

Title	Effect of nicotine on periodontal ligament derived cells cultured under mechanical stress
Author(s)	飯島, 由貴
Journal	歯科学報, 119(6): 540-541
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/5068">http://hdl.handle.net/10130/5068</a>
Right	
Description	

氏名(本籍)	飯島由貴 (群馬県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2150 号(甲第 1355 号)
学位授与の日付	平成28年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Effect of nicotine on periodontal ligament derived cells cultured under mechanical stress
掲載雑誌名	Clinical Dentistry and Research 第41巻 3号 106-113頁 2017年
論文審査委員	(主査) 齋藤 淳教授 (副査) 井上 孝教授 末石 研二教授 新谷 誠康教授 山本 仁教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

現在、日本の喫煙率は減少傾向にあるが、喫煙は社会的な問題となっている。歯科領域では歯周病に対するニコチンの影響が報告されているが、歯科矯正学分野においては歯の移動に対するニコチンの影響を検討しているものは少なく、その中でも歯の移動が速くなるという論文と遅くなるという論文と相反する論文が発表されている。また、歯の移動に対するニコチンの影響を *in vitro* において証明したものはほとんどなく、その影響はいまだに明らかになっていない。本研究では、ラット歯根膜由来細胞にニコチンを投与し、矯正力を想定したメカニカルストレスとして遠心力を与えることで骨代謝に関わる RANKL と OPG、炎症に関わる IL-6 と VEGF の発現について検討を行った。

#### 2. 研究方法

4週齢の Sprague-Dawley 系、雄性ラットの門歯より歯根膜を採取し通法に従って培養したのち、第5継代目の細胞を実験に用いた。実験はニコチンとメカニカルストレスを与えた群を実験群とし、ニコチンとメカニカルストレスともを与えていない群(コントロール群)、ニコチンのみを与えた群、メカニカルストレスのみを与えた群の計4群に分けて行った。細胞は12 well のプレートに5,000 cells/cm<sup>2</sup>で播種し、2日後に培養液の交換とニコチンの投与や遠心力の負荷を行い、24時間後に評価を行った。

ニコチン濃度は喫煙者の血中濃度を参考に20 ng/mL とし、メカニカルストレスは矯正力を想定し遠心機によって2,000 rpm の力を20分間(およそ119 g/cm<sup>2</sup>) 与えた。評価は蛍光免疫染色にて RANKL の発現を観察し、通法に従い mRNA を抽出し、定量 RT-PCR にて RANKL, OPG, IL-6, VEGF の発現量を検索した。

#### 3. 研究成績および考察

蛍光免疫染色において RANKL の発現はすべての群の歯根膜由来細胞において観察されたが、コントロール群と比較してニコチン群、メカニカルストレス群、実験群はより強く発現していた。RT-PCR の結果より、RANKL の発現はコントロール群よりもニコチン群、メカニカルストレス群、実験群で有意に高く、ニコチン群よりもメカニカルストレス群、実験群は有意に高かった。メカニカルストレス群と実験群に有意な差はみられなかったが、メカニカルストレス群よりも実験群は高い傾向を示していた。また、OPG の発現はメカ

ニカルストレス群が他の群と比較して有意に高かったが、他の3群間に有意な差はみられなかった。IL-6とVEGFはコントロール群と比較してニコチン群、メカニカルストレス群、実験群は有意に高く発現していたが、ニコチン群、メカニカルストレス群、実験群に有意な差はみられなかった。これらの結果より、OPGの発現は実験群においてメカニカルストレス群と比較して有意に低かったことより、メカニカルストレスをかけたときのOPGの発現に対してニコチンは抑制的に作用することが示唆された。

歯根膜由来細胞にニコチンとメカニカルストレスを与えるとRANKLの発現は有意に高くなり、OPGの発現は有意に低くなったことから、RANKLの発現が有意になり骨吸収が促進されることが示唆された。また、IL-6やVEGFはRANKLの発現に寄与することが示唆された。

#### 4. 結 論

培養した歯根膜由来細胞にニコチンやメカニカルストレスを与えたときに上昇するIL-6やVEGFの発現が加わり、RANKLが発現することが示唆された。さらに、ニコチン投与によってOPGの発現が抑制され、その結果として、骨吸収が促進されることが示唆された。

### 論 文 審 査 の 要 旨

本論文は培養した歯根膜由来細胞にメカニカルストレスとニコチンを与え、その影響を蛍光免疫染色とRT-PCRにて確認し、報告したものである。その結果、培養した歯根膜由来細胞にニコチンとメカニカルストレスとして遠心力をかけることで、OPGの発現は有意に低くなり、相対的にRANKLの発現が高くなるので、骨吸収が促進されることが示唆された。また、ニコチンと遠心力をかけた際にIL-6とVEGFが発現し、RANKLの発現に寄与することが示唆された。

本審査委員会は平成28年2月23日に行われ、まず飯島由貴大学院生より論文概要が提示された後、各審査委員より本論文に対し次のような質問がなされた。1)実験に使用した細胞の採取に関して、2)実験期間の設定について、3)ニコチン濃度の決定に関して、4)メカニカルストレスとして用いた遠心力に関して、5)OPGの発現に対するニコチンの影響に関して、などであった。これらの質問に対し、1)歯根の中央部をdishに接着させるように配置し、そこから生え出た細胞を歯根膜由来細胞として実験に用いた、2)day 1, day 3, day 5と実験を行っているが、今回は発現が顕著であったday 1に注目した、3)喫煙者の血中濃度を参考に予備実験を行い決定した、4)遠心力は臨床的には圧迫側を想定しており、その力は至適矯正力と近似するように設定した、5)OPGの発現に関して、メカニカルストレス群と比較して実験群の発現が有意に低いことより、メカニカルストレスをかけた時のOPGの発現はニコチンによって抑制されることが示唆される、と概ね妥当な回答が得られた。その他に、論文内容に適した表題への変更の検討、材料および方法の記載に対する補足、付図の修正、考察の追加等、修正すべき点が指摘され訂正が行われた。

以上より、本研究で得られた結果は今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。