

論文の内容の要旨

氏名：佐藤 諒 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：大気圧窒素プラズマ刺激は *osterix*, *osteocalcin* と ALP 発現増加および *iNOS* と *COX-2* 発現低下によって骨芽細胞の分化を促進する

プラズマは、狭義では、部分的あるいは完全に電離しイオン化した気体であり、物理的特性が通常の気体とは異なり、固体、液体、気体に次ぐ第4の状態として定義されている。プラズマの性質は、圧力、温度、密度、純度やガス種などの条件によって異なる。酸素や窒素のような非貴ガスのプラズマは、弱い紫外線や活性酸素など多くの反応種を発生することが知られ、被照射体への生理活性効果が期待される。

大気圧プラズマジェット (atmospheric pressure plasma jet; APPJ) は、医療機器の滅菌、癌細胞の増殖抑制および創傷治癒など医療用として広く利用されている。特に、低温 APPJ は、被照射体が熱によるダメージを受けることなく、生体への使用が可能であることから、新しい医療器具として期待されている。

APPJ は、様々な気体を使用することが可能であり、細胞への APPJ 照射の影響は、使用される気体の種類によって異なっている。しかし、窒素ガスを用いた APPJ (N-APPJ) 照射が、骨芽細胞分化に及ぼす影響についての詳細なメカニズムは不明である。そこで、N-APPJ 照射が骨芽細胞の分化に及ぼす影響を細胞生物学的に検討することを目的として、本研究を企図した。

N-APPJ 照射は、細胞培養培地 20 mL に大気圧窒素プラズマとして N-APPJ (outflow 6 L/ min) を 0, 60, 120 および 180 秒施行した。なお、照射の距離は培地の表面から約 5-10 mm 以内とし、非照射群は、照射を行わなかった細胞培養培地を使用した。細胞培養培地の pH は、N-APPJ 照射後 0, 5, 10, 15, 30, 60 および 180 分で、pH メーターを用いて調べた。

骨芽細胞としては、マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1細胞) を用い、細胞培養に関しては、MC3T3-E1細胞を 96穴または 6 穴プレートに 2.0×10^4 cells/cm² の密度で播種し、10%ウシ胎児血清 (FBS), 1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシン B を添加した alpha modified Eagle's medium (α -MEM) を培地とした。37°C, 5% CO₂ 存在下で 24 時間培養し、細胞の生着を確認した後、APPJ 照射培地または非照射培地で 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日間培養した。なお、APPJ 照射培地の交換は 3 日毎に行った。

細胞増殖と alkaline phosphatase (ALP) 活性について、N-APPJ を 0, 60, 120 および 180 秒照射した細胞培養培地で骨芽細胞を 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日間培養し、N-APPJ 照射が細胞増殖および ALP 活性に及ぼす影響を調べた。次に、120秒の照射群において、3, 7 および 14 日目に細胞を回収し、骨芽細胞分化促進関連転写因子として runt-related transcription factor 2 (Runx2) および *osterix*, 細胞外マトリックスタンパクとして type I collagen (ColI) および *osteocalcin* (OCN), 加えて inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) および cyclooxygenase-2 (*COX-2*) の遺伝子発現を real-time PCR 法で、タンパク発現を Western Blotting 法を用いて調べた。

その結果、14 日間の培養期間において、培養培地への APPJ 照射の有無による MC3T3-E1 細胞の細胞数の差異は認められなかった。120 秒の照射群では、培養 14 日目において、非照射群と比較して ALP 活性を有意に上昇させた。また、照射群では、非照射群と比較して、培養 7 日目の *osterix*, 培養 14 日目の OCN および、培養 7 日目の ALP の遺伝子およびタンパク発現をそれぞれ有意に上昇させた。一方、Runx2 および ColI の遺伝子発現は照射培地による影響を認めなかった。

直接的な APPJ 照射が、様々な細胞で活性酸素/窒素種 (ROS/RNS) を介して、細胞死またはアポトーシスを引き起こすことが過去の研究で示されている。*nitric oxide synthase* は短命種のフリーラジカルである

nitric oxide を生成する。これらの報告より、N-APPJ 照射が、MC3T3-E1 細胞の ROS/RNS の発現に影響を及ぼすのではないかと考え、APPJ 照射培地で MC3T3-E1 細胞の *iNOS* の遺伝子およびタンパク発現を調べた。その結果、照射群では、非照射群と比較して、MC3T3-E1 細胞の *iNOS* 発現を低

下させた。骨芽細胞を含む様々な細胞の iNOS 発現の上昇は, prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生と PGE₂ 合成酵素 COX-2 を誘導することが報告されている。そこで本研究は, N-APPJ 照射が COX-2 の遺伝子およびタンパク発現に及ぼす影響を調べた。その結果, 照射群では, 非照射群と比較して, MC3 T3-E1 細胞の COX-2 の遺伝子およびタンパク発現を低下させた。これまでの研究で, IL-1 α がラットの骨肉腫由来細胞株 ROS 17/2.8 細胞の ALP 活性の低下および石灰化物形成を抑制し, PGE₂ 発現を上昇させることを示した。また, タツノオトシゴから生成された抗炎症ペプチドは, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate で誘導された iNOS および COX-2 発現の上昇を抑制し, ヒト骨芽細胞の分化と ALP 活性を上昇させたと報告されている。このことから, APPJ 照射培地刺激による iNOS および COX-2 発現の低下は, 骨芽細胞の分化を促進することが考えられた。

以上の結果から, N-APPJ 照射培地の骨芽細胞では, osterix, OCN, および ALP 発現と ALP 活性が促進される一方で, iNOS および COX-2 発現は抑制されることが示唆された。

これらの知見は, N-APPJ の間接的照射は, 骨芽細胞の分化を促進し, 骨形成を促進する可能性を示唆した。