

ふ り が な 氏 名	おくの まさえ 奥野 真江
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	甲 第 920 号
学 位 授 与 の 日 付	令和 4 年 3 月 4 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	Effect of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma on Differentiation Potential of Human Deciduous Dental Pulp Fibroblast-like Cells (非熱的大気圧プラズマがヒト乳歯歯髄線維芽細胞の分化能に 及ぼす影響)
学 位 論 文 掲 載 誌	Applied Sciences 第 11 巻 第 21 号 令和 3 年 11 月
論 文 調 査 委 員	主 査 岡崎 定司 教授 副 査 中嶋 正博 教授 副 査 合田 征司 教授

論文内容要旨

間葉系幹細胞は、様々な組織に分化可能であり再生医療の供給源として注目されている。特にヒト乳歯歯髄組織から採取された幹細胞は、他の幹細胞よりも高い増殖能を有することが報告されており、歯科再生医療への可能性が期待されている。しかしながら歯髄に存在する幹細胞数は非常に少なく、ヒト乳歯歯髄由来幹細胞を臨床応用で有効に活用するためには、細胞数を十分に増加させ、それらの幹細胞特性を維持、向上させることが必須であると考えられる。

非熱的大気圧プラズマ（Non-thermal atmospheric pressure plasma : NTAPP）は大気圧下で容易に生成され、医科分野では生体組織への直接的な照射により、細胞増殖を活性化することが報告されている。プラズマ医療が歯科臨床においても活用されるためには、プラズマ発生条件と生物学的効果の相関について十分なデータの蓄積が必要である。そこで本研究では、*in vitro* で NTAPP が細胞に与える影響を明らかにするために、ヒト乳歯歯髄線維芽細胞（human deciduous dental pulp fibroblast-like cells : hDDPF）を用いて、NTAPP 照射による細胞増殖能および未分化能の検討を行った。

hDDPF は、歯根が 2/3 以上残存している齲蝕のない乳歯から採取し、3～7 継代した細胞を用いた。アルゴンガス（2.7 l/min [sml]）下にて発生させた NTAPP を、20mm の距離で hDDPF に照射し、照射後の細胞増殖能を MTS Assay により評価した。また、NTAPP によって生成された活性種が培養液に取り込まれ、その培養液が細胞に影響を与える可能性が報告されていることから、NTAPP 照射が細胞培養液に与える影響についても MTS により検討した。未分化能に関する遺伝子発現変動を検討するためにリアルタイム RT-PCR を行い、幹細胞特異的表面マーカーの確認は、Flow cytometry を用いて行った。

その結果、1 時間毎に 20 秒間、計 3 回の NTAPP 照射により、hDDPF 増殖能は約 1.3 倍増加が認められ、それ以上の過度な照射においては細胞が不活化されることが明らかとなった。また、NTAPP 照射を細胞と培養液の双方に行った群において、最も有意な細胞増殖が認められた。NTAPP 照射後 3 日間培養した hDDPF では、幹細胞マーカーである Oct4、Sox2、および Nanog の発現が増加し、幹細胞特異的表面マーカーである CD105 の発現増加も認められた。

以上の結果より、NTAPP 照射は、hDDPF の細胞増加や未分化能の維持に有効であり、再生医療のための効率的なツールであることが示唆された。

論文審査結果要旨

近年、低温大気圧プラズマを医療へと応用する「プラズマ医療」が盛んに研究されており、がん治療、創傷治癒および再生医療等に有効であると報告されている。歯科領域における再生医療研究では、ヒト乳歯歯髄細胞が再生医療の供給源として注目されているが、歯髄に存在する幹細胞数は非常に少なく今後、乳歯歯髄細胞を臨床応用で活用するためには、細胞数を十分に増加させるとともに、それらの幹細胞特性を維持、向上させることが必須である。本研究は、ヒト乳歯歯髄線維芽細胞 (hDDPF) に非熱的大気圧プラズマ (NTAPP) を照射した際における、細胞への影響を解明する基礎的研究であり、NTAPP 照射時における細胞増殖能、未分化に関連する遺伝子および表面マーカーの発現変動に焦点を当て検討することを目的としている。

細胞増殖能の評価方法は、アルゴンガス (2.7 l/min [sml]) 下にて発生させた NTAPP を、20mm の距離で hDDPF に照射、照射時間は 10, 20, 30, 40 秒間、それぞれの照射時間について照射回数を 1 から 4 回とし、1 回照射後 1 時間の間隔において照射条件を設定、照射後 MTS Assay により評価している。また、NTAPP 照射の影響が、直接的または間接的影響のいずれによるものかを明らかにするため、細胞増殖能を検討する際には 4 つの実験群を設けて検討を行っている。未分化能に関する遺伝子発現の評価は、Oct4、Sox2、Nanog、Sox9、ALP の 5 つの遺伝子についてリアルタイム RT-PCR 法を行い、幹細胞特異的マーカー発現確認は、CD44、CD105、CD146 の 3 つについて Flow cytometry を用いて検討している。

その結果、20 秒間、1 時間毎に計 3 回の NTAPP 照射を行った hDDPF 群において、非照射群と比較して約 1.3 倍増殖能増加が確認されている。一方でそれ以上の過度な照射においては細胞が不活性化するという結果を得ている。つまり細胞に応じた適切な NTAPP 照射条件が存在することを明らかにしている。また、NTAPP 照射を細胞と培養液の双方に行った群において、最も有意な細胞増殖が認められたことから、NTAPP 照射は直接的および間接的に細胞に作用していることを明らかにしている。さらに NTAPP 照射後 3 日間培養した hDDPF では、幹細胞マーカーである Oct4、Sox2、および Nanog の発現増加、幹細胞特異的表面マーカーである CD105 の発現増加が確認され、幹細胞特異性を維持、増加させる可能性について示唆している。

以上の結果より、NTAPP 照射は、hDDPF の細胞増加や未分化能の維持に有効であり、歯科領域における再生医療のための効率的なツールであることが明らかとした点において、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。