

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6月15日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791903

研究課題名（和文） 抗酸化アミノ酸誘導体によるベータ型リン酸三カルシウム骨補填材の生体親和性の向上

研究課題名（英文） Enhancement of biocompatibility of beta-tricalcium phosphate bone substitute by anti-oxidant amino acid derivative

研究代表者

山田 将博（YAMADA MASAHIRO）

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90549982

研究成果の概要（和文）：抗酸化アミノ酸誘導体であるN-アセチルシステイン(NAC)を応用することで、 β 型リン酸三カルシウム (β -TCP) 上の骨芽細胞の生存活性と機能発現は改善した。NACは β -TCP上の骨再生を亢進させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Osteoblastic viability and functional expression on beta-tricalcium phosphate (β -TCP) were improved by application of anti-oxidant amino acid derivative, N-acetyl cysteine (NAC), on the material. It was indicated that NAC enhanced bone regeneration on β -TCP material.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：顎顔面補綴学

1. 研究開始当初の背景

(1)ベータ型リン酸三カルシウム顆粒(β -TCP)は生体吸収性人工合成骨補填材として注目されている一方で、その骨親和性は十分に証明されておらず、酸化ストレスと関連して細胞に有害反応を引き起こす可能性が示されている。

(2)近年、研究代表者らは抗酸化アミノ酸誘導体であるN-アセチルシステイン(NAC)の応用により、酸化ストレスに関連した細胞有害性を発揮する生体材料の解毒に成功した

2. 研究の目的

NACを応用することで、 β -TCP骨補填材

料の骨芽細胞に対する親和性は向上するかどうかを検証すること。

3. 研究の方法

ラット頭蓋由来初代継代骨芽細胞を用いた培養研究を行う。NAC添加、未添加 β -TCP顆粒上に播種し、一定期間培養後、細胞接着、細胞増殖能、骨関連基質遺伝子発現、骨芽細胞表現型発現の解析を行い、 β -TCPへのNAC添加が骨芽細胞機能へ与える影響に関して細胞生物学的に評価する。また、酸化ストレスマーカーの定量を行い、NACの添加が β -TCPによる骨芽細胞に加えられた酸化ストレスを減弱するか検証する。

4. 研究成果

(1) 播種 1 日後の未添加β-TCP顆粒上の細胞生存率は 20%程度だったのに対し、NAC添加β-TCP上では 40%だった。また、β-TCP顆粒上では約 80%の細胞がネクローシスに陥ったが、NACを顆粒へ添加したことで、その値が 20%減少した。

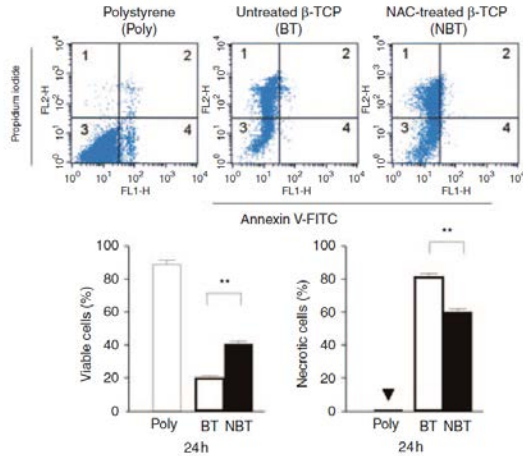


図 1 アネキシンV-プロピディウムイオダイド蛍光染色フローサイトメトリーを用いた、培養 1 日後のポリスチレン培養皿、β-TCP顆粒またはNAC前処理後のβ-TCP顆粒上の細胞生存活性とアポトーシス分析結果

(2) 播種 1 日後のNAC添加β-TCP上の接着細胞数は未添加β-TCP顆粒上に比べて 20%増加した。培養 7 日後のALP染色陽性面積率は未添加β-TCP上で 4%未満だったのに対し、NAC添加β-TCP上では 50%にまで達した。

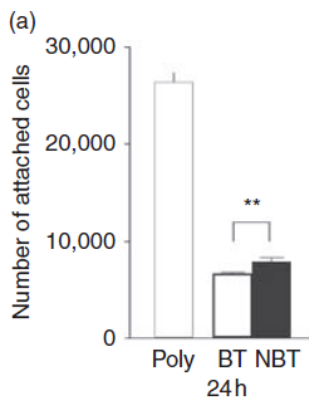


図 2 培養 1 日後のポリスチレン培養皿、β-TCP顆粒またはNAC前処理後のβ-TCP顆粒上の接着細胞数(cells/cm²)

(3) 播種 1 日後の細胞内ROSレベルは未添加β-TCP上ではポリスチレン培養皿の 16 倍に達した。しかし、NACをβ-TCPにあらかじめ添加することで、その値は半分となった。

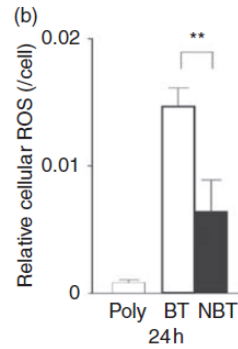


図 3 培養 1 日後のポリスチレン培養皿、β-TCP顆粒またはNAC前処理後のβ-TCP顆粒上の細胞内ROSレベル(DCFDA蛍光強度)

(4) 播種 5 日後のALP染色の陽性反応はβ-TCP上でほとんど検出されなかった。しかし、NACで前処理することで、β-TCP顆粒状のALP活性は著明に亢進した。ALP陽性面積率はβ-TCP上で 4%未満だったのに対し、NACを前処理することで、β-TCP上のALP陽性面積率は 50%まで上昇した。

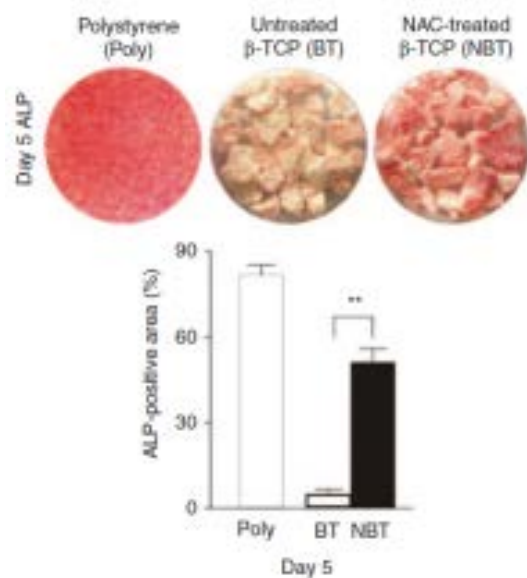


図 4 培養 5 日後のポリスチレン培養皿、β-TCP顆粒またはNAC前処理後のβ-TCP顆粒上のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性

(5) β-TCP顆粒と非接触状態で、ポリスチレン培養皿上で共培養し、播種 1 日後の細胞生存率ならびに細胞内ROSレベルを測定したところ、未添加β-TCP顆粒下の骨芽細胞の生存率は 90%未満となった。一方、NACを顆粒へ添加すると、その値は 95%程度となり、β-TCP顆粒との非共培養下での値と同程度となった。β-TCP顆粒下では、非接触状態にもかかわらず、12%程度の骨芽細胞がアポトーシスに陥った。NACを顆粒へ添加することで、その値は約半分となった。

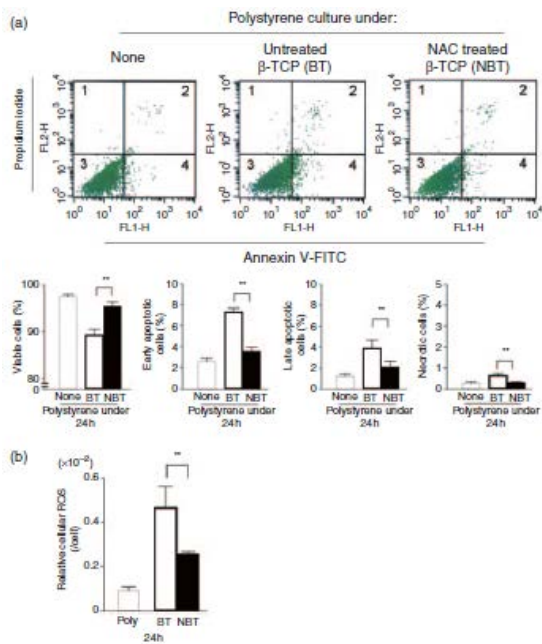


図 5 β-TCP顆粒またはNAC前処理後のβ-TCP顆粒と非接触式共培養状況下または、非共培養状況下での培養1日後のポリスチレン培養皿上のアネキシンV-プロピディウムイオダイド蛍光染色フローサイトメトリーを用いた細胞生存活性とアポトーシス分析結果(a)ならびに細胞内ROSレベル測定結果(b)

(6) これら結果から、NACを応用することで、β-TCP上の骨芽細胞の生存活性と機能発現は改善し、その結果、β-TCP上の骨再生は亢進することが細胞生物学的に示唆された。NACはすでに医薬品や化粧品の成分として使用されている化合物であり、また、廉価であるため、その臨床応用実現の可能性は潜在的に高い。補綴前処置として行われる骨増生において高い臨床的効果を有し、インプラント補綴をはじめとした顎顔面機能再建の適応拡大、治療効果の向上へと繋がり、また、理論的根拠の高い、明解な細胞生物学的機序が示された、実現性の高い骨補填材機能亢進技術の開発が期待される。

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12件)

① 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、査読有、J Biomater Appl.、In press、10.1177/0885328210383598

② Yamada M, Ishihara K, Ogawa T, Sakurai K、The inhibition of infection by wound pathogens on scaffold in tissue-forming process using N-acetyl cysteine、査読有、Biomaterials、32 巻、2011、8474-85、10.1016/j.biomaterials.2011.07.074

③ Yamada M, Kojima N, Att W, Minamikawa H, Sakurai K, Ogawa T、Improvement in the osteoblastic cellular response to a commercial collagen membrane and demineralized freeze-dried bone by an amino acid derivative: an in vitro study、査読有、Clin Oral Implants Res.、22 巻、2011、165-72、doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01975.x.

④ 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、査読有、Int J Oral Maxillofac Implants.、25 巻、2010、939-46

⑤ Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, Ogawa T、Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate、査読有、J Endod.、37 巻、2011、637-41

⑥ 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、査読有、Biomaterials、31 巻、2010、7213-25

[学会発表] (計12件)

① Yamada M. Amino Acid-derivative Mediated Multifunctionalization of PMMA and Bone Substitute the 88th General Session and Exhibition of the IADR、2010.07.15、Barcelona.、Spain

② Yamada M. Amino-acid Derivative-mediated Multifunctionalization of Biomaterial for BoneRegeneration BIT Life Sciences' 8th Annual Congress of International Drug Discovery Science and Technology、2010.10.24、Beijing、China

③ 山田将博 組織再生を促す抗酸化アミノ酸誘導体による生体材料の多機能化 第64回日本酸化ストレス学会学術集会シン

ポジウム、2011年7月3日、北海道

〔図書〕(計1件)

①山田将博, 他、医学情報社
インプラント周囲炎を治療する-エビデンス
に基づく診断・治療とリスクコントロール-、
2011、221

〔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
東京歯科大学HRCプロジェクト研究
HRC第8プロジェクト・免疫機能・トランス
レーショナル研究グループホームページ
<http://www.tdc.ac.jp/dept/osc/hrc8/hrc8g2ac.html>

東京歯科大学有床義歯補綴学講座ホームペ
ージ
<http://www.tdc.ac.jp/dept/rpg/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
山田将博 (YAMADA MASAHIRO)

研究者番号：90549982

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号：