
トピックス

アスコルビルリン酸ナトリウムの骨芽細胞分化促進への影響と歯周病治療への応用

Effect of sodium ascorbyl phosphate on promotion of osteoblast differentiation and its application to treatment of periodontal disease

はじめに

ビタミンCは、骨の重量のうちの約20%程度を占めているコラーゲンの合成に重要なビタミンである。ビタミンCはコラーゲンアミノ酸のプロリンやリシンのヒドロキシ化を促進する酵素の働きを助ける補因子として作用することにより¹⁾、ヒドロキシプロリンとヒドロキシリシンの合成を促進し、コラーゲン線維の三重らせん構造の形成に関与するとともに²⁾、コラーゲンタンパク質の遺伝子発現活性化³⁾と前駆体 mRNA の安定化⁴⁾に関わることが知られている。そのため、ビタミンCが欠乏するとコラーゲンの産生が低下して血管が脆弱になることにより、全身の皮下、関節、歯茎などにおいて出血が起こる壊血病となる。また、ビタミンCは抗酸化物質としてはたらき、活性酸素を消去する作用を有し、炎症を抑制することによって組織を守るはたらきがある。ビタミンCの正常なヒトでの血中濃度は40-80 μM程度であり、小腸での吸収量に上限があることから4時間ごとに3gを経口投与した場合でも血中濃度は220 μM程度が最大である⁵⁾。一方、高濃度ではビタミンCは酸化剤としてはたらき、過酸化水素の産生を上昇させることによってがん細胞の増殖を抑制することから⁶⁾⁷⁾、がん患者へのビタミンC静脈投与の臨床試験が行われており、その場合、血中濃度が一時的に10 mM以上になることが報告されている⁸⁾。

ビタミンCと歯周病との関連性は多くの研究者によって示されており、ビタミンCの血中濃度が低いほど歯周病の発症率は高く⁹⁾⁻¹¹⁾、また、食事によるビタミンC摂取量が高いほど歯周病になりにくい¹²⁾⁻¹⁴⁾。ビタミンCが歯周病を抑制する理由としては、抗酸化作用によって活性酸素を消去し組織を酸化的損傷から守ることに加え¹⁵⁾、歯周組織のコラーゲン合成に重要であること¹⁾、間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化するための誘導因子として働くことなどが挙げられる¹⁶⁾。ビ

タミンC生合成経路の最終段階の反応に関わるグルコラクトン酸化酵素を欠損させたマウスでは、骨芽細胞の分化が障害されて骨折が起こりやすくなるが、ビタミンCを投与するとその表現型は現れなくなる¹⁷⁾。これらのことより、ビタミンCは、口腔内細菌叢のデイスバイオシス(悪玉菌が優位になること)が原因による歯周組織の炎症において、活性酸素によって引き起こされる組織損傷を抑制し、骨芽細胞の分化誘発とコラーゲンの産生促進に関わり、組織修復に働くものと考えられる。

ビタミンCは酸素、光、熱、金属イオンなどによって分解されやすいことから、分解を受けにくいアスコルビルリン酸ナトリウムなどのビタミンC誘導体が開発されている。このアスコルビルリン酸ナトリウムは、細胞内におけるリン酸モノエステル加水分解酵素(ホスファターゼ)の作用によって脱リン酸化されてビタミンCとなるが、ビタミンCそのものを使用した場合と比べてビタミンCとしての作用が持続しやすいのが特徴であり、それを利用し応用を視野に入れた研究が進められている。本稿では、骨芽細胞に対するアスコルビルリン酸ナトリウムの影響と、アスコルビルリン酸ナトリウムを利用した歯周病治療の可能性について概説する。

アスコルビルリン酸ナトリウムの骨芽細胞への影響と歯周病治療への応用

口腔内には数百種類の細菌が常在しており、口腔内の衛生状態の違いによって差があるものの、唾液中1 mL中に1-100億個、デンタルプラーク中には1,000-2,500億個の細菌が存在すると推測されている。口腔内の衛生状態が悪くなると、細菌が増殖しやすい環境となり、デンタルプラーク形成が促進され、プラークを形成している細菌から毒素や毒性物質が分泌されることや、歯周病原菌が歯周組織の細胞に侵入しやすくなるといったことによって、インターロイキン-1、イ

インターロイキン-6, TNF- α など様々な炎症関連因子が産生され、歯周組織に炎症が起こる¹⁸⁾。この、炎症が起こった状態が歯周病であり、歯肉に腫れがある程度の軽度の歯周病を歯肉炎といい、病状が進行し、歯周ポケットが形成されて歯槽骨に炎症が起こり、歯槽骨の吸収が促進した状態の歯周病を歯周炎という。歯周炎における骨吸収では、直接、細菌が歯槽骨を溶かすのではなく、炎症関連因子によって歯槽骨を形成する役割を担う骨芽細胞が抑制されて歯槽骨の形成が阻害され¹⁹⁾、また、炎症関連因子によって歯槽骨を破壊する破骨細胞が活性化され、カテプシン K やマトリックスメタロプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素が放出されるとともに²⁰⁾²¹⁾、塩酸が分泌されて歯槽骨が溶かされる²²⁾。歯周炎により歯槽骨の吸収が進むと歯がぐらつきはじめ、さらに進行すると抜歯が必要となり、その結果、食事がとりづらくなるといった弊害が生じる。それだけではなく、歯周病は糖尿病、アルツハイマー病、心疾患、動脈硬化、がん、早産、誤嚥性肺炎など様々な病気のリスクを高めることが報告されている²³⁾⁻²⁵⁾。

先述したように、ビタミン C は歯周病の予防・治療に有効であることから、ビタミン C と骨の石灰化に関する研究が歯科領域で盛んに行われている。ビタミン C は、骨芽細胞への分化誘導因子であり、ビタミン C をマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞に添加すると骨芽細胞へと分化誘導されることが知られている¹⁶⁾。Okajima ら²⁶⁾はビタミン C 誘導体であるアスコルビルリン酸ナトリウム添加によっても MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化が促進されるかどうかについて検討した。添加 72 時間後の細胞生存率で評価したアスコルビルリン酸ナトリウムの細胞毒性では、500 μM 以下のアスコルビルリン酸ナトリウムは MC3T3-E1 細胞に対し細胞毒性を示さなかった。アスコルビルリン酸ナトリウムの骨芽細胞の分化に対する影響を明らかにするために、400 μM のアスコルビルリン酸ナトリウム添加した MC3T3-E1 細胞について、骨芽細胞の分化に必須の転写因子であり、骨芽細胞の分化マーカーである Runt-related transcription factor 2 タンパク質をコードする RUNX2、骨の細胞外マトリックスの主成分である I 型コラーゲンの $\alpha 1$ 鎖をコードする COL1A1、骨の非コラーゲンタンパク質として約 20% を占めており、骨芽細胞の機能を表す骨代謝マーカーである Osteocalcin をコードする BGLAP2 の遺伝子発現状態について解析した。添加 24 時間後では、無添加細胞と比較していずれの遺伝子発現についても差はなかったが、48 時間後と 78 時間後では、RUNX2、

COL1A1, BGLAP2 のいずれの遺伝子発現も有意に増加しており、アスコルビルリン酸ナトリウムによる骨芽細胞の分化と骨形成の促進が示唆された。また、I 型コラーゲンの細胞外への分泌量についても、アスコルビルリン酸ナトリウムを添加した細胞では、添加後少なくとも 72 時間まで分泌量が有意に上昇していた。アリザリンレッド S 染色法によって評価した細胞外基質の石灰化量は、無添加の MC3T3-E1 細胞と比較して添加 14 日後では約 4 倍に上昇しており、アスコルビルリン酸ナトリウム添加により MC3T3-E1 細胞の分化と石灰化が促進されることが確認された。

Okajima ら²⁶⁾のアスコルビルリン酸ナトリウムの骨芽細胞への分化誘導に関する報告は、これまでに知られているビタミン C が骨芽細胞への分化誘導因子であることと整合性がとれており、アスコルビルリン酸ナトリウムがビタミン C と同様に骨芽細胞の分化誘導因子として有効であることを示している。Battionio ら²⁷⁾はアスコルビルリン酸ナトリウムを添加した歯磨き粉の抽出物を用いて抗酸化性について検証し、過酸化水素による DNA へのダメージが軽減されることを *in vitro* で示している。Shimabukuro ら²⁸⁾はビタミン C 誘導体の一種であるリン酸アスコルビルマグネシウム (magnesium salt of ascorbic acid 2-phosphate) を添加した歯磨き粉を歯周病患者に使用し、歯肉の炎症が抑制されることを報告している。アスコルビルリン酸ナトリウムは、リン酸アスコルビルマグネシウムと同じアスコルビン酸 2-リン酸 (ascorbic acid 2-phosphate) の塩であり、同様に歯周組織の抗炎症効果が期待できる。このリン酸アスコルビルマグネシウムについても骨芽細胞への分化誘導に関する研究は行われているが、リン酸アスコルビルマグネシウムと比べて、アスコルビルリン酸ナトリウムは沈澱しやすく結晶化しにくく、溶けやすいことから、高濃度で歯磨き粉に添加しやすいといった利点があるのではないかと考えられる。しかし、ヒトあるいは動物を用いた実験で、アスコルビルリン酸ナトリウムによる歯槽骨の骨吸収抑制作用を確認した報告はない。今後の課題として、アスコルビルリン酸ナトリウムを添加した歯磨き粉により歯槽骨の吸収が抑制されるかどうかについても検討していく必要がある。

医学領域では、紡糸ノズル内のポリマー溶液に高電圧を加え、直径が数 μm から数 nm のマイクロファイバーやナノファイバーを作製するエレクトロスピンング法 (電界紡糸法)²⁹⁾³⁰⁾ で作成したポリ乳酸マイクロファイバーのスキヤフォールド (足場材) を利用することにより、アスコルビルリン酸ナトリウムによる組織

の再生を目指した研究が行われている。ポリ乳酸は生分解性材料であり、組織に移植後分解されるのが特徴であるため、組織再生のためのバイオマテリアルとして好都合である。Mangirら²⁹⁾は、エレクトロスピニング法で作成したポリ乳酸のスキヤフォールドとアスコルビルリン酸ナトリウムを組み合わせ、線維芽細胞のコラーゲン産生促進に有効であることを報告し、骨盤底障害の治療の可能性を示唆している。Okajimaら²⁶⁾は、アスコルビルリン酸ナトリウムが骨芽細胞を活性化させることから、アスコルビルリン酸ナトリウムと組み合わせたポリ乳酸スキヤフォールドは歯周病における歯槽骨吸収の治療にも応用できると提唱している。歯周病の治療では、SRP(歯石除去を意味するスケーリング(Scaling))と歯根面の平滑化を意味するルートプレーニング(Root Planing)を合わせた用語の略語)処置と歯周ポケットへのクロルヘキシジンなどの抗菌剤投与を組み合わせた治療法が施されており、インプラント歯周炎の予防・治療においても歯周ポケットへの抗菌剤投与が用いられている。この抗菌剤の投与により、歯周病原菌を減少させて歯周病の病状を軽減し、歯槽骨の吸収を止めることはできるが、歯槽骨が再生されるわけではない。ここで、抗菌剤とアスコルビルリン酸ナトリウムを組み合わせたポリ乳酸スキヤフォールドを歯周ポケットに投与すれば、歯槽骨の再生が期待できる。マイクロファイバーやナノファイバーの他にも、歯周病に対するドラッグデリバリーシステムとしては、チップ、ストリップ、ゲル、マイクロパーティクル、ナノパーティクルなどが使われており³¹⁾、アスコルビルリン酸ナトリウムをそれらの材料と組み合わせることによって、歯周病に対する新しいドラッグデリバリーシステムの確立が期待される。

おわりに

本稿では、アスコルビルリン酸ナトリウムの骨芽細胞への影響とそれを用いた歯周病治療の可能性について論じた。慢性的な歯周病は糖尿病、アルツハイマー病、心疾患、動脈硬化、がん、早産、誤嚥性肺炎などさまざまな病気のリスクを高めることが報告されており²³⁾⁻²⁵⁾、歯周病の予防・治療は全身の健康を守る上で重要であることが科学的に証明されつつある。ビタミンCとその誘導体により抗炎症作用や歯槽骨の再生が期待されることから、アスコルビルリン酸ナトリウムと組み合わせたポリ乳酸スキヤフォールドは、歯槽骨再生法の候補のひとつとなりうるものと考えられる。ビタミンCやビタミンC誘導体の安全性は証明されており、それらを利用した新しい歯周病の治療・予防法

の確立が望まれる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2020.9.3 受付)

Key words : ascorbyl phosphate, osteoblast, periodontal disease, electrospinning, toothpaste

Department of Health and Nutrition, Faculty of Human Life Studies, University of Niigata Prefecture

Makoto Hagiwara, Shin Kamiyama, Hideyuki Sone
新潟県立大学 人間生活学部 健康栄養学科
萩原 真, 神山 伸, 曾根 英行

文 献

- 1) Kivirikko KI, Ganser V, Engel J, Prockop DJ (1967) Comparison of poly-L-proline I and II as inhibitors of procollagen hydroxylase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **348**, 1341-1344
- 2) Rosenbloom J, Harsch M, Jimenez S (1973) Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Arch Biochem Biophys* **158**, 478-484
- 3) Chojkier M, Houghlum K, Solis-Herruzo J, Brenner DA (1989) Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? *J Biol Chem* **264**, 16957-16962
- 4) Davidson JM, LuValle PA, Zoia O, Quaglino D Jr, Giro M (1997) Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pre-translational mechanisms. *J Biol Chem* **272**, 345-352
- 5) Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Wesley RA, Levine M (2004) Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann Intern Med* **140**, 533-537
- 6) Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio II, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara JM, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin DJ, Dow LE, Papadopoulos N, Gross S, Cantley LC (2015) Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science* **350**, 1391-1396
- 7) 萩原真, 神山伸, 曾根英行 (2016) 高濃度アスコルビン酸は酸化を促進し大腸ガン細胞のアポトーシスを誘導する. *ビタミン* **90**, 600-602
- 8) Hoffer LJ, Levine M, Assouline S, Melnychuk D, Padayatty SJ, Rosadiuk K, Rousseau C, Robitaille L, Miller WH Jr. (2008) Phase I clinical trial of i.v. ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol* **19**, 1969-1974

- 9) Pussinen PJ, Laatikainen T, Alfthan G, Asikainen S, Jousilahti P (2003) Periodontitis is associated with a low concentration of vitamin C in plasma. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 897-902
- 10) Merchant AT (2008) Plasma vitamin C is inversely associated with periodontitis. *J Evid Based Dent Pract* **8**, 103-104
- 11) Kuzmanova D, Jansen ID, Schoenmaker T, Nazmi K, Teeuw WJ, Bizzarro S, Loos BG, van der Velden U (2012) Vitamin C in plasma and leucocytes in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol* **39**, 905-912
- 12) Ismail AI, Burt BA, Eklund SA (1983) Relation between ascorbic acid intake and periodontal disease in the United States. *J Am Dent Assoc* **107**, 927-931
- 13) Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho A W, Trevisan M, Genco RJ (2000) Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. *J Periodontol* **71**, 1215-1223
- 14) Lee JH, Shin MS, Kim EJ, Ahn YB, Kim HD (2017) The association of dietary vitamin C intake with periodontitis among Korean adults: Results from KNHANES. *PLoS One* **12**, e0177074
- 15) Arrigoni O, De Tullio MC (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta* **1569**, 1-9
- 16) Kusuyama J, Amir MS, Albertson BG, Bandow K, Ohnishi T, Nakamura T, Noguchi K, Shima K, Semba I, Matsuguchi T (2019) JNK inactivation suppresses osteogenic differentiation, but robustly induces osteopontin expression in osteoblasts through the induction of inhibitor of DNA binding 4 (Id4). *FASEB J* **33**, 7331-7347
- 17) Mohan S, Kapoor A, Singgih A, Zhang Z, Taylor T, Yu H, Chadwick RB, Chung YS, Donahue LR, Rosen C, Crawford GC, Wergedal J, Baylink DJ (2005) Spontaneous fractures in the mouse mutant sfx are caused by deletion of the gulonolactone oxidase gene, causing vitamin C deficiency. *J Bone Miner Res* **20**, 1597-1610
- 18) Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y (2019) Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Front Cell Infect Microbiol* **9**, 262
- 19) Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA (2001) Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 9-18
- 20) Birkedal-Hansen H (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* **64**, 474-484
- 21) Sasaki T (2003) Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech* **61**, 483-495
- 22) Vaananen HK, Laitala-Leinonen T (2008) Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* **473**, 132-138
- 23) Nazir MA (2017) Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)* **11**, 72-80
- 24) Kamer AR, Craig RG, Dasanayake AP, Brys M, Glodzick-Sobanska L, de Leon MJ (2008) Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. *Alzheimers Dement* **4**, 242-250
- 25) Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, Asadi H, Ojcius DM (2019) Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J* **42**, 27-35
- 26) Okajima LS, Martinez EF, Pinheiro IF, Fonseca Silva AS, Demasi APD (2020) Effect of sodium ascorbyl phosphate on osteoblast viability and differentiation. *J Periodontol Res* **55**, 660-666
- 27) Battino M, Ferreira MS, Armeni T, Politi A, Bompadre S, Massoli A, Bullon P (2005) In vitro antioxidant activities of antioxidant-enriched toothpastes. *Free Radic Res* **39**, 343-350
- 28) Shimabukuro Y, Nakayama Y, Ogata Y, Tamazawa K, Shimauchi H, Nishida T, Ito K, Chikazawa T, Kataoka S, Murakami S (2015) Effects of an ascorbic acid-derivative dentifrice in patients with gingivitis: a double-masked, randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* **86**, 27-35
- 29) Mangir N, Bullock AJ, Roman S, Osman N, Chapple C, MacNeil S (2016) Production of ascorbic acid releasing biomaterials for pelvic floor repair. *Acta Biomater* **29**, 188-197
- 30) 加藤新, 末信一朗, 藤田聡 (2016) エレクトロスピンニング法により作製したコラーゲン/ポリ乳酸ナノファイバーの芯鞘構造の形成効率の評価. *高分子論文集* **73**, 366-369
- 31) Joshi D, Garg T, Goyal AK, Rath G (2016) Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv* **23**, 363-377