

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 歯学 )	氏名	白輪地 聡美
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Oxidative stress impairs the calcification ability of human dental pulp cells (酸化ストレスはヒト歯髄細胞の石灰化能を低下させる)			
論文審査担当者			
主査	教授	吾郷 由希夫	印
審査委員	教授	二川 浩樹	
審査委員	教授	河口 浩之	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>歯の内部吸収は、歯髄側から象牙質が吸収される稀な疾患で、その病態は未だ十分に明らかにされていない。間葉系細胞が形成する骨組織と象牙質は組成において共通する部分が多いが、骨組織が絶えずリモデリングによって吸収・再形成を繰り返しているのに対し、象牙質は形成された後には、ほとんど吸収されることはない。この相違点について、近年の研究では、歯髄細胞は破歯細胞の形成を抑制する能力を生来備えており、象牙質吸収のない恒常性の維持に関与しているのではないかと推察されている。</p> <p>酸化ストレスは、細胞内に過剰な活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が発生することで起こる反応のことである。過酸化水素は主要な ROS の一つであり、代謝調節やストレス応答においてセカンドメッセンジャーとして機能することが知られている。これまでに、酸化ストレスが歯髄細胞に及ぼす影響について、いくつかの検討が行われており、例えば、一定数の細胞死を誘導する濃度の過酸化水素水が、歯髄細胞の石灰化能を阻害することが報告されている。一方で、低濃度の過酸化水素水による極短時間の刺激では歯髄細胞のオステオポンチン、オステオカルシンの遺伝子発現が上昇するという報告もあり、さらなる検討が必要である。また、歯の内部吸収と酸化ストレスの関係については未だ明らかにされていない。</p> <p>本研究では、歯髄細胞の損傷が内部吸収の惹起に密接に関わっているとの仮説を立て、内部吸収のメカニズム解明の一助となるべく、酸化ストレスと歯髄細胞の石灰化能の関係性について以下の方法により検討した。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 過酸化水素がヒト歯髄細胞の生存率に及ぼす影響：培養ヒト歯髄細胞 (Lonza) をプレートに播種し、10%FBS 存在下 <math>\alpha</math>-MEM 培地で 24 時間培養した。無血清培地に置換した後、種々の濃度の過酸化水素水 (0, 100, 250, 500, 1000 <math>\mu</math>M) で 24 時間刺激した後、WST 法で生存率を評価した。</li> <li>2) 過酸化水素がヒト歯髄細胞の細胞内 ROS に及ぼす影響：ヒト歯髄細胞をプレートに播種し、10%FBS 存在下 <math>\alpha</math>-MEM 培地で 24 時間培養した。無血清培地に置換し、細胞膜透過性プローブ DCFH-DA を加えて 1 時間培養した後、過酸化水素水 100 <math>\mu</math>M で 2 時間刺激し、蛍光顕微鏡下で観察した。</li> <li>3) 過酸化水素がヒト歯髄細胞の石灰化能に及ぼす影響：ヒト歯髄細胞をプレートに播種し、10%FBS 存在下 <math>\alpha</math>-MEM 培地で培養し、サブコンフルエントとなった状態で無血清培地に変更し、過酸化水素水 100 <math>\mu</math>M で 6 時間刺激した。その後、石灰化誘導培地に置換し、7 日間培養した。培養終了後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を ALP 染色で、また ALP の遺伝子発現を培養細胞のライセートから total RNA を抽出後、RT-qPCR 法で解析した。また、同様の手順で歯髄細胞を刺激し、石灰化誘導培地に置換した後 28 日間培養し、石灰化結節の沈着をアリザリンレッド染色で評価した。</li> </ol> <p>2-アミノエチルジフェニルボラート (2-APB) は <math>IP_3</math> 受容体の膜透過性阻害剤として見出さ</p>			

れ、ストア作動性カルシウム流入(store-operated calcium entry: SOCE)機構の阻害剤としても使用されている。そこで、上記の培養系において、過酸化水素水刺激の1時間前に10  $\mu\text{M}$  のAPBを加え、同様に評価した。

〈結果〉

- 1) ヒト歯髄細胞を過酸化水素水(50, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{M}$ )存在下で24時間培養したところ、高濃度過酸化水素水処置群(250, 500, 1000  $\mu\text{M}$ )では著明な細胞死が認められた。一方で、50, 100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素水処理は細胞生存率を低下させなかった。
- 2) 細胞膜透過性プローブを用いて細胞内ROS発現について解析したところ、100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素水処理した歯髄細胞では、対照群に比べて有意に細胞内ROSが上昇していた。以上の結果から、以降の検討では、酸化ストレスの誘導剤として100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素水を使用することとした。また、 $\text{IP}_3$ 受容体の膜透過性阻害剤である2-APB(10  $\mu\text{M}$ )を前処置した群では、過酸化水素水によって誘導される細胞内ROS産生が抑制されていた。
- 3) 歯髄細胞を100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素水で刺激した後、石灰化誘導培地を用いて7日間培養したところ、対照群と比較して有意にALP活性が低下した。ALP mRNAの発現も過酸化水素水処理により著明に低下した。2-APB(10  $\mu\text{M}$ )を前処置した群では、過酸化水素水によるALP mRNA発現およびALP活性の低下が抑制された。また、歯髄細胞を100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素水で刺激した後、石灰化誘導培地を用いて28日間培養したところ、対照群と比較して有意に石灰化結節の沈着が抑制されていた。2-APB(10  $\mu\text{M}$ )を前処置した群では、過酸化水素水による石灰化結節沈着の抑制がみられなかった。

以上から、過酸化水素水刺激による酸化ストレスがヒト歯髄細胞の石灰化能を低下させることが明らかとなり、その低下に $\text{IP}_3$ シグナルが関与している可能性が示された。本研究の結果は、歯の内部吸収機序解明につながる重要な新知見である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。