

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462953

研究課題名(和文) MMP活性を抑制する金属ナノ粒子添加レジン材料の開発

研究課題名(英文) Development of metal nanoparticles contained resin material that inhibit MMP activity

研究代表者

橋本 正則 (Hashimoto, Masanori)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00337164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 金属ナノ粒子の歯科用接着性レジンの添加物としての応用の可能性を調べるため、ナノ粒子のMMP阻害作用(MMP assay)と細胞毒性(WST-8, LDH)を評価した。また、ナノ粒子をレジン材料に添加した場合の物性の変化を熱機械分析装置で評価した。多くのナノ粒子は、比較的低濃度で、MMP活性を阻害した。ナノ粒子がMMPの活性中心である亜鉛イオンとキレート結合してMMP活性を阻害する。レジンにナノ粒子を添加することにより物性は上昇した。ナノ粒子はMMP阻害作用があり、レジンの物性を向上させるが、一部の金属ナノ粒子(金ナノ粒子など)は細胞毒性を有しないため歯科臨床応用に魅力的な材料である。

研究成果の概要(英文)： This study evaluated the inhibition of MMPs and toxicity of nanoparticles (NPs) as possible compounds for use in dental adhesives. The MMP assay for studying the interaction of MMPs and nanoparticles (NPs) was evaluated. The cellular responses to NPs were examined using cytotoxic assay. The mechanical properties of the experimental resin loaded with NPs were examined using thermomechanical analysis. Many NPs inhibited MMP activity at relatively low concentrations. The NPs inhibit MMPs by chelating with the Zn²⁺ bound in the active sites of MMPs. The mechanical properties of the resins increased when NPs were added in resins. NPs are attractive candidates for dental materials to inhibit MMPs and improve the mechanical properties of resins without cytotoxic effects to cells.

研究分野： 歯科理工学

キーワード： ナノ粒子 MMP阻害剤 細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

金属ナノ粒子はコアメタルを中心に、その周囲は被覆材であるポリマーなどの高分子で構成されている。被覆材であるポリマーの末端にはカルボキシル基やアミノ基が配置され、粒子表面は正または負に電荷している。そうすることにより、金属ナノ粒子は水中での分散性を獲得できる。一方、MMP(matrix metalloprotease)などの酵素はその構造に活性中心である金属イオンが配置され、周囲はタンパク質やアミノ酸で構成されている。この両者の構造を比較すると、金属ナノ粒子は酵素に類似した構造を有する、いわゆる生物模倣性がある。このため、各種酵素と結合し、その作用を不活化する機能を有する可能性がある。

近年、歯科領域において、レジン・象牙質接着界面の劣化に関与する因子として MMP の存在が指摘されている。MMP は、樹脂含浸層内のコラーゲン線維の加水分解を誘発し劣化を促進する。そのため、接着界面の長期耐久性向上を目的に、生体安全性の高い MMP 阻害剤を模索する研究が数多く行われている。

2. 研究の目的

金属ナノ粒子の MMP 活性の阻害作用を中心に細胞に惹起される毒性や炎症性反応などの各種特性を調べ、歯科材料としての応用の可能性を検討した。歯科材料としての理想的な金属ナノ粒子は、MMP 活性を阻害し、細胞・遺伝毒性を引き起こすことなく、レジんに添加した場合、レジン硬化体の物性を低下させないことが望ましい。

3. 研究の方法

金属ナノ粒子のキャラクタリゼーション

合成されたナノ粒子を透過型電子顕微鏡 (TEM) (H-7100, Hitachi, Tokyo, Japan) による形態観察および粒度分布の計測、表面電荷をゼータ電位計 (ELSZ-2, Otsuka Electronics, Osaka, Japan) にて測定その他、UV-vis 計測機 (V-550, Jasco, Tokyo, Japan) などにより行った (結果は省略)。

金属ナノ粒子の緒性質

- ・MMP アッセイ (MMP assay kit およびザイモグラフィー)
- ・細胞毒性試験 (WST-8, LDH assay)
- ・遺伝毒性試験 (小核・変形核分析およびコメットアッセイ)
- ・炎症性反応試験 (PT-qPCR)
- ・形態観察 (走査型 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察)

以上の実験系から金属ナノ粒子の様々な性質を調べた。

(実験1)

歯科用接着性レジンの添加物としての応用の可能性を調べるため、ナノ粒子の MMP 阻害作用 (MMP assay kit) (Sensolyte assay kit, AnaSpec, San Jose, CA, USA) と細胞毒性 (WST-8 assay) (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan) を評価した。

蛍光色素を用いた MMP アッセイで金属ナノ粒子の MMP 阻害作用を調べた。細胞毒性試験によりナノ粒子に対する細胞 (RWW264) の反応を調べた。96 ウエルプレートに播種された細胞に対して各種濃度のナノ粒子を暴露することにより実験を行った。ペプチドに蛍光色素と消光剤が結合している。そこに、MMP などの酵素が反応することにより、蛍光色素と消光剤が離れ、発光する原理を応用してマイクロプレートリーダー (1420 Multilabel Counter ARVOMX, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて MMP 活性を定量化する。細胞の炎症性反応は TNF- α , IL-1 を炎症性マーカーとして RT-qPCR (StepOne; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) で調べた。

(実験2)

金属ナノ粒子暴露後の細胞の透過型電子顕微鏡 (TEM) (H-7100, Hitachi, Tokyo, Japan) 観察

金属ナノ粒子暴露後における、粒子の細胞内局在 (L929 および RAW264) を調べるため超薄切片を作成し TEM により観察した。

(実験3)

金属ナノ粒子暴露後のコメットアッセイによる細胞の遺伝毒性評価

金属ナノ粒子が細胞核に与える影響をコメットアッセイ (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA) により評価した。

細胞核を DAPI および Hoechst33342 などの蛍光色素にて染色することにより蛍光顕微鏡 (TS1200-E, Nikon, Tokyo, Japan) にて小核および変形核の比率から、遺伝毒性を評価した (結果は省略)。

(実験4)

金属ナノ粒子をレジン材料に添加した場合の物性の变化を熱機械分析装置 (SII TMA/SS6200 instrument, Seiko Instrument) で評価した。アクリルレジン (Bis-GMA (30 wt%) および TEGDMA (70 wt%)) の標準的な接着性レジン (想定したもの) を使用。そのレジンに 2.5 wt% の金属ナノ粒子を添加したものを実験に供した。そのレジン硬化体 (直径 5.0 mm、厚さ 0.7 mm) の材料に力を負荷して物性を評価した。

(実験 1 - 4 までの結果・考察)

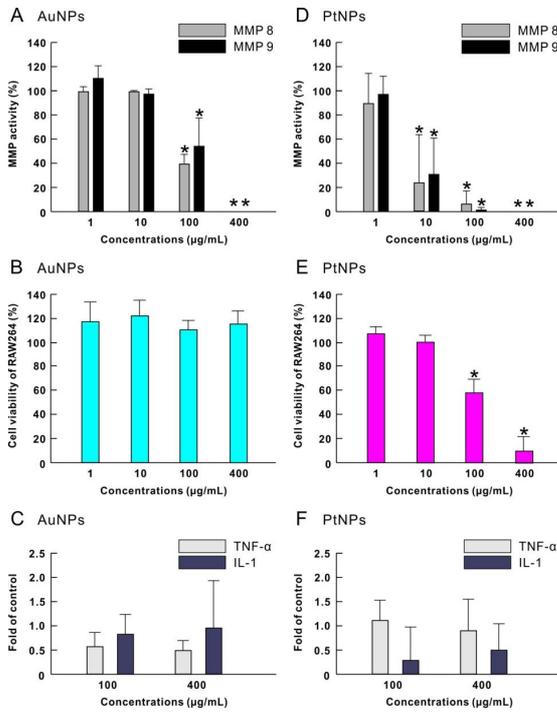


図 1 : MMP 阻害作用 (A) 細胞毒性 (B) および炎症性反応 (C) の結果を表に示す。
(Hashimoto *et al.* J Dent Res, 2015)

(実験 1 の結果・考察)

金ナノ粒子 (AuNPs) では 100 $\mu\text{g/mL}$ 濃度で MMP の阻害作用が認められるが (図 1 A)、白金ナノ粒子 (PtNPs) では 10 $\mu\text{g/mL}$ 程度でも、その阻害作用は大きい (図 1 D)。白金ナノ粒子の MMP 阻害効果は大きいですが、細胞毒性も発現してしまう。しかし、金ナノ粒子では 400 $\mu\text{g/mL}$ でも、細胞毒性を発現しないことから臨床使用に適していると考えられる (図 1 B)。細胞毒性の発現は金属ナノ粒子が細胞内に侵入、リソソームに取り込まれ、リソソーム内でコアマタルから副産物が産生されるが、この副産物がミトコンドリアの活性酸素種 (ROS) の過剰生成をもたらす細胞内小器官の機能不全を引き起こす。これら一連の減少は“トロイの木馬効果”と呼ばれる。一方、MMP 阻害に関する部位はコアマタルを被覆するコーティング材であることから、効果の発現部位が異なる。この相違を利用することにより、毒性を発現しない MMP 阻害剤を作ることができる。しかし、わずかながら炎症性反応の発現 (TNF- α および IL-1 の発現増加) が認められることから (図 1 C) 細胞毒性の発現と炎症性反応の惹起の関連性について継続した研究が必要である。

(実験 2 の結果・考察)

細胞内に取り込まれたナノ粒子は主にリ

ソソーム内に局在するが、一部、細胞質内にも存在している。しかし、核内に存在することはなく、そのため遺伝毒性の発現などは少ないと考えられる。しかし、ナノ粒子の粒子径が 10 nm 以下になる場合、核膜を透過し核内への侵入が形態的にも認められ、重篤な細胞・遺伝毒性を発現するという報告もある。よって、個々の新規金属ナノ粒子に対して詳細なスクリーニングが必要である。

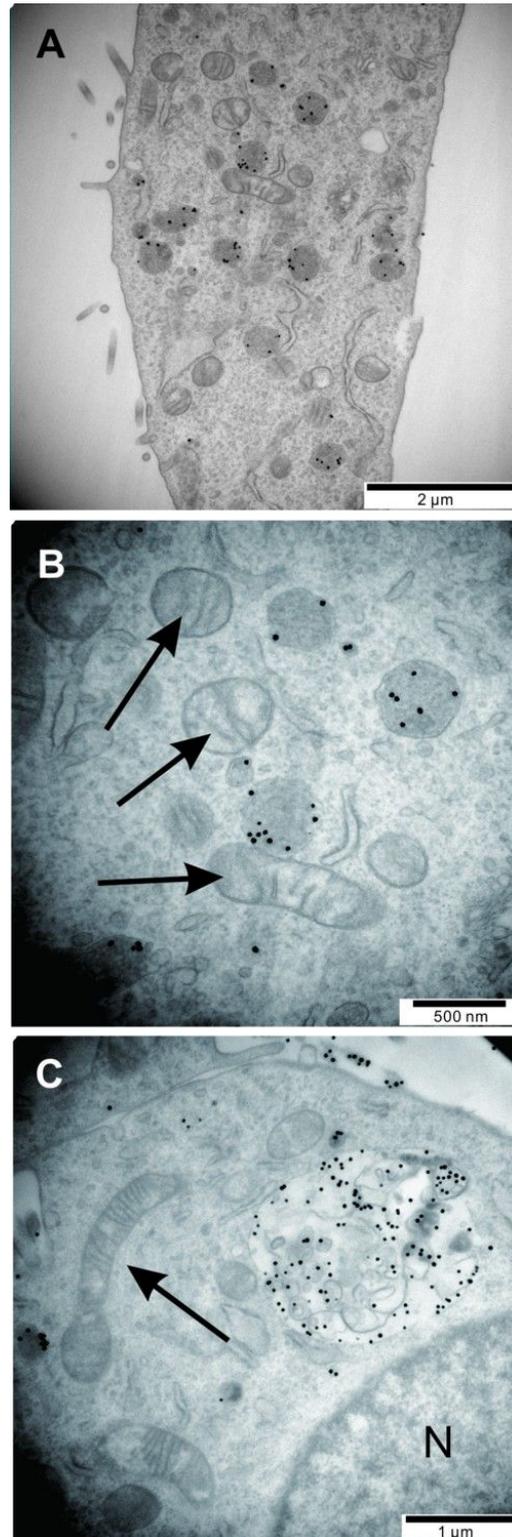


図 2 : 白金ナノ粒子の L929 線維芽細胞内

での局在の透過型電子顕微鏡像
(Hashimoto *et al.* Eur J Oral Sci, 2016)

(実験3の結果・考察)

我々はポリマー被覆された金属ナノ粒子と細胞の遺伝毒性との関係を小核分析、変形核分析およびコメットアッセイを使用して調査した。図3にコメットアッセイの結果を示すが、白金ナノ粒子 (PtPAANPs) で遺伝毒性が発現し2種のナノ粒子、クエン酸で被覆された金ナノ粒子 (AuCANPs) およびカルボキシフェニル基で被覆された金ナノ粒子 (AuCPNPs) では、遺伝毒性の発現は認められない。この結果は細胞毒性試験の結果と類似する。しかし、細胞毒性試験では安全であるが、遺伝毒性が認められる材料では、隠れた障害性を人体に及ぼす場合があるため注意が必要であり、細胞毒性と遺伝毒性は同時に評価すべきである。

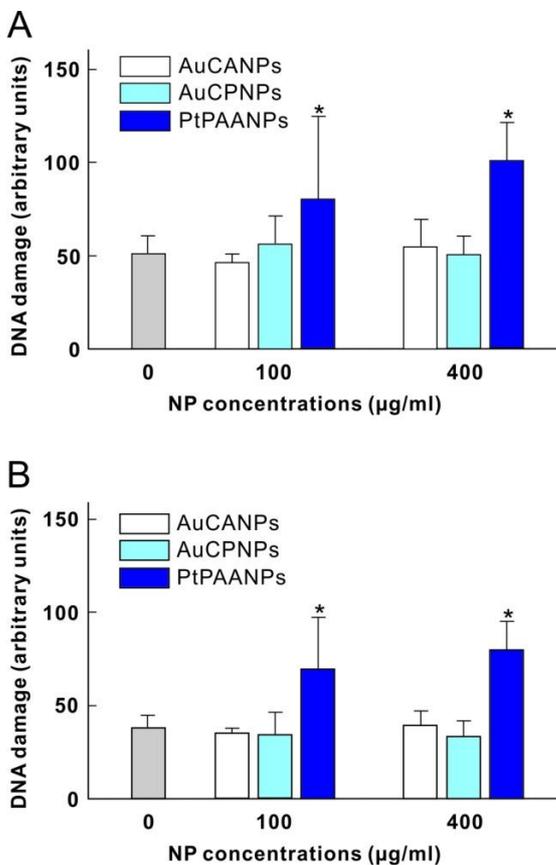


図3：3種ナノ粒子を使用した場合でのL929線維芽細胞 (A) と RAW264 細胞 (B) に対する遺伝毒性の発現 (コメットアッセイによる) (Hashimoto *et al.* J Biomed Mater Res A, 2016)

(実験4の結果・考察)

3種類の内、2種類の粒子にて物性は有意に向上した ($p < 0.05$)。この結果は、有限要素解析を用いた場合でも同様であった (日本

歯科保存学会にて発表)。それら機械的性質に対する結果はある程度、予測できたが、ポリマー被覆材によっては、アクリルレジンの重合阻害材として機能するものもあり、その場合、レジンは未硬化となるため設計には注意が必要である。

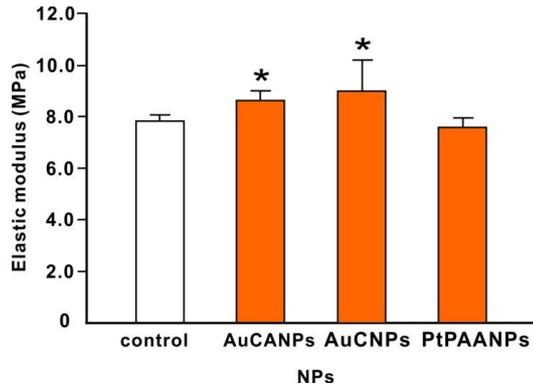


図4：アクリルレジんに3種金属ナノ粒子を添加した場合の物性の変化
(Hashimoto *et al.* J Biomed Mater Res A, 2016)

4. 研究成果

多くの金属ナノ粒子は、比較的低濃度で、MMP 活性を阻害した。さらに金属ナノ粒子の粒径が小さくなるほど、その効果は大きくなる。これはナノ材料の単位重量当たりの表面積が大きくなる、いわゆる“表面効果”に起因している。これについても実験的に確認済みである (Hashimoto *et al.* J Biomed Tissue Eng, 2017)。金属ナノ粒子が MMP の活性中心である亜鉛イオンとキレート結合することにより、MMP 活性を阻害すると考えられている。その他、金属ナノ粒子と MMP の結合より MMP の mobility が変化することによる機能低下や MMP とナノ粒子の凝集により機能を発現する MMP の数の減少などの原因が考えられる。また、コラーゲン基質などと結合することによりコラーゲン線維間の架橋剤として機能している可能性もある。さらにナノ粒子が分解される基質に結合することにより MMP の結合を阻害する拮抗阻害の影響も考えられる。アクリルレジんにナノ粒子を添加することにより、物性はわずかではあるが上昇した。ナノ粒子は MMP 阻害作用があり、レジンの物性を向上させるが、一部の金属ナノ粒子 (金ナノ粒子など) は細胞毒性を有しないため歯科材料として魅力的な材料である。

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8件)

1. Hashimoto M, Toshima H, Yonezawa T, Kawai K, Narushima T, Kaga M, Endo K.
Responses of RAW264.7 macrophages to water-dispersible gold and silver nanoparticles stabilized by metal-carbon σ -bonds.
J Biomed Mater Res: A 102(6): 1838-1849, 2014.
2. Hashimoto M, Toshima H, Yonezawa T, Kawai K, Iijima M, Endo K.
Evaluation of silver nanoparticle toxicity to RAW264.7 cells in a three-dimensional cell culture.
J Biomater Tiss Eng 4(1): 1-8, 2014.
3. Hashimoto M, Imazato S.
Cytotoxic and genotoxic characterization of aluminum and silicon oxide nanoparticles in macrophages.
Dent Mater 31(5): 556-564, 2015.
4. Hashimoto M, Sasaki J.I, Yamaguchi S, Kawai K, Kawakami H, Iwasaki Y, Imazato S.
Gold nanoparticles inhibit matrix metalloproteases without cytotoxicity.
J Dent Res 94(8): 1085-1091, 2015.
5. Hashimoto M, Yamaguchi S, Sasaki J, Kawai K, Kawakami H, Iwasaki Y, Imazato S.
Inhibition of matrix metalloproteases and toxicity of gold and platinum nanoparticles in L929 fibroblast cells.
Eur J Oral Sci 124(1): 68-74, 2016
6. Hashimoto M, Kawai K, Kawakami H, Imazato S.
Matrix metalloproteases inhibition and biocompatibility of gold and platinum nanoparticles.
J Biomed Mater Res: A 104(1): 209-217, 2016.
7. Hashimoto M, Sasaki J, Imazato S.
Investigation of aluminum oxide nanoparticles and nanowires and their localization in L929 fibroblasts and RAW264 macrophages.
J Biomed Mater Res: B 104(2): 241-252, 2016.
8. Hashimoto M, Kawakami H, Kawai K, Imazato S.
Effect of particle size of gold nanoparticles on matrix metalloprotease inhibition, cytotoxicity and genotoxicity.
J Biomater Tiss Eng 7(2): 139-146, 2017.

〔学会発表〕(計6件)

1. 橋本正則、佐々木淳一、今里 聡。
金および白金ナノ粒子の MMP-8, 9 に対する抑制作用と細胞毒性
第 65 回日本歯科理工学会学術講演会(4月11日、2015、仙台市)
2. 橋本正則、佐々木淳一、山口 哲、今里 聡
金および白金ナノ粒子の MMP-1 抑制効果と線維芽細胞に対する毒性作用
日本歯科保存学会 2015 年春期学術大会(第142回)(6月26日、2015、小倉市)
3. 川上隼人、河合功治、橋本正則、今里 聡
貴金属ナノ粒子を添加した高弾性率な樹脂材料の開発
第 37 回日本バイオマテリアル学会大会(11月9日、2015、京都市)
4. 橋本正則、川上隼人、河合功治、岩崎泰彦、今里 聡
金および白金ナノ粒子の MMP 活性抑制効果および細胞・遺伝毒性
第 37 回日本バイオマテリアル学会大会(11月10日、2015、京都市)
5. 川上隼人、河合功治、橋本正則、今里 聡
金属ナノ粒子を添加した高弾性率、抗菌性および抗酸化性を有する樹脂材料の開発
第 67 回日本歯科理工学会学術講演会(4月16日、2016、福岡市)
6. 橋本正則、川上隼人、河合功治、今里 聡
金ナノ粒子の粒径が MMP 阻害活性および細胞・遺伝毒性に与える影響
第 67 回日本歯科理工学会学術講演会(4月16日、2016、福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：金微粒子マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤

発明者：橋本正則

権利者：橋本正則、今里 聡、川上隼人、河合功治

種類：特願

番号：2015-011377

出願年月日：平成 27 年 1 月 21 日

国内外の別：国内

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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本正則 (Hashimoto, Masanori)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：00337164

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

川上隼人 (Kawakami, Hayato)
河合功治 (Kawai, Koji)