依 頼 論 文

◆特集：臨床イノベーションのための若手研究者の挑戦
バイオマテリアル・エンジニアリングの新たな展開

骨再生における多機能性分子としての抗酸化アミノ酸誘導体

山田　将博[a,b]，小川　隆広[c]，櫻井　　薫[a]

Anti-oxidant amino acid derivative as a multifunctional molecule for bone regeneration

Masahiro Yamada, DDS, PhD[a,b], Takahiro Ogawa, DDS, PhD[c] and Kaoru Sakurai, DDS, PhD[a]

抄　録
歯槽骨造成を達成するためには，骨再生を阻害する様々な因子を排除しつつ，同時に細胞の骨形成能を促進させる多機能性分子の応用が効果的と考えられる．我々の一連の研究により，小分子の抗酸化アミノ酸誘導体であるN- アセチルシス -L- テイン（NAC）は創傷感染予防効果，生体材料の細胞親和性向上効果および骨芽細胞の分化促進による骨再生加速効果を示すことが判明した．今回，NAC が示す多様な骨再生促進効果を供覧し，補綴前処置としての歯槽骨造成の新たなステージへと向かう，骨再生のための多機能性生体材料の可能性に関して，科学的認識の共有を図りたい．

Keyword
small compound, cytocompatibility, anti-infection, oteostimulation, smart material

I．研究の背景

重度歯周疾患や歯根破折などにより大きく歯槽骨を喪失すると，その後の補綴装置の機能性および審美性を著しく損なう．そのために，歯槽骨造成に関して，様々な材料の研究開発および臨床的取り組みがなされている．口腔内は狭小で，様々な外来刺激に曝される環境であるため，歯槽骨造成を達成するためには，骨再生を阻害する様々な因子を排除しつつ，同時に細胞の骨形成能を促進させる多機能性分子の応用が効果的と考えられる．

L- システインは唐辛子やニンニク，タマネギなどに含まれる天然の抗酸化アミノ酸であり，加工食品や化粧品，健康補助食品などに幅広く利用されている．その誘導体であるN- アセチル -L- システイン（NAC）は分子量 163.19 の小分子化合物であり，鎮咳剤として医学応用されている．NAC は直接的に活性酸素種（ROS）を消去する．また，NAC は水溶性であるが，比較的短時間で細胞膜の有機アニオントランスポーターを介して細胞内に取り込まれ[1]，代表的な細胞内抗酸化物質であるグルタチオンへと変化することで細胞の酸化ストレスに対する抵抗性を増大させる．このように NAC は細胞内外で機能する強力な抗酸化作用を示す．近年，この抗酸化機能により，NAC は生体材料の細胞親和性の向上[2-10]（図 1）や創傷感染予防[11]（図 2）などの骨再生促進の補助的な効果をもつことが示された．これら研究結果は，NAC は骨再生を促進する多機能性分子として機能することを示している．

本稿では，最近示された NAC 機能の 1 つである骨芽細胞機能向上効果[12] の概要を紹介し，補綴前処置としての歯槽骨造成の新たなステージへと向かう，骨再生のための多機能性生体材料の可能性に関して，科学的認識の共有を図りたい．

II．これまでの経緯と実績

NAC は骨芽細胞系細胞の基質産生能および石灰化能を向上させ，骨再生を加速させる．

デキサメタゾン非添加の細胞培養液でポリスチレン

[a] 東京歯科大学有床義歯補綴学講座
[b] 東京歯科大学口腔科学研究センター
[c] UCLA 歯学部先端補綴学講座ワイントロープセンター
[a] Department of Removable Prosthodontics and Gerodontology, Tokyo Dental College
[b] Oral Health Science Center, Tokyo Dental College
[c] The Weintraub Center for Reconstructive Biotechnology, Division of Advanced Prosthodontics, UCLA School of Dentistry

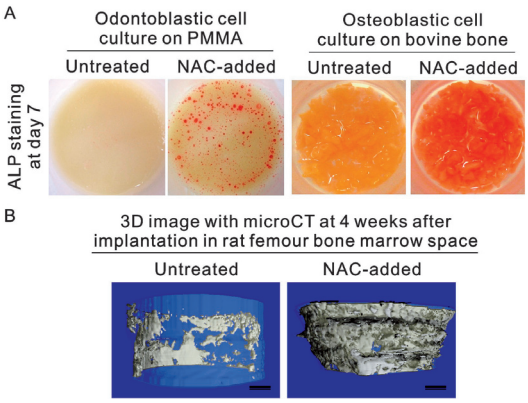

図1　（A）NAC含有もしくは非含有の歯科用即時重合レジンもしくは無機牛骨顆粒上でラット歯髄由来象牙芽細胞もしくは大腿骨由来骨芽細胞を7日間培養した後のアルカリフォスファターゼ(ALP)染色結果．Untreatedの材料上ではALP活性は抑制されているのに対し，NAC含有材料上では活発なALP活性がみられることに注意．（文献7および10より引用改変）（B）NAC含有もしくは非含有のメタクリル酸メチル共重合体（PMMA）骨セメントをラット大腿骨骨髄に埋入した4週後のマイクロCT三次元構築画像写真．半透明領域は骨セメントを，灰色から黒色部分は骨組織をそれぞれ表す．図中のバーは0.5㎜の長さを示す．Untreatedの骨セメント上では骨形成がまばらなのに対し，NAC含有骨セメント上ではほぼ全面を覆うほど新生骨形成が起こったことに注意．（文献4より引用改変）

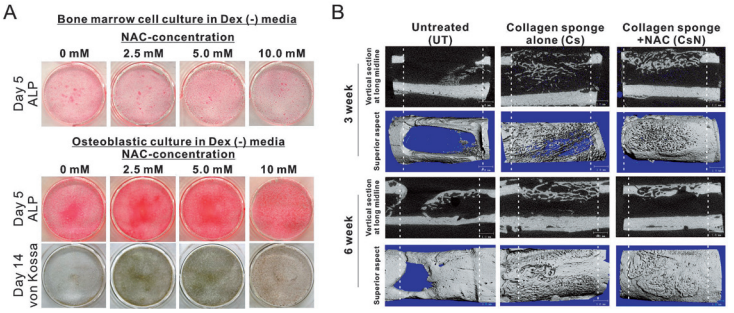

図3　（A）各種濃度（0，2.5，5.0および10 mM）でNACを添加したラット大腿骨由来骨髄間質細胞もしくは骨芽細胞における培養5日および14日後のアルカリフォスファターゼ（ALP）染色およびvon Kossa染色結果．デキサメタゾン非含有培地中での骨髄間質細胞（上段）および骨芽細胞培養（下段）をそれぞれ示す．（B）ラット大腿骨臨界サイズ皮質骨欠損内へNAC含有（CsN）もしくは非含有（Cs）コラーゲンスポンジを填入し，3週および6週後のマイクロCT解析結果．骨欠損部中央の2次元断層X線画像および3次元構築画像の骨欠損部上方面観をそれぞれ示す．最左側（UT）は，欠損内に何も填入しない群を示す．画像中のバーは1.0 mmを示す．（文献12より引用改変）

培養皿上へラット骨髄由来骨芽細胞もしくは骨髄間質細胞を播種し，各種濃度のNAC（0，2.5，5.0および10 mM）を添加した．その結果，NACは骨髄間質細胞のアルカリフォスファターゼ（ALP）活性には影響を与えない（図3A上段）が，適正濃度のNACは骨芽細胞のALP活性と石灰化基質産生を向上させることが示された（図3A下段）．デキサメタゾンは間葉系幹細胞から骨芽細胞系細胞への分化および骨芽細胞系細胞から成熟骨芽細胞への分化を促進する．それゆえ，NACは間葉系幹細胞から骨芽細胞系細胞への分化に影

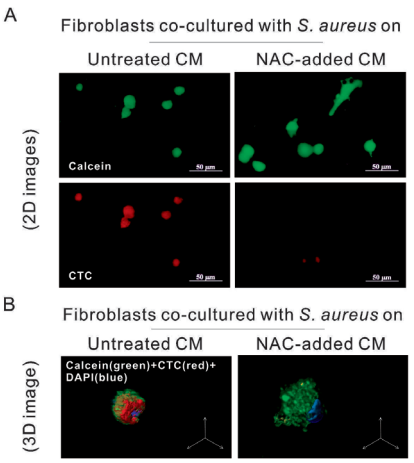

図2　NAC含有もしくは非含有コラーゲン膜(CM)上でCTC標識された黄色ブドウ球菌株と共培養1日後のラット歯肉線維芽細胞をCalcein染色し，共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した2次元画像（A）と3次元画像（B）．画像（A）中のバーは50 μmを，（B）中の3次元表示スケールの1辺は10 μmをそれぞれ示す．Untreated CM上では細胞内部は細菌で満たされたのに対し，NAC-added CM上では細胞内部への細菌侵入は起こらなかったことに注意．（文献11より引用改変）

響を及ぼさないが，骨芽細胞系細胞から成熟骨芽細胞への分化を促進および向上させると示唆された．

次に，NACの骨再生促進効果を検証するために，ラット大腿骨臨界サイズ（3.0 mm × 5.0 mm）皮質骨欠損内へNAC含有もしくは非含有のコラーゲンスポンジを填入し，6週後にマイクロCTによる評価を行ったところ，通常のコラーゲンスポンジを填入した欠損内には疎で不完全な骨再生しか観察されなかったのに対し，NAC含有コラーゲンスポンジを填入した骨欠損では骨再生が加速し，厚く，緻密で，連続性のある骨組織により欠損の閉鎖が認められた．これら結果から，NACは骨芽細胞系細胞の分化を活性化することで骨再生を加速させる分子として働くことが示された．

近年，小分子化合物を用いたアプローチが幹細胞医学や再生医学において注目を集めている．ある種の小分子化合物は幹細胞の自己複製能や分化を調節し[13]，前駆細胞や終末分化細胞の機能を調節することが示されている．小分子化合物を用いたアプローチは，標的タンパク質にピンポイントで作用することで迅速かつ濃度依存性に効果を示し[14]，また，単一で異なる種類の細胞を同時に調節できる可能性があるため[15]，リコンビナント成長因子の応用よりも優れた利点があると考えられている．NACは小分子化合物であり，細胞内に比較的速く（約2時間）取り込まれる[1]ため，骨補

填材料とともに混合し，骨欠損内へ填入する既存の術式に沿った方法で応用しやすいと推察される．また，骨再生には骨芽細胞だけでなく破骨細胞，免疫細胞，骨細胞，骨膜細胞，線維芽細胞，血管内非細胞などが複雑に関係し合う．未だ解明されていないが，NAC は細胞内に存在するいくつかの転写因子に直接作用する可能性が指摘されており[16]，それら転写因子は様々な細胞に遍在しているため，NAC は骨再生に関わる多くの細胞種に作用すると推察される．今後，NAC の骨再生において臨床有用性の高い薬物動態の証明や NAC による骨芽細胞系細胞の分化促進の細胞内機序の解明を行っていく．

Ⅲ．今後の展望

大きく分けて３つの展望がある．まず，NAC の骨再生促進効果に関する前臨床試験および臨床試験の実施である．NAC はすでに医学領域で臨床応用されており，歯科での局所応用は比較的し易いと推察される．２つ目として，NAC の細胞内標的分子と分子構造中の活性中心の同定である．これまで現象論として NAC の骨再生促進効果を示したが，その細胞生物学的裏付けとして，細胞内標的分子および NAC 分子構造中の活性中心の同定は非常に重要な課題である．それが達成されると，NAC よりも効果の大きい多機能性を発揮する新規合成分子の開発に繋がるであろう．また，抗酸化医学という新たな切り口で生体材料学や骨再生医学の発展に寄与することにも繋がる．３つ目として，NAC の多機能性を利用した歯槽骨造成術に使用する多機能性骨移植材料の開発である．様々な機能を付加された機能性材料は “smart material” と呼ばれる．現在，NAC を既存の骨補填材料などに混合するだけであるが，今後，NAC の分子構造中の活性中心が同定されれば，その官能基を骨補填材料へ付加することにより，骨再生を促進する様々な機能を発揮する “smart bone substitute” の開発が可能となるであろう．また，デンタルインプラントの表面改質処理としての応用も期待できる．未だその過程の入り口に過ぎないが，今後とも継続して研究を続けていき，歯槽骨造成にとって臨床有用性の高いマテリアルの開発を目指していく．

謝　辞

本研究に関連して，細菌学的試験に関して多大なるご助力およびご助言をいただきました，東京歯科大学微生物学講座・石原和幸教授ならびに国分栄仁助教，抗酸化医学ならびに酸化ストレス関連の研究計画の立案に関して多くの示唆をいただきました神奈川歯科大学口腔科学講座加齢制御薬理学講座・李　昌一教授に深く感謝いたします．

文　献

1）Raftos J. E., Whillier S., Chapman B. E.,Kuchel P. W. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 1698-1706.
2）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. J Endod 2011; 37: 637-641.
3）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. Biomaterials 2010; 31: 7213-7225.
4）Tsukimura N., Yamada M., Aita H., Hori N., Yoshino F., Chang-Il Lee M., Kimoto K., Jewett A.,Ogawa T. N-acetyl cysteine (NAC)-mediated detoxification and functionalization of poly (methyl methacrylate) bone cement. Biomaterials 2009; 30: 3378-3389.
5）Yamada M., Kojima N., Att W., Hori N., Suzuki T.,Ogawa T. N-Acetyl cysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental resin extract. Redox Rep 2009; 14: 13-22.
6）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. Clin Oral Implants Res 2011; 22: 165-172.
7）Yamada M., Kojima N., Paranjpe A., Att W., Aita H., Jewett A.,Ogawa T. N-acetyl cysteine (NAC)-assisted detoxification of PMMA resin. J Dent Res 2008; 87: 372-377.
8）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. Int J Oral Maxillofac Implants 2010; 25: 939-946.
9）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. J Biomater Appl 2012; 27: 27-36.
10）Yamada M., Ueno T., Minamikawa H., Sato N., Iwasa F., Hori N.,Ogawa T. N-acetyl cysteine alleviates cytotoxicity of bone substitute. J Dent Res 2010; 89: 411-416.
11）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. Biomaterials 2011; 32: 8474-8485.
12）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 2013; 34: 6147-6156.
13）Xu Y., Shi Y.,Ding S. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. Nature 2008; 453: 338-344.
14）Idris A. I., Krishnan M., Simic P., Landao-Bassonga E., Mollat P., Vukicevic S., Ralston S. H. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase signaling inhibit osteoclast formation in vitro and prevent ovariectomy-induced bone loss in vivo. FASEB J 2010; 24: 4545-4555.
15）Egusa H., Kaneda Y., Akashi Y., Hamada Y., Matsumoto T., Saeki M., Thakor D. K., Tabata Y., Matsuura N.,Yatani H. Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. Biomaterials 2009; 30: 4676-4686.
16）Schweikl H., Spagnuolo G.,Schmalz G. Genetic and cellular toxicology of dental resin monomers. J Dent Res 2006; 85: 870-877.

著者連絡先：山田　将博
〒 101-0061 東京都千代田区三崎町 2-9-18
東京歯科大学有床義歯補綴学講座
Tel: 03-6380-9201
E-mail: masayamada@tdc.ac.jp