

学 位 論 文 題 名

Development of multi-functional dental materials using an amino acid derivative

(アミノ酸誘導体を用いた多機能型歯科材料の開発)

学位論文内容の要旨

【目的】近年、歯科材料が周囲組織/細胞に及ぼす為害作用と細胞に加わる酸化ストレスとの関連性が指摘されている。抗酸化システイン誘導体である *N*-アセチルシステイン (NAC) は、細胞内に取り込まれてジアセチル化され、グルタチオン (GSH) の前駆体である *L*-システインとなる。このため、NAC は直接的抗酸化能を示すだけでなく、GSH を細胞内に供給することで、細胞内のレドックスシステムを改善する。レジン材料など一部の歯科材料は歯髄細胞に酸化ストレスと関連した為害作用を及ぼすことが知られており、NAC を歯科材料に添加することにより、その作用を減弱あるいは消去できる可能性がある。本研究の目的は、歯科材料に NAC を応用することによって歯科材料由来の歯髄細胞為害作用を減弱あるいは消去することができるかを検討することである。

【材料と方法】

第一部：Mineral Trioxide Aggregate (MTA)のラット歯髄株化細胞への影響

細胞はラット歯髄株化細胞 (RPC-C2A) を用い、被験材料として MTA (ProRoot MTA, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK)を使用した。RPC-C2A に MTA 抽出液を作用させて、NF- κ B 活性化、iNOS ならびにシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) mRNA 発現、プロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生を調べた。

第二部：MTA 上で培養したラット歯髄細胞に対する NAC の効果

細胞は 8 週齢の Sprague-Dawley ラットの顎切歯から分離培養したラット歯髄初代培養細胞を用いた。MTA を 12-well 細胞培養皿底面で硬化させた。その MTA 上にラット歯髄初代培養細胞を播種し、培養液中に NAC を添加したものを実験群、NAC を添加していないものを対照群とした。播種後 24 時間の細胞数、細胞伸展、細胞内活性酸素種 (ROS) の産生量ならびに GSH 量を検討した。

第三部：NAC によるレジン添加型グラスアイオノマーセメント(RMGI)の無毒化と多機能化

被験材料として、RMGI (Fuji LC II, GC America, Alsip, IL) を使用した。RMGI に NAC を配合したものを実験群とし、RMGI を対照群とした。実験群および対照群を 12-well 細胞培養皿底面で硬化させ、そのサンプル上にラット歯髄初代培養細胞を播種し、初期細胞接着数、細胞生存率、細胞伸展、増殖能力、炎症性サイトカイン、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化関連遺伝子 (I 型コラーゲン、オステオポンチン (OP)、オステオカルシン (OC)) ならびに OP、OC タンパク質の発現、ROS の産生量、GSH 量を検討した。

【結果と考察】

第一部：MTA 抽出液により細胞の PGE_2 産生量が培養 3、6、12 時間後と経時的に増加した。また、MTA 抽出液を作用させることにより、対照群とくらべて有意に PGE_2 産出量の増加が確認された。さらに、MTA 抽出液を作用させることにより COX-2、iNOS の遺伝子発現が誘導されることを RT-PCR 法により確認した。COX-2 発現には細胞内情報伝達系の NF- κ B の関与が示されている。ウエスタンブロッティング法により、NF- κ B のサブユニットである p65、p50、RelB、また I κ B α 、pI κ B α の発現を確認しところ、MTA 抽出液を作用させることにより p65、p50、RelB 発現の細胞質内での減少と核内での増加、また、I κ B 発現の減少、pI κ B 発現の増加が細胞質内で確認された。これにより、MTA 抽出液を作用させることで、細胞質内で I κ B α がリン酸化され NF- κ B の活性化が行われていることが示された。以上の結果より、MTA 抽出液を歯髄細胞に作用させることにより、NF- κ B が活性化されて COX-2 遺伝子が転写され、 PGE_2 産生量の増加に関与することが示唆された。

第二部：MTA 上で NAC を添加した培養液を用いてラット歯髄細胞を培養した。培養 24 時間後の MTA 上の細胞数を WST-1 法により測定すると、NAC を添加させた実験群では、対照群と比べて 60% 増加していた。また、ローダミン・ファロイジンにて細胞骨格を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。得られた画像を画像解析ソフト (Image J, NIH, Bethesda, MD) を用い細胞面積と周径を定量化した。細胞面積及び周径は NAC を添加した実験群では対照群と比べて 2 倍高い値を示した。比色検定法により測定した GSH 量は NAC 非添加の場合より 3.5 倍に増加した。また、細胞骨格と同時に共焦点レーザー顕微鏡で細胞内 ROS 産生を調べたところ、ROS は NAC 添加により減少した。以上のことより、NAC を培養液に添加することで MTA 上の細胞数や細胞伸展を改善することが明らかになった。この生物学的影響は NAC による細胞内レドックスシステムの改善が関係しているものだと考えられる。

第三部：初期細胞接着数を WST-1 法により検討したところ、材料上に接着していた実験群の細胞数は、対照群に比べて、培養 3 時間後で約 90%、培養 24 時間後で 60% 増加していた。さらに培養 24 時間後にフローサイトメトリー解析によ

り細胞生存率を検討したところ、NAC 含有 RMGI 上で培養された歯髄細胞は 73.3%生存したのに対し、RMGI 単独上では 46.7%しか生存しなかった。また、細胞骨格をローダミン・ファロイジンにて染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞伸展を検討したところ、培養 24 時間後で対照群ではほとんどの細胞が球形を示していたのに対し、実験群では、細胞伸展がみられ、また細胞内部でははっきりとアクチンファイバーが確認できた。Image J を用い細胞面積、周径、フェレの直径を定量化したところ、いずれにおいても、対照群に比べ実験群において有意に高い値が得られた。また、対照群において、増殖能力、ALP 活性、石灰化関連遺伝子ならびに OP、OC タンパク質の発現がいずれも抑制されたが、NAC 添加によりその活性、発現は有意に改善された。細胞の石灰化の評価は、培養 20 日後に、フォンコッサ染色、Ca 沈着量、走査型電子顕微鏡による石灰化物の観察ならびにエネルギー分散型 X 線分析を用い検討した。いずれの値においても対照群と比べ、実験群では 有意に高い値が得られた。これらの NAC による細胞挙動の改善は GSH 量の増加および ROS 産生量の減少と関係があると考えられる。また、より詳しい機序を調べるために、RMGI 硬化後、24 時間蒸留水に浸漬させてから細胞を播種した群と、硬化後すぐ細胞を播種した群で GSH 量を比較したところ、対照群では 24 時間後播種の群と、硬化後すぐ播種した群で GSH 量の差がなかったのに対し、NAC 含有の実験群では 24 時間後播種の群では、硬化後にすぐ播種した群に比べ GSH 量が減少していた。このことは NAC が RMGI から溶出し、細胞に取り込まれることにより GSH 量を増加させていると考えられる。また、RMGI 抽出液を培養液に添加し、さらに NAC を添加した群と、抽出液のみ作用させた群で WST-1 法により 3 時間後の細胞数を比較したところ、NAC を加えた群は、加えない群よりも 60%以上細胞数が増加していた。過去の文献から RMGI 抽出液には残留モノマーが溶出しており、それが細胞に為害性をもたらすことが分かっている。NAC は RMGI 抽出液の細胞為害性の改善にも効果があることが示唆された。以上の結果から、NAC が RMGI 自体の細胞毒性を低下させ、また、細胞の抗酸化能力を増加させることにより、RMGI の毒性を減少させて RMGI を多機能化することが示唆された。

【結論】NAC を応用することで、歯科材料の生体為害性を改善し、石灰化組織の再生を誘導する次世代歯科材料開発の可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Development of multi-functional dental materials using an amino acid derivative

(アミノ酸誘導体を用いた多機能型歯科材料の開発)

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。まず申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下の通りである。

近年、歯科材料が周囲組織/細胞に及ぼす有害作用と細胞に加わる酸化ストレスとの関連性が指摘されている。抗酸化システイン誘導体である N-アセチルシステイン (NAC) は、細胞内に取り込まれてジアセチル化され、グルタチオン (GSH) の前駆体である L-システインとなる。このため、NAC は直接的抗酸化能を示すだけでなく、GSH を細胞内に供給することで、細胞内のレドックスシステムを改善する。レジン材料など一部の歯科材料は歯髄細胞に酸化ストレスと関連した有害作用を及ぼすことが知られており、NAC-を歯科材料に添加することにより、その作用を減弱あるいは消去できる可能性がある。本研究は、歯科材料に NAC を応用することによって歯科材料由来の歯髄細胞有害作用を減弱あるいは消去することができるかを検討した。

被験材料として Mineral Trioxide Aggregate (MTA) ならびにレジン添加型グラスアイオノマーセメント (RMGI) を用いた。細胞はラット歯髄株化細胞 (RPC-C2A) ならびにラット歯髄初代培養細胞を用いた。RPC-C2A に MTA 抽出液を作用させて、NF- κ B 活性化、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) ならびにシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) mRNA 発現、プロスタグランジン E2 (PGE2) 産生を調べた。さらに、ラット歯髄初代培養細胞を用い歯科材料に NAC を作用させ、初期細胞接着数、細胞生存率、細胞伸展、増殖能力、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、石灰化関連遺伝子 (I 型コラーゲン、オステオポンチン (OP)、オステオカルシン (OC)) ならびに OP、OC タンパク質の発現、細胞内活性酸素種 (ROS) の産生量ならびに GSH 量を検討した。

MTA 抽出液を作用させることにより、対照群とくらべて有意に PGE2 産出量の増加が確認された。さらに、MTA 抽出液を作用させることにより COX-2、iNOS の遺伝子発現が誘導されることを RT-PCR 法により確認した。ウェスタンブロッティング法により、NF- κ B のサブユニットである p65、p50、RelB、また I κ B α 、pI κ B α の発現を確認し、MTA 抽出液を作用させることにより p65、p50、RelB 発現の細胞質内での減少と核内での増加、また、I κ B 発現の減少、pI κ B 発現の増加が細胞質内で確認された。このことから、MTA 抽出液を作用させることにより、細胞質内で I κ B α がリン酸化され NF- κ B の活性化が行われていることが示

唆された。以上の結果より、MTA 抽出液を歯髄細胞に作用させることにより、NF- κ B が活性化されて COX-2 遺伝子が転写され、PGE2 産生量の増加に関与することが示唆された。次に、MTA セメント上で抗酸化アミノ酸である NAC を添加した培養液を用いてラット歯髄細胞を培養した。細胞数ならびに GSH 量は NAC 非添加の場合より有意に増加した。また、細胞内 ROS 量は NAC 添加により減少した。さらに、ラット歯髄細胞を RMGI 上で培養すると初期細胞接着数、細胞生存率、細胞伸展、増殖能力、ALP 活性、石灰化関連遺伝子ならびに OP、OC タンパク質の発現がいずれも抑制されたが、NAC 添加により有意に改善された。細胞の石灰化も RMGI 単独では抑制されたが、NAC 添加によりその誘導が確認された。また、共焦点レーザー顕微鏡で細胞内 ROS 産生を調べたところ、ROS は NAC 添加により減少した。比色検定法により測定した GSH 量は NAC 非添加の場合より増加した。これらの NAC による細胞挙動の改善は GSH 量の増加および ROS 発生量の減少と関係あると考えられる。また、より詳しい機序を調べるために、RMGI 硬化後、24 時間蒸留水に浸漬させてから細胞を播種した群と、硬化後すぐ細胞を播種した群で GSH 量を比較したところ、NAC 含有の実験群では 24 時間後播種の群では、硬化後にすぐ播種した群に比べ GSH 量が減少していた。このことは NAC が RMGI から溶出し、細胞に取り込まれることにより GSH 量を増加させていると考えられる。以上の結果より NAC を応用することで、歯科材料の生体為害性を改善し、石灰化組織の再生を誘導する次世代歯科材料開発の可能性が示された。

口頭試問では、本論分の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

1. 研究を始めるきっかけについて
 2. MTAの組成について
 3. MTA抽出液の成分について
 4. クルクミン作用点について
 5. NACのROS除去の機序について
 6. グルタチオンの構成要素について
 7. 多機能型の定義について
 8. 今後の研究の展望について
- などであった。

以上の質問に対して申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答をとおして、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有していることが明らかになり、本研究のさらなる発展・今後の研究が期待された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与する十分な学識・資質を有しているものと認めた。