



緑茶由来成分の再検討・ 機能化から始まった骨再生材料開発

大阪歯科大学中央歯学研究所
准教授 本田 義知

1: 歯科における骨再生医療

歯科医師の先生方に向けた本稿で骨再生治療の重要性を改めてお伝えすることは大変恐縮であるが、極力簡単に振り返ってみたい。骨再生治療は、外傷、歯周病、癌などによって生じた歯槽骨および顎骨の骨欠損に対して行われ、既に応用しうる様々な骨補填材、タンパク質製剤が上市されている。骨補填材では、牛骨由来の焼成人工骨 (Bio-Oss)、β-リン酸三カルシウム、ハイドロキシアパタイト担体や、そのコラーゲンとの複合物 (リフィット) などが市場に出ており広く認知されている¹⁾。また、近年では、ハイドロキシアパタイトの前駆体である Octacalcium phosphate (OCP) とコラーゲンの複合物や炭酸アパタイトが治験に入っており、その上市が期待されている。一方タンパク質製剤に関しては、日本の歯科業界で最も馴染みが深いのは、ブタ歯胚由来歯周組織再生材料であるエムドゲインであろう。また、アメリカに目を向けると Bone morphogenetic protein - 2、Platelet-Derived Growth Factor などがアメリカ食品医薬品局の認可を通過して広く使用されているが²⁾、日本も遂に basic Fibroblast growth factor が歯周組織再生剤 (リグロス) として認可され、その成果が期待されている。これらの成長因子は、いずれも強力に細胞活性を高めることが知られており、細胞の増殖、遊走、分化のいずれかに寄与し、再生医療を大きく後押しする潜在能力を持つ。

このように、強い活性を持つ成長因子がすでに複数報告されている現状で、なぜ筆者らは表題に表すように植物由来の生理活性物質に改めて着目

したのであろうか。その一番の要因は、コストの問題にある。費用計算は様々な要因が関わることから単純計算はできないが、例えば市販ベースで成長因子を用いようとした場合、数 μg というごく微量の成長因子の購入であっても、数万円の費用が必要となる。一方、植物由来の生理活性物質を用いた場合、その費用は mg 単位で同等の値段であり、1000倍の価格差が存在する。この価格の差は極めて大きく、魅力的な武器となる。直接 *in situ* (生体内の患部) で組織再生を図る治療の場合への応用はもちろん、他にも iPS 細胞、他の幹細胞などの細胞培養を進める場合などでも成長因子は大量に必要となり、その大きな経済的負担は細胞治療を実用化する上での大きな足枷となっている。したがって、成長因子に代わる安価で同様の機能を発揮する薬剤の発見や、活用方法の開発がなされれば、再生医療の発展に貢献しうると考えられる。

2: 植物由来成分による医療応用

古来より、植物に含まれる成分は様々な薬理効果がうたわれ、治療に用いられてきた。地球上には約250,000種類の植物が存在するとされており、その中の15%程度が植物化学的研究対象として取り扱われている³⁾。その中で、実際の創薬シーズとなる成分は少ないものの、一部の成分およびその誘導体は医薬品として利用され、様々な治療へと用いられている。例えば、赤ワインなどに含まれるレスベラトロールは北海道大学の高岡道夫によりバイケイソウから発見され、その構造からスティルベン化合物と称されるポリフェノールの一種である⁴⁾。このポリフェノールは、EPac1および CamKK β -AMPK 経路を活性化さ

せることにより長寿遺伝子として知られるサーチュイン (Sirt1) を間接的に活性化し、老化関連代謝に対して改善効果をもたらすことから⁵⁾、加齢関連疾患への応用研究に盛んに用いられている。また、大豆イソフラボンは、エストロゲンに類似した構造を持ち、弱いホルモン様作用を示す⁶⁾。温州みかんの果皮に含まれるヘスペリジンも血清コレステロール低下作用などの生理活性を持つことが知られている⁷⁾。このように植物には、古来より多くの生理活性物質が含まれ、様々な疾患の治療に用いられており、その有用性に疑いはない。さらに、広く出回っている野菜などの食用植物や飲用される植物などに含まれる場合、生産工程次第では大きなコストカットも期待できる。

3: チャと茶とその歴史

著者が所属する大阪歯科大学の楠葉キャンパス (枚方市) のすぐ近くには、静岡茶、狭山茶と並んで日本三大茶の一つと呼ばれる宇治茶の産地がある。和束を代表とする茶畑の美しさもさることながら (図1)、普段はあまり意識していないが、寒い冬にこたつで飲む茶はもとより、暑い夏に飲むよく冷えた緑茶は格別に美味しい。



図1 左: 和束の茶畑。右: 和束茶

また、近くの商店にふと立ち寄っただけで、メタボリックシンドロームの改善を志向した緑茶由来カテキンを含んだ飲料水が当然のように複数種類置かれているのが目にとまる。このように茶は愛飲されている飲料水であり、日本で暮らしている緑茶が体に良いという話に今更疑いを持つ方々は少ないと思われる。しかしながら、一般生活をしていて、「茶」と「チャ」の違いを意識している人は少ない。さらに、茶に含まれている成分の「再生医療や歯科医療への応用」に関して取り上げている書物や、論文はまだまだ少ない。以降の部分では、まず茶やその歴史に関して少しだけ触れさ

せて頂いた後、筆者らが行っている茶に含まれる成分への小さな工夫が、その薬理効果を大きく向上させ再生医療材料としての可能性を拓いた一例について紹介したい。

「チャ」は学名としてカメリア・シネンシス (Camellia Sinensis (L) O.Kuntze) と呼ばれる樹を指し、その葉に様々な処理を施すことにより、多様な「茶」が作られる。つまり茶とは、チャという樹の葉を飲料用に加工した製品全般を指す。チャの原産地は諸説あるが、中国西南地域を中心とした「東亜半月弧」と呼ばれる地域を起源とする説が多数である⁸⁾。茶は、製法的な違いにより大きくは不発酵茶 (緑茶)、発酵茶 (包種茶、烏龍茶、紅茶、プアール茶) などに分けられる。日本にいと、煎茶や抹茶などの緑茶を原料とした茶が主流であり、それ以外の茶で知られているのは烏龍茶、紅茶などに限られるように思う (ジャスミン茶などのフレーバー茶を除く)。しかし、世界に目を向けると、中国では、発酵度合いに帰する水色の違いによる分類がなされ、白茶、青茶、黄茶、黒茶など、日本ではあまり聞かないお茶がたくさん存在し、日常的に楽しまれている (表1)⁹⁾。

表1 中国茶の分類

色	名称	発酵度合い	体系的な茶	産地
淡 ↑	白茶	軽度発酵茶 発酵度 10-20%	白牡丹 寿眉	福建省北部
	黄茶	軽発酵茶	君山銀針 崇安蓮心	湖南省 福建省
	緑茶	不発酵茶	龍井茶	浙江省杭州
	青茶	半発酵茶 発酵度 30~60%	鉄観音 水仙 凍頂烏龍茶	福建省安溪 福建省、広東省 台湾
	紅茶	完全発酵茶	荔枝紅茶	広東省
	黒茶	後発酵茶	普洱茶 (プアール茶)	雲南省
濃い ↓				

(山本 (前田) 万里著、株式会社シーエムシー出版、茶の効能と応用開発、P2の表1を一部改変して転載)

茶の歴史については角山栄先生の書かれた「茶の世界史」が非常に参考になるが、その中で特に驚くのは、イギリスの茶を飲む文化の始まりに、日本が深く関わっていることである¹⁰⁾。江戸幕府時代に鎖国をしていた日本は、唯一海外との貿易港であった長崎においてオランダとの交渉をおこなっており、当時の日本の輸出品は主に、生糸と茶であった。オランダの飲茶の風習はこの日本との貿易や中国との貿易を通して始まり、その

後、オランダを通してイギリスの茶を飲む文化に繋がったと考えられている。イギリス人で最初に茶に言及したのは日本の平戸へ来航したイギリス東インド会社の駐在員R・ウィッカムであり、1615年に遡る¹⁰⁾。1630年頃にオランダへ茶が伝わったと同時期にイギリスへも茶が伝わったと考えられているが、広く一般市民に茶が市販されたのは1657年のトーマス・ギャラウェイというコーヒーハウス店主が営む店が最初といわれている¹⁰⁾。現在のイギリスというと紅茶でティータイムというイメージだが、初めから紅茶を飲んでいただけではなく、圧倒的に緑茶が多く、次第に紅茶へと移り変わっていった事実は大変興味深い。当時、茶は主に上流階級の飲み物であったため、大変高価に売りに出されていた。広告では、「茶の適応症として、精力精進、頭痛、不眠、胆石、倦怠、胃弱、食欲不振、健忘症、壊血病、肺炎、下痢、風邪」などの症状をあげており¹⁰⁾、東洋からもたらされる貴重な舶来品にそれだけの薬理効果が期待されていた表れと思われる。

4: 薬用としての茶と茶の成分

では茶の薬用としての効能を最初に報告したのは誰であろうか。その起源は古く、5000年前の中国の神話に出てくる本草学の始祖である神農と言われている¹¹⁾。神農は、様々な薬草を試食し、人民に対し食べられる薬草を教えたが、度々毒にあたったため、その解毒として茶の葉を用いた。以降、茶は薬用としての機能が重宝されてきた。日本ではどうだろうか、日本における茶に関する最も古い記録は、「日本後記」に嵯峨天皇一行が近江（滋賀）の梵釈寺で、大僧都永忠によって献じられた茶と記載されている⁸⁾。永忠は奈良時代に唐に渡り喫茶法を学んできた僧侶であることから、その薬用としての効能も把握していたと推測されるが、明確に効能が記載されるのはより後の鎌倉時代へと時代を進める必要がある。臨濟宗の開祖“栄西”禅師は、京都や鎌倉へお茶を広めたことにより茶の発展に大きく貢献した僧侶であるが、その貢献の痕跡は紙本墨画鳥獣人物戯画（国宝）を伝える高山寺（京都）の園内に存在する日本初の茶園（茶畑）にも見られる。栄西は承元5年（1211）に完成させた医学書である「喫茶養

生記」において、茶の効用の詳細を述べている。当然、栄西禅師が存命の時代には詳細な茶の成分分析は行われていないであろうが、その後世界中の多くの著名な研究者の尽力により成分の同定が進められてきた。詳細は、名著と思われる中川致之先生によって執筆された「茶の健康成分発見の歴史」を参考にされたい¹¹⁾。茶は多種類存在することを既に述べたが、緑茶に含まれる成分に限って述べると、表に示すように、カテキン、カフェイン、テアニンを含む多様な成分が緑茶には含まれており、それぞれ多様な生理活性を持つ（表2）。

表2 緑茶成分と生理活性

緑茶成分	機能・効能
水溶性成分	
カテキン類	抗酸化、抗突然変異、抗癌、抗動脈硬化、血中コレステロール低下、血圧上昇抑制、血糖上昇抑制、血小板凝集抑制、抗菌、抗ウイルス、虫歯予防、抗肥満、抗アレルギー、腸内フローラ改善、消臭、環境ホルモンの作用抑制、脳障害軽減
カフェイン	中枢神経興奮、睡眠防止、強心、利尿、抗喘息代謝亢進（サーモジェニック効果）
テアニン	精神リラックス、抗癌剤の作用増強、アルツハイマー病予防
γ-アミノ酪酸	血圧上昇抑制、抑制性神経伝達
フラボノール	毛細血管抵抗性増加、抗酸化、血圧降下、消臭
複合多糖	血圧上昇抑制、抗糖尿病
ビタミンC	抗壊血病、抗酸化、癌予防
サポニン	抗喘息、血圧低下、抗肥満
食物繊維	胆汁酸排泄促進、血漿コレステロール低下、肝機能改善
茶高分子成分（複合タンニン）	発癌抑制
不溶性成分	
タンパク質	栄養素
食物繊維	便秘防止、大腸癌予防
ビタミンE	抗酸化、癌予防、抗不妊
β-カロテン	抗酸化、癌予防、免疫反応増強
フッ素	虫歯予防
亜鉛	味覚異常防止、皮膚炎防止、免疫能低下抑制
セレン	抗酸化、癌予防、心筋障害防止

（伊勢村 護著、株式会社シーエムシー出版、茶の効能と応用開発、P19の表2を一部改変して転載）

5: カテキンの医療応用の歴史

茶の渋み成分であるフラボノイドの一種である“カテキン”は、日常的には様々な類縁体から成るカテキン類の総称として知られている。以降同様の意味として“カテキン”を使用するが、正確には、“カテキン”とは、2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triolの4種類の異性体、それぞ

れ(+)-カテキン、(-)-カテキン、(+)-エピカテキン、(-)-エピカテキンを指している。これら4種類の化合物は3,3',4',5,7-ペンタヒドロキシフラバン構造の2位と3位に不斉炭素が存在し、3',4',5'位の3箇所ヒドロキシ基を持つカテキンは、ガロカテキンと呼ばれる。また、3位ヒドロキシ基に没食子酸が結合したカテキンは、カテキンガレートと呼ばれている。緑茶に含まれるカテキンの主要成分は、(-)-エピカテキン(EC)と(-)-エピガロカテキン(EGC)、およびこれらの没食子酸エステルである(-)-エピカテキンガレート(ECG)と(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)の4種である(図2)。それぞれのカテキンは1929年~1948年の間に、EC、EGC、EGCは辻村みちよによって、EGCGはブラッドフィールドによって発見された¹¹⁾。乾燥茶葉中のカテキンの総重量は約13%程度を占め、緑茶葉中のカテキン比率は、ECが10%、EGCが22%、ECGが11%、EGCGが54%程度と、EGCGが最も多く含まれていると報告されている。他に(+)-カテキンや、(+)-ガロカテキンも含まれているが、その量はそれぞれ2%以下である¹²⁾。

効果も直接的な恩恵となると思われる。特に、田村らは、EGCGが細菌種の種類によりその効果が異なることを報告しており大変興味深い知見である²⁵⁾。

6: カテキンの骨再生応用における課題

カテキンの骨再生医療への応用を*in vivo* (生体内)と*in vitro* (培養実験)に分けて説明すると*in vitro*において、非常に多くの報告がなされている。破骨細胞形成抑制に関しては別の論文を参考にして頂くとして、本稿では骨形成の側面に特化して紹介したい。EGCGは、1-10 μ Mにおいて、ヒト間葉系幹細胞¹⁸⁾、マウス間葉系幹細胞株²⁶⁾、ヒト脱分化脂肪細胞²⁷⁾の骨芽細胞分化促進能や、骨芽細胞¹⁶⁾及び骨芽細胞様細胞²⁸⁾の石灰化基質分泌を促進することが報告されている。したがって、骨形成に關与する骨芽細胞分化や骨芽細胞活性化機構においては、同濃度範囲内が至適濃度と予想される。一方、Jinらは濃度の上昇により、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化への効果が徐々に低下することを明らかにしている¹⁸⁾。ま

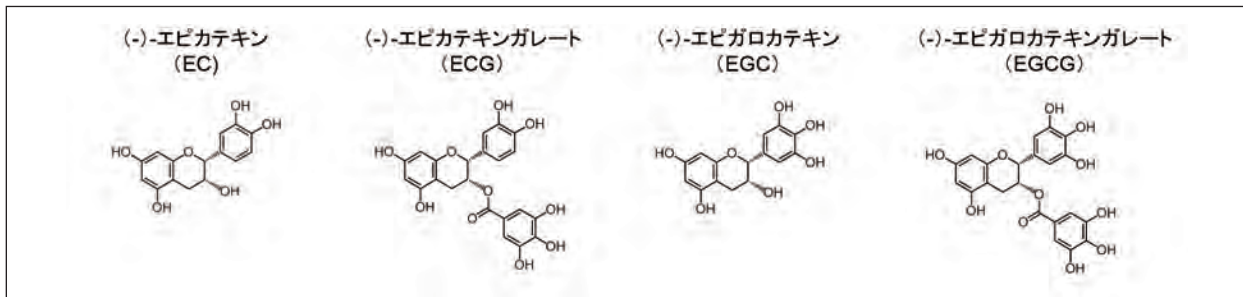


図2 緑茶葉に含まれるカテキンの主要成分

カテキンの生理活性の解明は、細胞生物学の発展もありよく進んでおり、細胞生存¹³⁾、サイトカイン産生^{14, 15)}、細胞外基質分泌¹⁶⁾、細胞分化^{17, 18)}、などの細胞応答に關与することが明らかになるとともに、抗炎症作用、抗菌作用、抗酸化作用、血圧上昇抑制作用、抗アレルギー作用、血中コレステロール調節作用、老化抑制作用、血糖値調節作用、など様々な機能・効能を有することが報告されている¹²⁾。さらに、EGCGは、メタボリックシンドローム¹⁹⁾、腫瘍²⁰⁾、心血管疾患²¹⁾、骨疾患²²⁻²⁴⁾などに対して多様な生理活性機能を有することが明らかとなっており、その医療応用が注目されている。歯科領域では、歯周病へ寄与する殺菌

た、細胞増殖に關しても、同様の傾向を示すことが明らかになっていることから、EGCGの無計画な濃度設定は骨形成には繋がらず、至適濃度の探索が必須であることを示唆している。以上のように、*in vitro*においては、骨再生医療に繋がる所見が多数報告されている。にもかかわらず、*in vivo*において骨形成を促進した報告は、2013年2月の当時、*in vitro*に比べて極めて少なかった。

7: EGCG 結合ゼラチンの開発

筆者らは、このような*in vitro*と*in vivo*での論文数の違いにまず着目し、EGCGの構造的特徴

を再検討することとした。EGCGは、その周囲をヒドロキシ基で覆われており、一般的にヒドロキシ基はカルボキシ基やアミノ基などに比べ他の物質との吸着を起こしにくく、反応性が乏しい。上記のように多様な薬理効果を持つEGCGが骨再生領域で着目されてこなかったとは到底想像出来ず、様々な材料との応用が試されてきたと推察された。にもかかわらず、生体内で薬理効果を発揮する成功例がほとんど無い理由は、他の材料へのEGCGの単純な混合や、欠損部位への注射では、患部に留まることが出来ず、容易に流出してしまっただめという一つの仮説を立てた。この仮説と、過去の骨再生実験の経験から²⁹⁾、生体内において、細胞接着性が高く、骨形成に寄与しうるゼラチンとの複合化を果たすことで、生体内安定性、貯留性が高まり、局所での薬理効果が発揮されるという二つの仮説を立て、EGCG結合ゼラチンスポンジ (EGCG-gelatin-sponge : EGCG-GS) の開発を開始した^{30, 31)}。

EGCG-GSの合成では、環境汚染と、有機溶媒の残留を懸念して、近年低環境負荷かつ低エネルギーとして注目されているグリーンケミストリーの一つである水中合成法を応用した。簡単に合成法を述べると、豚皮膚由来のゼラチンを温水に溶解した後、室温にて水溶性脱水縮合剤4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM)、EGCG、N-メチルモルホリン (NMM) を所定量添加し、暗所下で24時間攪拌して合成した(図3)。反応終了後、透析膜を用いて精製し、凍結乾燥することで、EGCGがゼラチンにエステル結合で結合したEGCG-GSを得た。

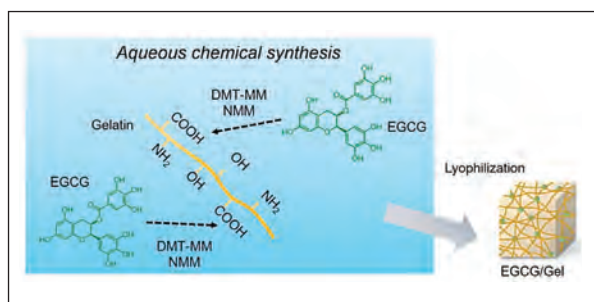


図3 EGCG-GS合成法の模式図
(Honda Y, *Int J Mol Sci*, 2015, Fig.1より転載)

骨再生応用を目的にした材料開発であるため、細胞への足場効果を期待して、スポンジ状の担体

開発を第一目標とした。数多くの合成条件を試作した結果、多くの条件において粉体状の材料が合成されたが、最適な配合比で混合されたEGCG-GSでは、スポンジ状の材料が合成可能であることを確認した。得られた生成物のIRスペクトルにより高濃度のEGCGを含有させた場合、ゼラチンと比較してアミド結合、エステル結合に由来するシグナルの増強が確認された。すなわち、DMT-MMの作用によって脱水縮合反応することにより、ゼラチンを構成する酸性アミノ酸側鎖のカルボキシ基とEGCGのヒドロキシル基が反応しエステル結合する。加えて、ゼラチンを構成するアミノ酸の側鎖アミノ基およびヒドロキシ基も反応に関与し、ゼラチン分子同士がアミド結合あるいはエステル結合で架橋され、骨再生材料として利用可能なEGCG-GSが得られたと考えられた。

8: EGCGやEGCG結合ゼラチンを用いた骨再生研究

合成したEGCG-GSの骨再生効果を評価するため、マウス頭蓋骨に臨界骨欠損(直径4.2 mm)を形成し、EGCG-GSを4週間埋入した後、頭蓋骨を摘出しマイクロX線(μCT)撮影とヘマトキシリン-エオジン染色を用いて骨形成評価を行った(図4)。足場効果を高めるため真空加熱処理で架橋したゼラチンスポンジに、EGCG溶液を滴下しただけの群(EGCGが結合していない群)では、顕著な不透過像(骨組織)が認められず、EGCGとゼラチンの単純な混合では、骨形成を促進しにくいことを確認した。詳細の解明は進めていないが、EGCGがゼラチンに結合していないことから、患部から容易に溶出してしまい薬理効果を示さなかったためと考えられる。一方、筆者らが調製したEGCGとゼラチンが強固に結合しているEGCG-GSは、顕著に不透過像を増加させた。得られた試料の組織標本を慎重に確認すると、EGCG-GS周囲に新生骨が認められ、同物質は骨伝導能を持っていることが明らかとなった。また、μCT画像では、周囲の母床骨と連結していない新生骨と思われる不透過像も確認され、骨誘導の可能性も示唆された。EGCG-GSで骨形成が促進した要因としては、EGCGがゼラチンに強固に結合しているため、長期間EGCGの効果が維持できたためと推察できる。

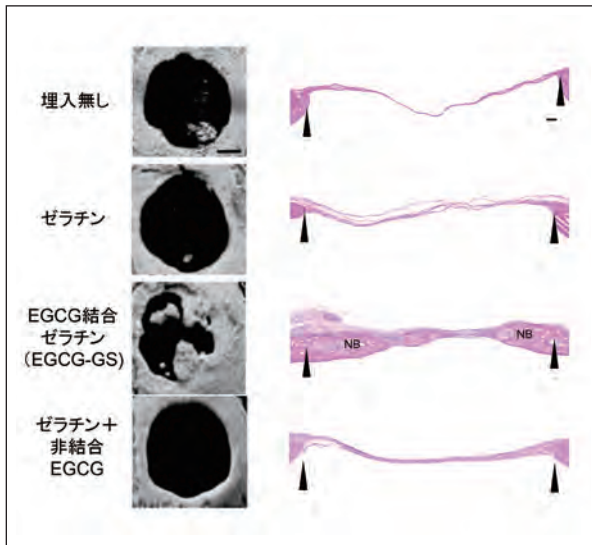


図4 EGCG-GSを埋入・非埋入4週後におけるマウス臨界骨欠損のμCT画像とヘマトキシリン-エオジン染色像 (Honda Y, *Int J Mol Sci*, 2015, Fig.4より一部改変して転載)

EGCG-GSが骨形成を促したメカニズムの解明を更に進めるため、筆者らは、*in vitro*においてマウス間葉系幹細胞株 (D 1 細胞) を用いて同複合体の骨芽細胞分化誘導能を評価した。EGCG-GSは生体内において、足場効果 (主にゼラチンによる) と、薬理効果 (主にEGCGによる) を発揮して骨形成を促したと考えられた。同実験では、EGCG-GSが生体内で分解が進んだ後の薬理効果を主に評価するため、細胞播種後に複合体を添加した。その結果、後から加えられたEGCG-GSは経時的に分解され、D 1 細胞の骨芽細胞分化誘導を促す効果を持つことが明らかとなった。また、水中内における分解実験で、EGCG-GSはゆっくり長期間にわたって分解することを確認した。現在のところ、EGCG-GSが骨欠損内に存在するどの細胞を活性化し骨形成を促進したかは明らかではない。しかし、過去の報告においてマウ

スの頭蓋冠骨欠損部位には、間葉系幹細胞が存在することが知られており³²⁾、EGCG-GSは骨欠損内の何らかの幹細胞を活性化させ骨形成を促したと考えている。しかし一方で、頭蓋冠由来の骨芽細胞や脳硬膜由来の細胞が骨形成に関与することも報告されていることから³³⁾、骨芽細胞やその他の細胞の活性化を通して骨形成を促した可能性も存在し、更なる詳細な解明を進めている。

9: EGCGとゼラチンの強固な結合により生じる長期残存効果

EGCGのゼラチンに対する強固な結合が細胞レベルで発揮した効果を調査するため、蛍光標識したEGCG-GS (FITC-EGCG-GS) を合成し、*in vitro*にて評価した。その結果、FITC-EGCG-GSは、細胞内に容易に吸収されず細胞膜表面に吸着していた (図5)。ゼラチンの組成を鑑みると、ゼラチンに含まれるアミノ酸配列Arg-Gly-Asp (RGD) は細胞のインテグリンに高い親和性を示すため³⁴⁾、EGCG-GSもインテグリンとの相互作用により、細胞膜表面に吸着した可能性が考えられる。本実験では、FITCはゼラチンと主に結合しており、EGCGの放出挙動を追えてはいない。したがって、FITC-EGCG-GSの残存がEGCGの長期的に細胞膜周囲に存在する直接的な証拠とはならない。しかし、少なくとも著者らが作製したEGCG-GSは、埋入後に足場として活用されたことに加え、分解された後でも、その残渣がさらに細胞膜表面に付着することで「アンカー効果」を発揮している。このアンカー効果により、細胞近傍での持続的なEGCGの放出あるいは、細胞膜に存在する受容体への直接的な活性化を介して、骨形成を促進させた可能性も考えられる。

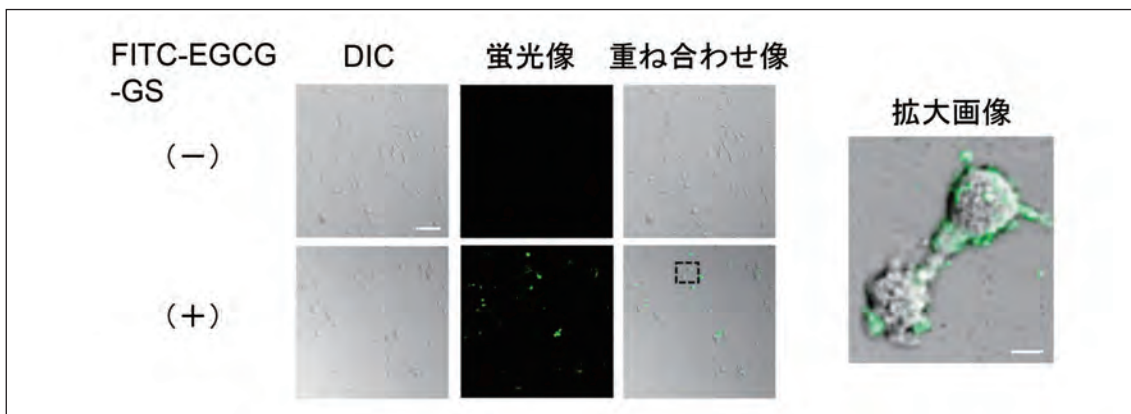


図5 FITC-EGCG-GSの分解後の細胞付着画像 (Honda Y, *Int J Mol Sci*, 2015, Fig.6より一部改変して転載)

10: 課題

上記のように、EGCGは潜在的に抗炎症作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、抗菌作用などを持つ。近年では、抗炎症作用と、骨再生が関与しているとの報告が相次いでなされ、事実著者らも、免疫反応を制御するサイトカインであるインターフェロン γ (IFN- γ) が自家骨の術後骨吸収を抑制し、長期的な骨再生を可能とすることを報告している³⁵⁾。現在のところ、EGCG-GSが骨再生を促した詳細なメカニズム解明には至っていないが、IFN- γ 同様、EGCGの持つ他の薬理作用(抗炎症作用など)が相乗的に関与した結果、EGCG-GSの骨形成促進に繋がっている可能性もある。また、EGCG-GSは、上記の複数領域と骨再生領域との関係を解明するデバイスとして応用可能であることから、同材料による骨形成機序の詳細な解明を進めているところである。

11: 今後の展望

筆者らは、既に広く知られているEGCGという緑茶由来の生理活性物質に対し一工夫を施して「貯留性・局所徐放性」を持たせることで、生体内での骨再生能を向上させうる手がかりを得た。さらに現在、既に報告したEGCG-GSに改良を加え、動物実験レベルではあるが、自家骨移植や上市されている骨補填材よりも優位に骨再生を促す材料への改良に成功している(未発表データ)。

「貯留効果や局所的な徐放効果を添加することで、物質の生体内での薬理効果を飛躍的に向上させうる」、このコンセプトは当然ながら他の植物由来生理活性物質にも転用可能である。したがって、安価かつ容易に手に入るものの、これまで見向きがなされなかった植物由来生理活性物質の再検討・機能化は、限られた資源を利用する有効な手段と考えられる。また、本稿で紹介している水中合成法は、カルボキシ基とヒドロキシ基を有する物質間で広く応用が可能であり、他の植物由来生理活性物質と高分子にも適用しうる。高分子という母材を介していることから、薬理効果が異なる多種類の植物由来生理活性物質や他の小分子との併用も可能である。したがって、より複雑な生体反応に応答しうる多機能性材料も理論的には

合成可能であり、新たな歯科再生材料開発に転用可能な戦略的技術となると期待している。

12: 終わりに

筆者らは、EGCGの文献的考察から、そこに一工夫「高分子に化学結合させる」というアイデアを追加することで、同物質の生体内での薬理効果を向上しうるという知見を世界に報告することが出来た。本材料の研究は今なお進行中であるが、同マテリアルを更に発展させ、歯科医療の発展に貢献しつつ、生物学的な謎の解明にも取り組めればと考えている。

最後になるが、これらの研究の遂行に際して、共同研究者の京都工芸繊維大学田中知成助教には、EGCG-GS開発当初より材料合成・改良の部分において、多大な貢献を頂いている。また、細胞実験、動物実験においては、大阪歯科大学馬場俊輔教授、橋本典也准教授をはじめとした再生グループに関わる先生方、大学院生、学部生にご協力頂きながら得られたものである。ここに深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) 松野智宣, 浅野一成. 骨補填材料 何を、いつ、どう使う? 骨補填材料の比較および臨床的エビデンスの検証. *Quintessence Dental Implantology*, 20: 358-361, 2013.
- 2) Sethi N. Applications of recombinant protein therapeutic agents in periodontics contributors. *Int J Med Med Sci*, 5: 380-390, 2013.
- 3) 高山廣光. 未利用薬用資源植物から創薬シード分子を探す. *化学と生物*, 40: 676-682, 2002.
- 4) 佐藤充克. レスベラトロールの健康長寿効果について. *日本醸造協会誌*, 107: 740-749, 2012.
- 5) Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, 148: 421-433, 2012.
- 6) 石見佳子. 大豆イソフラボン. 機能性食品素材の骨と軟骨への応用. 株式会社シーエムシー出版; 2011. 119-131.
- 7) 千葉大成. ヘスペリジンの骨代謝調節. 機能性食品素材の骨と軟骨への応用. 株式会社シーエムシー出版; 2011. 132-140.
- 8) 中川到之, 岩浅 潔, 此本晴夫, 袴田勝弘, 富田 勲, 工藤宏, 増澤武雄, 武本陽蔵. 日本茶の全てがわかる本. 農山漁村文化協会; 2008.

- 9) 山本 (前田) 万里. 茶の種類と化学成分. 茶の効能と応用開発. 株式会社シーエムシー出版; 2006. 1-19.
- 10) 角山 栄. 茶の世界史. 中央公論新社; 1980.
- 11) 中川到之. 茶の健康成分発見の歴史-化学者・薬学者の果たした役割を探る. 光琳; 2009.
- 12) 伊勢村護. 茶の種類と化学成分. 茶の効能と応用開発. 株式会社シーエムシー出版; 2006. 1-19.
- 13) Chung JH, Han JH, Hwang EJ, Seo JY, Cho KH, Kim KH, Youn JI, Eun HC. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. *FASEB J*, 17: 1913-1915, 2003.
- 14) Masuda M, Suzui M, Lim JT, Deguchi A, Soh JW, Weinstein IB. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J Exp Ther Oncol*, 2: 350-359, 2002.
- 15) Takai S, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Natsume H, Minamitani C, Mizutani J, Otsuka T, Tokuda H, Kozawa O. (-)-Epigallocatechin gallate reduces platelet-derived growth factor-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: suppression of SAPK/JNK. *Mediators Inflamm*, 2008: 291808, 2008.
- 16) Vali B, Rao LG, El-Sohehy A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem*, 18: 341-347, 2007.
- 17) Kim H, Sakamoto K. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses adipocyte differentiation through the MEK/ERK and PI3K/Akt pathways. *Cell Biol Int*, 36: 147-153, 2012.
- 18) Jin P, Wu H, Xu G, Zheng L, Zhao J. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a pro-osteogenic agent to enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow: an in vitro study. *Cell Tissue Res*, 356: 381-390, 2014.
- 19) Ikeda I. Multifunctional effects of green tea catechins on prevention of the metabolic syndrome. *Asia Pac J Clin Nutr*, 17 Suppl 1: 273-274, 2008.
- 20) Park G, Yoon BS, Moon JH, Kim B, Jun EK, Oh S, Kim H, Song HJ, Noh JY, Oh C, You S. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses collagen production and proliferation in keloid fibroblasts via inhibition of the STAT3-signaling pathway. *J Invest Dermatol*, 128: 2429-2441, 2008.
- 21) Maeda K, Kuzuya M, Cheng XW, Asai T, Kanda S, Tamaya-Mori N, Sasaki T, Shibata T, Iguchi A. Green tea catechins inhibit the cultured smooth muscle cell invasion through the basement barrier. *Atherosclerosis*, 166: 23-30, 2003.
- 22) 中川大, 禹 濟泰. カテキン. 機能性食品素材の骨と軟骨への応用. 株式会社シーエムシー出版; 2011. 141-150.
- 23) Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S. Implantation of green tea catechin alpha-tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 98: 263-271, 2011.
- 24) Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Wang JS. Green tea and bone metabolism. *Nutr Res*, 29: 437-456, 2009.
- 25) Tamura M, Ochiai K. Exploring the possible applications of catechin (gel) for oral care of the elderly and disabled individuals. *Jap Dent Sci Rev*, 48: 126-134, 2012.
- 26) Byun MR, Sung MK, Kim AR, Lee CH, Jang EJ, Jeong MG, Noh M, Hwang ES, Hong JH. (-)-Epicatechin gallate (ECG) stimulates osteoblast differentiation via Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ)-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem*, 289: 9926-9935, 2014.
- 27) Kaida K, Honda Y, Hashimoto Y, Tanaka M, Baba S. Application of green tea catechin for inducing the osteogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells in vitro. *Int J Mol Sci*, 16: 27988-28000, 2015.
- 28) Peng Y, Yu B, Liu F. Epigallocatechin-3-gallate promotes osteoblastic activity in human osteoblast-like cells. *Trop J Pharm Res*, 15: 313-317, 2016.
- 29) Handa T, Anada T, Honda Y, Yamazaki H, Kobayashi K, Kanda N, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. The effect of an octacalcium phosphate co-precipitated gelatin composite on the repair of critical-sized rat calvarial defects. *Acta Biomater*, 8: 1190-1200, 2012.
- 30) Honda Y, Tanaka T, Tokuda T, Kashiwagi T, Kaida K, Hieda A, Umezaki Y, Hashimoto Y, Imai K, Matsumoto N, Baba S, Shimizutani K. Local controlled release of polyphenol conjugated with gelatin facilitates bone formation. *Int J Mol Sci*, 16: 14143-14157, 2015.
- 31) 田中知成, 本田義知. 機能性架橋構造体及びその製造法並びに医療材料, 特開2015-208369
- 32) Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT. Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell*, 10: 259-272, 2012.
- 33) Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*, 22: 560-567, 2004.
- 34) Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275: 21785-21788, 2000.
- 35) Li P, Honda Y, Arima Y, Yasui K, Inami K, Nishiura A, Hashimoto Y, Matsumoto N. Interferon-gamma enhances the efficacy of autogenous bone grafts by inhibiting postoperative bone resorption in rat calvarial defects. *J Prosthodont Res*, 60: 167-176 Selected as a cover picture, 2016.