

稲光 宏之 論文内容の要旨

主 論 文

The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity

(歯科用レジンモノマーHEMA および TEGDMA は低い細胞毒性を示しながら破骨細胞分化に抑制効果を持つ)

稲光宏之、岡元邦彰、坂井詠子、西下一久、村田比呂司、筑波隆幸

Journal of Applied Toxicology (印刷中)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：村田比呂司 教授)

緒 言

歯科用レジンモノマーは口腔内で重合が完了するまでの間、口腔内の器官や細胞に対して様々な影響を示す。ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) やトリエチレングリコールジメタクリレート (TEGDMA) などのモノマーは、多くの修復材料に含まれており、これらのモノマーが活性酸素種の産生により、酸化ストレスの増大を生じたり、炎症反応を惹起したり、細胞の増殖・分化を抑制することなどが知られている。

過去の研究では、ヒト歯肉線維芽細胞やヒト歯髄細胞に対する HEMA や TEGDMA の効果が報告されており、炎症性サイトカインの産生や細胞の分化抑制、あるいは細胞死を引き起こすことが示唆されている。また HEMA は RAW264.7 細胞において古典経路を介した DNA 傷害や細胞内での活性酸素の上昇の結果、アポトーシスを引き起こすことが報告されている。しかしながら、歯周疾患において骨分解に関与する破骨細胞に対する効果に関する報告はこれまでのところ全くない。

本研究では、HEMA および TEGDMA の破骨細胞分化に及ぼす効果について解析を行い、細胞内シグナルに関する分子メカニズムについて詳細に検討した。

対象と方法

マウス大腿骨より骨髓細胞を採取し、10%FBS 含有および M-CSF を添加した α MEM 中で 37°C CO₂ 下で 3 日間培養してマクロファージを誘導し、一定の細胞数 (2×10^4 cell/ml) に RANKL 刺激下で HEMA および TEGDMA を一定の濃度 (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0mM) で加えた。37°C 5%CO₂ 下で 3 日間培養後、細胞毒性を測定するため Cell count kit8 およびマイクロプレートリーダーを用いて細胞数をカウントし、各濃度における細胞生存率を比較・検討した。また、各濃度における破骨細胞の分化能を比較するために TRAP 染色を行い、多核細胞数をカウントした。さらに cell lysate を抽出して破骨細胞の分化マーカーやシグナル因子の発現におけるモノマーの効果を Western Blot 法を用いて解析した。さらに、骨吸収観察用のプレートを用いて各モノマーの骨吸収活性に及ぼす影響について観察を行った。

結 果

TRAP 染色による破骨細胞分化の解析では、マウス大腿骨由来マクロファージにおいて、HEMA および TEGDMA は 0.1~0.2mM までの低濃度で破骨細胞分化を抑制した。しかし、両モノマーとも 2mM の高濃度でも細胞毒性を殆ど示さなかった。破骨細胞の骨吸収能の解析では、HEMA、TEGDMA とともに濃度依存的に吸収能の抑制が認められた。Western Blot 法を用いた分化マーカーおよび特異的リン酸化シグナル因子の解析では、種々の特異的マーカータンパクにおいて濃度依存的に抑制を認め、特に NFATc1、c-Src、カテプシン K において著明な抑制を示した。特異的リン酸化抗体を用いた細胞内シグナルに関する解析においても、各種因子において抑制傾向が認められ、特に HEMA では p-ERK、p-JNK で、TEGDMA では p-Akt、p-JNK で著明な抑制が示された。

考 察

歯科用モノマー HEMA および TEGDMA は 0.5mM までの低濃度では破骨細胞に対して低い毒性を示しながらも、強い破骨細胞分化抑制効果が認められ、骨吸収抑制作用が期待出来る可能性が示唆された。また、分化抑制には細胞内マーカータンパク NFATc1 の抑制と細胞内リン酸化シグナル因子である p-ERK、p-Akt、p-JNK の抑制が深く関与していることが示唆された。さらに、HEMA と TEGDMA では抑制経路および毒性の程度に差があることが分かった。これらの結果から、HEMA および TEGDMA は、口腔内で溶出しても歯周病抑制剤として有利な歯科材料であることが分かった。