

ふりがな氏名	たけうち ともき 竹内 友規
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 878 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 6 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	Palmitate induces apoptosis and inhibits osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (パルミチン酸はヒト歯根膜幹細胞のアポトーシスを誘導し、骨芽細胞分化を阻害する)
学位論文掲載誌	Archives of Oral Biology 第 112 巻 令和 2 年 4 月
論文調査委員	主査 富永 和也 教授 副査 梅田 誠 教授 副査 志水 秀郎 教授

#### 論文内容要旨

パルミチン酸はヒトの血漿中で最も豊富に存在する飽和脂肪酸であり、2型糖尿病の罹患によって血中濃度が増加し、人体の様々な種類の細胞に対して細胞毒性を及ぼすことが報告されている。パルミチン酸は、ヒト骨芽細胞やヒト骨髄由来間葉系幹細胞の炎症性サイトカイン産生とアポトーシスを促進し、ヒト骨芽細胞の分化と骨組織形成とを阻害することが報告されている。また、近年の研究によってパルミチン酸が歯周組織にも影響を及ぼす可能性があることが明らかとなり、パルミチン酸がヒト歯肉線維芽細胞の炎症性サイトカイン産生を促進することなどが報告されているが、歯周組織再生への影響については報告がない。本研究では、歯周組織再生に重要な役割を果たすヒト歯根膜幹細胞(hPDLSCs)の細胞増殖、アポトーシス誘導、骨芽細胞分化、炎症性サイトカイン産生にパルミチン酸が及ぼす影響について検討した。

hPDLSCs は、ヒト抜去歯から歯根膜組織を採取し、コラゲナーゼおよびディスパーゼにて酵素処理を行うことで分離培養し、継代数 3~5 代目の細胞を供試した。100  $\mu$ M および 250  $\mu$ M のパルミチン酸を含む増殖培地で hPDLSCs を 6~168 時間培養し、細胞増殖の検討、ELISA 法および TUNEL 染色によるアポトーシス誘導の検討を行った。また、100  $\mu$ M および 250  $\mu$ M のパルミチン酸を含む骨芽細胞分化誘導培地で hPDLSCs を 3~21 日間培養し、ALP 活性の測定、Procollagen Type 1 C-Peptide (PIP) および Osteocalcin (OCN) 産生量の ELISA 法による測定、カルシウム析出量の測定、Alizarin red 染色による石灰化物形成の評価、Runx2, IL-6 および IL-8 それぞれの mRNA の発現量の PCR 法による測定を行った。

パルミチン酸添加群において生細胞数は有意に減少し、アポトーシスを示す細胞数は有意に増加し

た。また、250  $\mu\text{M}$  のパルミチン酸添加群において ALP 活性、PIP 産生量、OCN 産生量、カルシウム析出量および Runx2 mRNA の発現量は特に有意に減少し、IL-6 mRNA および IL-8 mRNA の発現量は特に有意に増加した。

以上から、パルミチン酸は hPDLSCs のアポトーシス誘導および骨芽細胞分化の阻害によって歯周組織再生を阻害する可能性が示唆された。

### 論文審査結果要旨

2 型糖尿病に罹患した患者ではパルミチン酸の血中濃度が増加する。栄養素の一つであるパルミチン酸が人体の様々な種類の細胞に対して細胞毒性を示すことが医学の世界で注目されている中で、歯周組織再生に重要な役割を果たすヒト歯根膜幹細胞の細胞増殖、アポトーシス誘導、骨芽細胞分化および炎症性サイトカイン産生にパルミチン酸が及ぼす影響について明らかにしている。

ヒト抜去歯から歯根膜組織を採取し、酵素処理を行うことでヒト歯根膜幹細胞を分離、初代培養している。パルミチン酸の濃度 100  $\mu\text{M}$  を境界型あるいは軽度の 2 型糖尿病、濃度 250  $\mu\text{M}$  を重度の 2 型糖尿病患者と想定して実験している。それぞれの濃度のパルミチン酸を含む培地でヒト歯根膜幹細胞を 6~168 時間培養し、細胞増殖の検討、ELISA 法および TUNEL 染色によるアポトーシス誘導の検討を行い、さらに同じ濃度のパルミチン酸を含む骨芽細胞分化誘導培地で 3~21 日間培養し、ALP 活性の測定、Procollagen Type 1 C-Peptide (PIP) および Osteocalcin (OCN) 産生量の ELISA 法による測定、カルシウム析出量の測定、Alizarin red 染色による石灰化物形成の評価、Runx2、IL-6 および IL-8 それぞれの mRNA の発現量の PCR 法による測定を行っている。

その結果、パルミチン酸を添加した培地で培養すると生細胞数は有意に減少し、アポトーシスを示す細胞数は有意に増加、さらに高濃度のパルミチン酸添加群において ALP 活性、PIP 産生量、OCN 産生量、カルシウム析出量および Runx2 mRNA の発現量はとくに有意に減少し、IL-6 mRNA および IL-8 mRNA の発現量はとくに有意に増加していることを明らかにした。

以上、パルミチン酸がヒト歯根膜幹細胞のアポトーシスを誘導すること、および骨芽細胞分化を阻害することを証明した点において、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。