

ふりがな氏名	みながわ えみか 皆川 咲佳
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 973 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Photodynamic reactions using high-intensity red LED promotes gingival wound healing by ROS induction (高出力赤色 LED を用いた光増感反応は活性酸素種の誘導により歯肉の創傷治癒を促進する)
学位論文掲載誌	Scientific Reports 第 13 巻 第 1 号 令和 5 年 10 月 10 日
論文調査委員	主査 梅田 誠 教授 副査 前田 博史 教授 副査 本田 義知 教授

論文内容要旨

近年、非侵襲的な治療として光源が使用されているが、安価で安全に使用できる Light-emitting diode (LED) が現在注目されている。歯周炎の治療においては、光源に光増感剤を組み合わせた光増感反応により活性酸素種 (ROS) が産生され、歯周病原細菌を殺菌することが知られている。しかし、歯肉の創傷治癒に重要な役割を果たすヒト歯肉線維芽細胞 (HGnFs) への影響についての報告は少ない。本研究では、メチレンブルー (MB) 添加後の HGnFs に高出力赤色 LED を照射し、創傷治癒に及ぼす影響と光増感反応により産生された ROS の関与について検討した。

光源に(株)モリタ製作所より供与された Led Engin 社製高出力赤色 LED (中心波長 : 650 nm) を使用し、MB (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に照射時間により調整したエネルギー量で照射した。細胞増殖能、遊走能および細胞毒性を評価し、至適エネルギー量を策定した。また Type I collagen (COL I), Fibronectin (FN) および Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) の産生量と遺伝子発現の変化を評価した。さらにウエスタンブロット法にて創傷治癒に関連する細胞内シグナルを検討した。また、照射後の ROS の産生量を測定し、抗酸化剤である N-Acetyl-L-cysteine (NAC) を使用することで、光増感反応で誘導された ROS による HGnFs への影響について検討を行なった。

MB 添加後に 4 J/cm^2 で照射すると、細胞増殖能と遊走能が促進された。細胞毒性は Lactate dehydrogenase の産生量が 12 J/cm^2 以上の照射で有意に増加した。また細胞外マトリックスの構成成分である COL I, FN および血管新生を促進する VEGF-A の産生量と遺伝子発現が増加した。シグナル伝達は Extracellular signal-regulated kinase (ERK) と c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化、さらに受容体型チロシンキナーゼに結合することで、細胞質へのシグナル伝達の足場となる

Grb2-associated binder-1 (Gab-1) のリン酸化の活性を認めた。また光増感反応による ROS の産生は有意に増加した。NAC により ROS を阻害すると細胞増殖能と遊走能が抑制され、また COL I, FN および VEGF-A の産生量と遺伝子発現が有意に減少した。さらに NAC によって ERK, JNK および Gab-1 経路の活性が抑制された。このことからエネルギー量を調整した光増感反応によって生じた ROS は、成長因子などのリガンドに依存せずに Gab-1 をリン酸化し、ERK と JNK 経路を活性化する可能性がある。さらに、創傷治癒を促進するこのプロセスにおいて、ROS が重要な役割を果たしていると考えられる。

以上より、HGnFs に対し、照射エネルギー量を調整した高出力赤色 LED による光増感反応は、ROS の産生を制御することで創傷治癒を促進する可能性が示唆される。

論文審査結果要旨

本論文は、メチレンブルー (MB) 添加後のヒト歯肉線維芽細胞(HGnFs)への高出力赤色 LED 照射が創傷治癒に及ぼす影響と、光増感反応により誘導される活性酸素 (ROS) の関与について検討することを目的とした。

多くの光源があるなかで、LED は安価で安全に使用できるため、新たな光源として注目されている。歯周治療時における光源と光増感剤による光増感反応は、ROS を産生することで歯周病原細菌を殺菌する。また光増感反応の影響は歯周病原細菌だけではなく、歯周組織についても考慮する必要がある。しかし、歯肉の創傷治癒に重要な役割を果たす HGnFs に対してほとんど報告がされていない。

そこで、歯周病原細菌を抑制する濃度の MB と適切なエネルギー量の照射により、光増感反応による ROS 産生量を調整することで、創傷治癒に対して良い効果が得られる可能性を検討した。

結果として、エネルギー量を調整した高出力赤色 LED による光増感反応が、細胞増殖能と遊走能の促進と I 型コラーゲン、フィブロネクチンおよび VEGF-A の産生量の増加を認めた。さらに光増感反応は、創傷治癒に関与するシグナルである ERK、JNK および受容体型チロシンキナーゼの活性を細胞質へ伝達する足場として機能する Gab1 のリン酸化の増加を認めた。ROS の阻害剤である N-アセチル L-システインを用いて光増感反応による ROS の関与について検討した。このことから光増感反応による ROS の産生量は、酸化ストレスになる過剰なレベルではなく、細胞にとって良い効果を得ることができる低レベルの産生量になるようにエネルギー量と光増感剤の濃度でコントロールすることが重要であると考えられる。

本論文の意義は、照射エネルギー量を調整した高出力赤色 LED 照射による光増感反応は、ROS の産生を調節することで創傷治癒を促進させる可能性を示唆している。

以上より、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。