

氏 名（本籍）： 倉 内 美智子

学 位 の 種 類： 博 士 （ 歯 学 ） 学 位 記 番 号： 歯 博 第 7 0 5 号

学位授与年月日： 平成27年3月25日 学位授与の要件： 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻： 東北大学大学院歯学研究科（博士課程）歯科学専攻

学位論文題目： Cytoprotective Effect of Short-Term Pretreatment with Proanthocyanidin on Human Gingival Fibroblasts Exposed to Harsh Environmental Conditions
（過酷環境に暴露されたヒト歯肉線維芽細胞に対するプロアントシアニジン短時間処理の細胞保護効果）

論文審査委員： （主査）教授 高 橋 信 博
教授 佐々木 啓 一 教授 江 草 宏

論文内容要旨

【目的】ポリフェノールの一種であるプロアントシアニジン（PA）に光照射を行うと、活性酸素（ROS）の生成を介した殺菌作用を発揮する。また、マウス線維芽細胞をPAで1分間処理すると、光照射の有無にかかわらず、細胞の増殖促進効果を示すことが報告されている。本研究ではPA短時間処理後のヒト歯肉線維芽細胞（HGF）の増殖を指標とし、各種ストレス負荷に対するPAの細胞保護効果の検討を目的とした。

【方法】基本培地は10% fetal bovine serum（FBS）含有 Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）を用い、細胞密度 2×10^4 cells/ml の HGF を96穴プレートに100 μ l ずつ播種し、37℃の5% CO₂条件下のインキュベーター内で培養し、以下の三項目を検討した。1. HGF に対するPAの増殖促進作用：サブコンフルエントのHGFをPA生理食塩水（生食）溶液で1分間処理し24時間後の細胞増殖をMTT（3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide）法で測定した。2. 純水負荷（浸透圧ストレス）および生食負荷（飢餓ストレス）に暴露されたHGFに対するPAの細胞保護効果：純水および生食負荷と同時にPA処理、あるいはPA1分間前処理後に純水および生食負荷し24時間後の細胞増殖をMTT法で測定した。3. Serum-deprivation stress 負荷条件下培養のHGFに対するPAの細胞保護効果：PA生食溶液を1分間処理したサブコンフルエントのHGFを血清無添加培地で24-72時間培養し、細胞増殖をMTT法で測定した。また、PA生食溶液を1分間処理した100%コンフルエントのHGFを血清無添加培地で24時間培養後、DCFH-DA（2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate）を用いて細胞内ROSを定量した。

【結果】1：マウス線維芽細胞と同様にHGFに対してもPA前処理で濃度依存的に細胞増殖は促

進された。2：各種ストレス負荷で細胞増殖活性は低下したが、PA 同時あるいは前処理で活性低下は抑制された。3：血清無添加培地での培養条件下では、サブコンフルエントの場合、HGF の細胞増殖活性は低下するが、PA 前処理により活性低下は抑制された。100%コンフルエントの場合では細胞内ROS量は増加し、PA 前処理でその増加は抑制された。

【考察】HGF への PA 短時間処理は細胞増殖促進だけでなく、過酷条件に暴露された HGF に対して細胞増殖活性の低下抑制や酸化ストレス抑制などの細胞保護効果を発揮することを示唆した。細胞保護効果の機序に関しては、マウス線維芽細胞での先行研究において一部の PA 構成成分の細胞内取り込みが確認されていることから、HGF の場合も細胞内に取り込まれた PA がレスベラトロール等の他のポリフェノールで報告されている様な転写因子 Nrf2 等を介した抗酸化防御機構活性化の関与を想定しているが、PA 構成成分である flavan-3-ol の多量体の細胞膜吸着による膜保護効果の可能性も考えられる。

【結語】本研究より、HGF において PA 前処理による細胞増殖促進・保護効果が示されたことから、口腔内の創傷治癒促進効果や傷害性刺激への保護効果が期待でき、新しい治療法の可能性を持つ。今後は In vivo での検証と作用機序の解明が研究課題である。

審査結果要旨

プロアントシアニジンは、果物、茶、野菜や植物の種子に多く含まれるポリフェノールの一種であり、カテキン、エピカテキン、エピカテキンガレート等の flavan-3-ol の多量体である。これまで申請者の属する研究グループは、プロアントシアニジンが光照射による活性酸素の生成を介した殺菌作用を発揮すること、さらに光照射に関係なく短時間の処理でマウス線維芽細胞の増殖を促進することを示してきた。これらの背景のもと、本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞を対象として、後者の細胞増殖促進効果を確認するとともに、各種ストレスに対するプロアントシアニジンの細胞保護効果について検討している。

研究の結果、マウス線維芽細胞と同様に、ヒト歯肉線維芽細胞に対しても、プロアントシアニジン短時間前処理（1分間前処理）で濃度依存的に細胞増殖は促進されることが明らかになった。さらに、純水負荷（浸透圧ストレス）および生食負荷（飢餓ストレス）によりヒト歯肉線維芽細胞の増殖活性は低下したが、プロアントシアニジンの共存もしくは短時間前処理によって、このストレス由来の活性低下は低減されることが示された。

本研究によって、ヒト歯肉線維芽細胞へのプロアントシアニジン短時間前処理は、細胞増殖促進とともに、ストレスに対する細胞保護効果を発揮することが示唆された。細胞保護効果の機序に関しては、マウス線維芽細胞での先行研究においてプロアントシアニジン構成成分の細胞内取り込みが示唆されていることから、細胞内に取り込まれたプロアントシアニジンが他のポリフェノールで報告されている様な転写因子 Nrf2 等を介した抗酸化防御機構活性化の可能性や、プロアントシアニジン構成成分である flavan-3-ol 多量体の細胞膜吸着による膜保護効果の可能性を考察している。

本研究より、ヒト歯肉線維芽細胞において、プロアントシアニジン短時間前処理による細胞増殖促進および保護効果が示された。これらの結果は *in vitro* に限定したものであり、今後、*in vivo* での検証および作用機序の解明が必要であるが、将来におけるプロアントシアニジン短時間前処理による口

腔内の創傷治癒促進効果や傷害性刺激への保護効果に基づく新しい口腔内創傷治療法の可能性を示唆するものである。

以上のことから、本研究は博士（歯学）の学位に値すると判断する。