

ふりがな 氏名	ちようめい 趙明
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 953 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 3 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	Aggravation of cellular senescence in human periodontal fibroblasts cultured with tobacco smoke components by stretching stimulation (タバコ煙成分で培養したヒト歯根膜線維芽細胞の伸展刺激による細胞老化の増悪化)
学位論文掲載誌	Journal of Osaka Dental University 第 57 巻 第 1 号 令和 5 年 4 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

喫煙は多くの疾患の原因や増悪因子となっている。口腔領域でも歯周炎の進行や矯正歯科治療での歯の移動速度を遅延させることが報告されている。一方、生体内外に起因する様々なストレスは、老化細胞（ストレス誘導性老化細胞）を誘導し、これらの老化細胞が周囲の組織・器官に傷害を与えることが近年、明らかになってきた。このような状況に基づき、これまでに、タバコの煙を包括的に捕集した溶液（TSCs）を独自に調製し、喫煙が口腔内組織における細胞老化に与える影響の解明を進めている。本研究では、TSCs が歯根膜細胞の老化に与える影響を調べた。加えて、歯周組織が、生理的・非生理的に咬合などの力を受けている状態であることを鑑み、TSCs で誘導した老化歯根膜細胞に対する生体力学刺激の影響も調査した。

ヒト歯根膜線維芽細胞（HPd1Fs）へ TSCs（50 μ g/ml）を添加（0 日目）し、2 日ごとに培地交換しながら 7 日目まで培養した。単回添加群（TSCs 含有培地で 2 日間培養後、以降 TSCs 不含培地で培養）、頻回添加群（TSCs 含有培地で培養）、およびコントロール群（TSCs 不含培地で培養）における 2、4、および 7 日目の細胞生存率を測定した。頻回添加群およびコントロール群における、2、4、および 7 日目の細胞の senescence-associated beta galactosidase（SA- β -gal）活性ならびに老化関連タンパク質（p21, p16, γ H2AX）の発現を蛍光染色法にて調べた。加えて、頻回添加群およびコントロール群における、2、7 日目の細胞の p21 および p16 の遺伝子発現レベルを、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）で調べた。TSCs 不含培地で 2 日間培養した細胞、TSCs 含有培地で 2 日間培養した細胞、および TSCs 頻回添加により 7 日目まで培養した細胞に対し、細胞伸展装置にて 2 日間伸展培養（20%ひず

み、10回/分)した。伸展培養後、p21, p16, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), および interleukin (IL)-6 の遺伝子発現レベルを qPCR にて調べた。

TSCs 単回添加群では、細胞生存率の低下は一過的であったが、TSCs 頻回添加群では、細胞生存率は持続的に低下していた。TSCs を頻回添加した HPd1Fs では、時間とともに SA- β -gal 活性ならびに老化関連タンパク質および遺伝子の発現が上昇した。これらのことから、TSCs の持続的作用は HPd1Fs の老化を誘導することが示された。さらに、老化誘導 HPd1Fs における p16, p21, TNF- α , および IL-6 の遺伝子発現レベルは、伸展刺激により増加した。この結果は、伸展刺激が HPd1Fs の老化を悪化させることを示唆している。

論文審査結果要旨

本研究では、タバコの煙を捕集した溶液 (TSCs) が歯根膜線維芽細胞 (HPd1Fs) の老化に与える影響を調べた。加えて、TSCs で誘導した老化 HPd1Fs に対する生体力学刺激の影響も調査した。

増殖アッセイでは、TSCs 単回添加群、TSCs 頻回添加群、対照群 (TSCs を含まない培地で培養) の細胞生存率を測定した。頻回添加群と対照群の細胞で、SA- β -gal 活性と老化関連タンパク質の発現を蛍光染色で調べた。また、頻回添加群と対照群の細胞において、qPCR により p21 と p16 の遺伝子発現量を調べた。対照群の細胞および TSCs を含む培地で培養した細胞は、細胞伸長装置を用いて伸長培養を行った。延長培養後、qPCR により p21、p16、TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量を調べた。

TSCs の持続的作用は HPd1Fs の老化を誘導することが示された。さらに、老化誘導 HPd1Fs における p16, p21, TNF- α , および IL-6 の遺伝子発現レベルは、生体力学刺激により増加した。この結果は、伸展刺激が HPd1Fs の老化を悪化させることを明らかにした。

以上の成果より、喫煙は口腔内組織における細胞老化に与える影響の解明が期待できることを示唆し、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。