

ふ り が な 氏 名	おう きんしん 王 欣琛
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	甲 第 923 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	Enhancement of Bone-Forming Ability on Beta-Tricalcium Phosphate by Modulating Cellular Senescence Mechanisms Using Senolytics (セノリティクス薬を用いた細胞老化機序の制御による $\beta$ 型リン酸三カルシウムの骨形成能の向上)
学 位 論 文 掲 載 誌	International Journal of Molecular Sciences 第 22 巻 第 22 号 令和 3 年 11 月
論 文 調 査 委 員	主 査 松本 尚之 教授 副 査 橋本 典也 教授 副 査 本田 義知 教授

## 論文内容要旨

ストレス誘導性早期老化 (SIPS) 細胞は、様々なストレスによって誘導され、組織の機能障害を引き起こす。また、SIPS 細胞が骨再生を阻害し、その阻害効果は、セノリティクス（ダサチニブとケルセチン）の経口投与によって減少されたことが明らかになっている。一方、 $\beta$ -TCP は、歯科や整形外科で骨の欠損を治療するための骨補填材として広く研究されている。しかし、リン酸カルシウムの埋入によって引き起こされる老化細胞については、ほとんど知られていない。本研究は、ラットの骨欠損モデルを用いて、 $\beta$ -TCP 顆粒埋入のストレスによる細胞老化誘導の有無、 $\beta$ -TCP 骨形成能に対するセノリティクスの効果を評価することを目的とした。

$\beta$ -TCP の材料評価は、電界放出型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM)、X 線光電子分光分析装置 (XPS)、X 線回折装置 (XRD)、フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) を用いて行った。直径  $300\ \mu\text{m}$  以下と  $300\text{--}500\ \mu\text{m}$  の 2 種類の  $\beta$ -TCP 顆粒は 8 週齢のラットの頭蓋冠骨欠損部に埋入した。ラットは、1)  $\beta$ -TCP 顆粒 ( $300\ \mu\text{m}$  以下) 埋入群、2)  $\beta$ -TCP 顆粒 ( $300\text{--}500\ \mu\text{m}$ ) 埋入群、3)  $\beta$ -TCP 顆粒 ( $300\ \mu\text{m}$  以下) 埋入とセノリティクス経口投与群、4)  $\beta$ -TCP 顆粒 ( $300\text{--}500\ \mu\text{m}$ ) とセノリティクス経口投与群、5) 非埋入群の 5 群に分けた。手術より 1 週間後と 4 週間後に、頭蓋冠を回収した。組織学的染色 (SA- $\beta$ -gal 染色) および免疫蛍光染色 (p19, p21, uPAR) を行い、欠損部における SIPS 細胞の存在を評価した。骨形成を評価するために、マイクロコンピュータ断層撮影 ( $\mu\text{CT}$ ) とヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) を行った。破骨細胞形成を評価するために、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行った。活性酸素を評価するために、4-Hydroxy-2-nonenal 染色 (4-HNE 染色) を行った。

1 週間の  $\beta$ -TCP 顆粒 ( $300\ \mu\text{m}$  以下) 群では明らかな細胞老化を誘発し、p19 および p21 陽性細胞（老

化細胞)が増加した。 $\beta$ -TCP 顆粒 (300-500  $\mu$ m) は中程度の数の老化細胞を発生させた。セノリティクスの投与により、老化細胞は著しく減少した。 $\mu$ CT と H-E 染色の結果、 $\beta$ -TCP 顆粒のみの場合に比べて、セノリティクスを投与すると、骨形成が著しく促進されることがわかった。4 週の TRAP 染色では、 $\beta$ -TCP 顆粒を埋入した骨欠損部には破骨細胞が多く見られたのに対し、セノリティクスを経口投与した群には破骨細胞が少なかった。また、1 週間で  $\beta$ -TCP 顆粒を埋入した骨欠損部では、強い 4-HNE 染色が観察されたが、セノリティクスを経口投与した場合には、骨欠損部に活性酸素はほとんど見られなかった。これらの結果から、 $\beta$ -TCP は潜在的に老化細胞を誘導し、セノリティクスは老化に関連するメカニズムを調節し、骨再生を促進する可能性が示唆された。

## 論文審査結果要旨

本研究では、ラットの骨欠損モデルを用いて、 $\beta$ -TCP 顆粒埋入のストレスによる細胞老化誘導の有無、 $\beta$ -TCP 骨形成能に対する Senolytics の効果を評価することを目的とした。

直径 300  $\mu$ m 以下と 300-500  $\mu$ m の 2 種類の  $\beta$ -TCP 顆粒は 8 週齢のラットの頭蓋冠骨欠損部に埋入した。ラットは、1)  $\beta$ -TCP 顆粒 (300  $\mu$ m 以下) 埋入群、2)  $\beta$ -TCP 顆粒 (300-500  $\mu$ m) 埋入群、3)  $\beta$ -TCP 顆粒 (300  $\mu$ m 以下) 埋入と Senolytics 経口投与群、4)  $\beta$ -TCP 顆粒 (300-500  $\mu$ m) と Senolytics 経口投与群、5) 非埋入群の 5 群に分けた。手術より 1 週間後と 4 週間後に、頭蓋冠を回収した。組織学的染色 (SA- $\beta$ -gal 染色) および免疫蛍光染色 (p19, p21, uPAR) を行い、欠損部における SIPS 細胞の存在を評価した。骨形成を評価するために、マイクロコンピュータ断層撮影 ( $\mu$ CT) とヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) を行った。破骨細胞形成を評価するために、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行った。活性酸素を評価するために、4-Hydroxy-2-nonenal 染色 (4-HNE 染色) を行った。

$\beta$ -TCP によって老化を誘発し、p19 および p21 陽性細胞 (老化細胞) が増加した。セノリティクスの投与により、老化細胞は著しく減少した。 $\mu$ CT と H-E 染色の結果、 $\beta$ -TCP 顆粒のみの場合に比べて、Senolytics を投与すると、骨形成が著しく促進されることがわかった。 $\beta$ -TCP 顆粒を埋入した骨欠損部には破骨細胞と強い 4-HNE 染色が多く見られたのに対し、Senolytics を経口投与した群には破骨細胞と活性酸素が少なかった。

以上、 $\beta$ -TCP は潜在的に老化細胞を誘導し、Senolytics は老化に関連するメカニズムを調節し、骨再生を促進する可能性が示唆されたという点において、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。

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。