ LD_{50%} 濃度 (2.5mmol/L) の TEGDMA モノマー (24h) と LPS (4h) に暴露された THP-1 細胞について、47k DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現評価を行った。

(3) ヒポキサンチンとキサンチンオキシターゼ系の酵素反応で生成した活性酸素を MPEC 試薬と化学発光測定装置 (アトー) を用いて計測した。

(4) チタン・サブミクロン微粒子を貪食するマクロファージ (PMA 誘導 THP-1 細胞) の細胞形態を SEM と TEM によって観察した。細胞生存率を DNA 量の測定から求め、細胞上清中の 3 種類の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β と IL-6) の産生量を ELISA 法によって

計測した。DNA アレルギーチップとリアルタイム定量 PCR によって炎症免疫関連の多数遺伝子の発現状態にも検討を加えた。

(5) 好中球としてマウス腹腔にチオグリコレートを注射し 12 時間後に PBS (-) で回収した多形核白血球 (PMN) とヒト HL-60 細胞を 6 日間 G-CSF と DMSO で誘導培養した好中球様細胞を用いた。細胞生存率の測定には Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用い、PMA 刺激直後の活性酸素 (O₂⁻) の測定には、MPEC 試薬と化学発光測定装置を用いた。

(6) マクロファージには 200nM の PMA (フォルボールエステル) で 2 日間誘導培養したヒト THP-1 細胞を用いた。試験培地には塩化第 2 銅由来の 2 価銅イオンを最大 500 マイクロモル/L 配合させた。細胞生存率と活性酸素量の測定以外に、HEL 免疫染色、抗 8-OHdG 免疫染色と TEM/EDX 観察を行った。

4. 研究成果

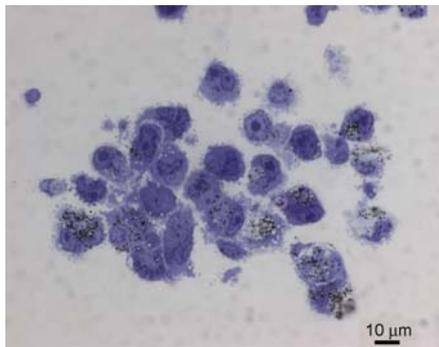
(1) チタンイオンと蛋白質複合体を貪食することで、マクロファージ内のチタン含有量は 12.4 倍増加することを確認した。この際、対照細胞に比べ、生存率が 55% 低下し、TNF- α 生成量が 70% 増加し、活性酸素除去酵素量が 2 倍に増加することを確認した。従って、細胞培養液中のチタンイオン複合体は貪食によって容易にマクロファージ内に移行するものの、活性酸素等によって再イオン化され、細胞内の解毒蛋白質と結合し細胞内貯留によって無毒化が試みられると類推された。

(2) 2.5mmol/L 濃度 TEGDMA 刺激 (③対②) で発現が 2 倍以上上昇した遺伝子は 518 個、逆に発現が 0.5 倍以下に抑制された遺伝子は 304 個であった。上昇が最大の 32 倍を示した遺伝子は aldo-keto reductase family, member C1 (略号 AKR1C1) であった。これは解毒化酵素であり、細胞内に侵入した TEGDMA を化学修飾し、親水性を高めて (すなわち、C=O 基を還元、-OH 基にして) 体外排出を計ったものと考えられた。Apoptosis signaling pathway の分析から 2.5mmol/L 濃度 TEGDMA による細胞増殖の抑制 (LD_{50%}) は Ca²⁺イオン誘起細胞死 pathway (小胞体 stress 感知を伴う) と CASP3 遺伝子の上昇に起因すると考えられた。Toll-like receptor signaling pathway の分析から、2.5mmol/L 濃度 TEGDMA は LPS 刺激による炎症状態を若干緩和すると考えられた。これらの遺伝子発現の知見はこれまで報告されておらず、TEGDMA モノマーの生体安全性を評価する上で貴重な知見と考えられた。特に、有機化合物の酵素代謝系の役割を指摘したことは重要であり、今後の研究の指標と言える。

(3) 活性酸素の測定は化学発光法で捉えることが可能なことを確認した。好中球をフォルボールエステル誘導すると活性酸素の産

生量が有意に増加することを確認した。オプソニン化ゼイモザンの添加は活性酸素の産生量の増加に繋がらなかった。

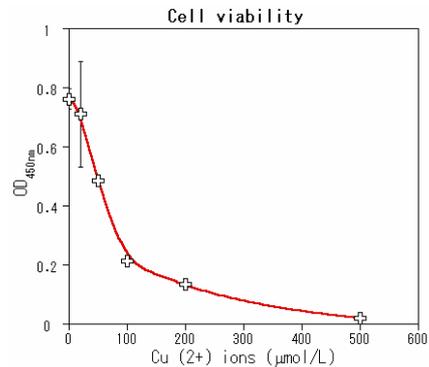
(4) マクロファージはファゴソーム中にチタン・サブミクロン微粒子を凝集捕集した。マクロファージの細胞生存率 (DNA 量) はチタン微粒子の貪食と LPS 刺激の影響を受けず一定であった。マクロファージを LPS 刺激すると炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β と IL-6) の産生量が対照に比べ著しく増加した。チタン微粒子貪食によっても 3 つの炎症性サイトカインの産生量は著しく増加したため、チタン微粒子の貪食がマクロファージに活性化をもたらしたと判断された。LPS 刺激とチタン微粒子の貪食が重なると炎症性サイトカインの産生量は一層増加した。活性酸素除去酵素 SOD の産生量も LPS 刺激とチタン微粒子の貪食で増加する傾向が見られた。その増加量は小さいものの、活性酸素によるチタン微粒子の細胞内分解・細片化活動を反映すると考えられた。チタン微粒子の貪食によってマクロファージの遺伝子発現が 2 倍以上に増加 (②/①比) した遺伝子は 17 個であった (遺伝子略称 = GCL1, CCL3, GCL4, CD44, ICAM1, IL1B, IL8, IL10, IL15RA, NFKB1, PBEF1, SOCS3, TNF, TNFAIP3, TNFRSF5/CD40, TRAF1, VAV1)。一方、チタン微粒子の貪食によってマクロファージの遺伝子発現が 0.5 倍以下に低下 (②/①比) した遺伝子は存在しなかった。この内、定量 PCR によって遺伝子発現の程度が特に有意と判定されたのはケモカインの CCL1 と IL8 及びサイトカインの IL1B と IL6 であった。マクロファージ自身はチタン微粒子の貪食によってほとんど細胞障害を受けないものの、大量の炎症性サイトカインを分泌し組織障害 (周囲組織の炎症や溶骨) を招来することが示唆された。酸化ストレスがこれら傷害作用の起点になっていると考えられ一層の解明が期待された。



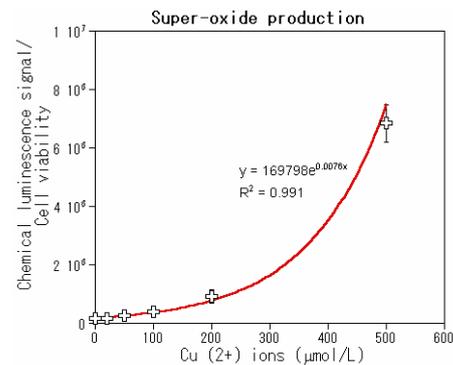
チタン・微小粉 (黒色) 貪食マクロファージの光顕像 (トルイジンブルー染色)

(5) 2 種類の好中球 (培養 1 時間) では銅イオンに対して濃度依存的な細胞生存率の減少傾向と活性酸素量の増加傾向が認められた。高濃度の銅イオンが好中球に作用すると

多量の活性酸素を生じ、組織障害と歯科用合金の腐食に繋がると考えられた。このことはこれまで報告されておらず、今後の銅配合歯科用貴金属合金の安全性評価の一課題になると考えられた。

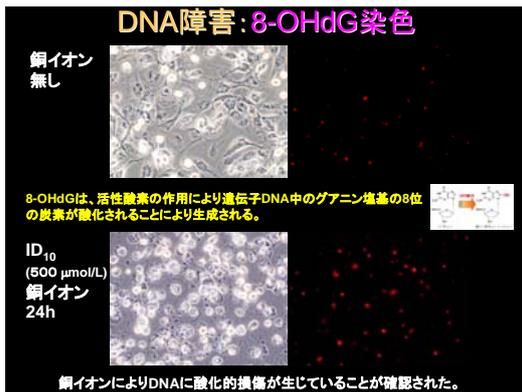
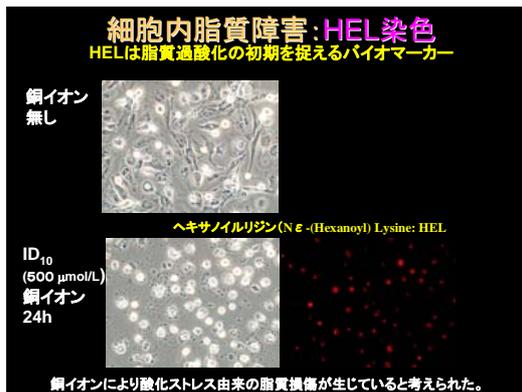


銅イオンに対する好中球の細胞生存率

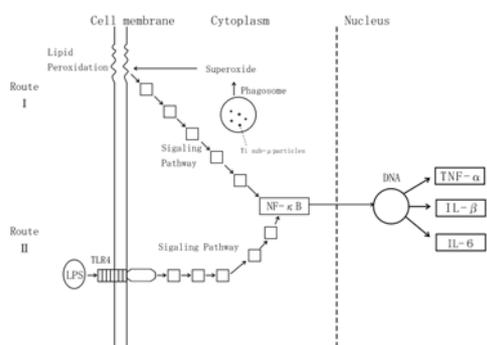


銅イオンに対する活性酸素産生量

(6) マクロファージ (培養 1 日) の細胞生存率も銅イオンに対して濃度依存的に減少したが、活性酸素の産生は微弱で検出できなかった。しかしながら、高濃度の銅イオンを吸収したマクロファージは酸化ストレスに起因する抗 HEL 免疫染色 (脂質の酸化的損傷) や抗 8-OHdG 免疫染色 (DNA の酸化的損傷) に陽性であり、細胞内 (細胞質と核内) に多量の銅イオンを取り込むことが確認された。従って、高濃度の銅イオンがマクロファージに作用すると酸化ストレスによって細胞障害が生じると考えられた。核内に運搬された銅イオンが DNA を障害するためと考えられた。この銅イオンによる酸化ストレスは金属アレルギーや発癌の成因と考えられ詳細な機構解明が望まれた。特に、起炎性との関連で、転写調節因子の NF- κ B の活性化機構の解明が必要と考えられた。



以上を総括すると、材料（チタンイオン、TEGDMA モノマー、チタン・微小粉と銅イオン）はいずれも免疫担当細胞に酸化ストレス（活性酸素等のフリーラジカル）を産生させ、その結果、細胞障害（脂質損傷やDNA 傷害）を生じ、炎症性サイトカインの産生等を通じて組織の炎症や溶骨を惹起することが示唆された。今後、これらの分子機構（シグナリングパスウェイ）の解析が期待される。



想定される LPS 刺激とチタン・微粒子 貪食に伴う NF-κB 活性化機構の模式図
ルート I はチタン・微粒子貪食に伴い産生される活性酸素による細胞膜脂質損傷から開始。ルート II は LPS と Toll-like receptor 4 とのクロストークから開始。ルート I 経路については不明な点が多く今後の詳細な解明が期待される。NF-κB が活性化すると下流のサイトカインの産生が誘導される。

使用した THP-1 細胞はアレルギー発現機構を評価する際の免疫提示細胞（樹状細胞ある

いはランゲルハンス細胞) の代替として使用可能であり、感作材料の作用を特異抗体 CD86 と組織適合型の MHC class II の発現を調べることで明らかになると考えられた。(参考ホームページ: 資生堂研究所による新たな安全性試験法の開発 (May 07, 2009) http://www.shiseido.co.jp/ken/safety/safe_new.htm)

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 5 件)

- ① Taira M, Nezu T, Sasaki M, Kimura S, Kagiya T, Harada H, Narushima T, Araki Y. Gene expression analyses of human macrophage phagocytizing sub-
titanium particles by allergy DNA chip (Genopal™). Biomed Mater Eng., in press, 2009
- ② Taira M, Sasaki M, Kimura S, Araki Y. Dose-dependent effects of Ni (II) ions on production of three inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), superoxide dismutase (SOD) and free radical NO by murine macrophage-like RAW264 cells with or without LPS-stimulation. J Mater Sci Mater Med, 19: 2173-2178, 2008
- ③ Hirano T, Murakami T, Taira M, Narushima T, Ouchi C. Alloy design and properties of new $\alpha+\beta$ titanium alloy with excellent cold workability, superplasticity and cytocompatibility. ISIJ Int., 47(5): 745-752, 2007
- ④ Taira M, Sasaki K, Saitoh S, Nezu T, Sasaki M, Kimura S, Terasaki K, Sera K., Narushima T, Araki Y. Accumulation of element Ti in macrophage-like RAW 264 cells cultured in medium with 1ppm Ti and effects on cell viability, SOD production and TNF- α secretion. Dent Mater J. 25(4):726-732, 2006
- ⑤ Saitoh S, Araki Y, Taira M. Sulfuration resistance of five experimental Ag-Pd-Au-Cu alloys with low Pd content of 10 or 12%. Dent Mater J. 25(2): 316-331, 2006

[学会発表] (計 12 件)

- ① 平 雅之, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 根津尚史, 荒木吉馬. マクロファージ(PMA 刺激THP-1 細胞)によるサブマイクロン・チタン微粒子の貪食評価. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008. 2008 年 11 月 18 日, 東京

- ② Taira M, Kagiya T, Harada H, Sasaki M, Kimura S, Araki Y. Effects of high-concentration ID10% copper ions on macrophage. Academy of Dental Materials 2008 Conference. Oct 2, 2008, Wuerzburg, Germany
- ③ 平 雅之, 鍵谷忠慶, 原田英光, 佐々木実, 木村重信. 高濃度銅イオンによるマクロファージの細胞形態変化と障害作用の評価. 第50回歯科基礎医学会学術大会. 2008年9月25日, 東京
- ④ 平 雅之, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 根津尚史, 荒木吉馬: チタン微粒子を貪食したマクロファージのDNAアレルギーチップによる遺伝子発現評価. 第52回日本歯科理工学会学術講演会. 2008年9月21日, 吹田市
- ⑤ Taira M, Nezu T, Sasaki M, Kimura S, Kagiya T, Harada H, Narushima T, Araki Y. Gene expression analyses of human macrophage phagocytizing sub- μ titanium particles by allergy DNA chip (Genopal™). International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes ISNT2008. June 16, 2008, Sapporo, Japan
- ⑥ 平 雅之, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 根津尚史, 荒木吉馬. PMA刺激THP-1細胞(マクロファージ)によるチタン・サブミクロン微粒子の貪食評価. 第51回日本歯科理工学会学術講演会. 2008年4月27日, 鶴見
- ⑦ Taira M, Sasaki M, Kimura S, Araki Y. Macrophage reaction against sub- μ m titanium particles. 2007 Annual Meeting of Academy Dental Materials. Oct. 22, 2007, Fort Lauderdale, U.S.A
- ⑧ 平 雅之, 佐々木実, 木村重信. マウス多形核白血球の活性酸素産生に及ぼすフォルボールエステル、オプソニン化ゼイモザンとニッケルイオンの影響. 第49回歯科基礎医学会学術大会. 2007年8月31日, 札幌
- ⑨ Taira M, Narushima T, Araki Y. Cellular reaction of macrophage RAW 264 cells against 1ppm element Ti in culture medium. 6th International Symposium on Titanium in Dentistry. June 5, 2007, Kyoto, Japan
- ⑩ 平 雅之, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 根津尚史, 荒木吉馬. LD50濃度TEGDMAがLPS活性化ヒト単球細胞THP-1のゲノムワイド遺伝子発現に及ぼす影響評価. 第48回日本歯科理工学会学術講演会. 2006年10月28日, 名古屋

- ⑪ 平 雅之, 荒木吉馬. チタンマイクロ粒子およびチタンイオンがマクロファージ様RAW264細胞に及ぼす影響評価. 第4回日本再生歯科医学会. 2006年9月10日, 大阪
- ⑫ 平 雅之, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 根津尚史, 荒木吉馬, 成島尚之. PIXE法による細胞培養液とチタンイオン貪食マクロファージRAW264の元素分析. 第47回日本歯科理工学会学術講演会. 2006年4月23日, 東京

〔その他〕
ホームページ
<http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/dmst/index-j.htm>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号:60179398

(2) 研究分担者
荒木 吉馬 (ARAKI YOSHIMA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号:20005036

根津 尚史 (NEZU TAKASHI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号:40264056

佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号:40187133

(3) 連携研究者
荒木 吉馬 (ARAKI YOSHIMA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号:20005036

根津 尚史 (NEZU TAKASHI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号:40264056

佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号:40187133