

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592182  
 研究課題名 (和文)  
 ニコチンと LPS が歯槽骨吸収を促進して歯周病を増悪する分子機構の解明  
 研究課題名 (英文)  
 Clarification of molecular mechanism that deteriorates periodontitis with alveolar bone resorption by nicotine and lipopolysaccharide.  
 研究代表者  
 前野 正夫 (MAENO MASAO)  
 日本大学・歯学部・教授  
 研究者番号：60147618

研究成果の概要：ニコチンと LPS が、歯肉上皮を浸透して骨芽細胞および破骨細胞前駆細胞に作用することを想定し、本研究を企図した。ニコチンと LPS は、骨芽細胞に対して破骨細胞形成を促進する種々の因子の発現を増加させるとともに、骨芽細胞による類骨層のタンパク代謝を分解系に傾けた。破骨細胞前駆細胞に対しては、骨基質タンパク分解酵素の発現増加を介して骨吸収能を上昇させた。これらの結果、歯槽骨吸収が促進されて歯周病が増悪する可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：喫煙，ニコチン，リポ多糖 (LPS)，骨芽細胞，破骨細胞，プロスタグランジンE<sub>2</sub>，マトリックス金属プロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では、健康増進法の施行(2003年)に伴って、能動喫煙のみでなく受動喫煙の防止が叫ばれるようになり、公共の場での禁煙ゾーンの拡大、タバコの広告規制や増税などによって、日本人の喫煙率はしだいに減少に転じている。しかし、近年のWHOによる調査では、日本人女性の喫煙率は他の先進国と比べて低い位置にあるが、男性の喫煙率は突出している。喫煙は、肺癌や口腔癌などの悪性

新生物、心疾患、脳血管疾患および慢性閉塞性肺疾患などのリスクファクターであるだけでなく、歯周病における環境面からみた最大のリスクファクターでもあり、歯周病の発症や進行および治療効果の低下に大きく関与することが指摘されている。また、インプラント治療や抜歯後の治癒にも悪影響を及ぼすことが報告されている。タバコの煙には、約40種類の発癌物質を含む約200種類の有害

な物質が含まれており、その中でニコチン、タールおよび一酸化炭素が三大有害物質といわれている。

#### <喫煙と歯周病の因果関係>

Grossiらは、生涯喫煙量が臨床アタッチメントレベルと歯槽骨吸収の両方に量-反応関係がみられ、歯周ポケットが5 mm以上の喫煙者と非喫煙者にそれぞれスクリーニングおよびルートプレーニングを行い、3カ月後に治療効果を比較すると、プロービングデプスの減少量、臨床アタッチメントレベル(CAL)の獲得量ともに非喫煙者の方が有意に高い値を示したと報告している(J Periodontol 65, 260-267, 1994; 66, 23-29, 1995; 67, 1094-1102, 1996)。また、Tonettiらは、1日10本以上の喫煙者と非喫煙者に対して歯周組織再生誘導法(GTR法)を行い、1年後に治療効果を比較すると、非喫煙者は喫煙者よりもCALの獲得量が約2.5倍改善されたと報告している。これらの報告は、喫煙者は外科的・非外科的歯周治療を問わず、非喫煙者に比べて治療後の治癒が悪いことを示している(J Clin Periodontol 22, 229-234, 1995)。

#### <喫煙が微生物叢と宿主に及ぼす影響>

喫煙者の口腔内には、歯周病菌として注目されている*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*および*T. forsythensis*が、非喫煙者よりも高い割合で棲息し、これらの菌の増殖能も喫煙者の方が強いと報告されている(J Periodontol Res 34, 25-33, 1999)。これらの菌は歯周ポケット中の歯根面にバイオフィルムを形成して強く付着しており、菌の細胞壁由来のリポ多糖(LPS)は、歯周組織に炎症・免疫反応を誘発させ、重篤な歯周病に発展させる。宿主の炎症・免疫反応には、タバコの成分の中でニコチンが主に作用する。ニコチンは、好中球による貪食能と走化性、マクロファージによる抗原提示機能を抑制させる。また、唾液中のIgAや血清中のIgG、および*A. actinomycetemcomitans*を特異的に抑制するIgG<sub>2</sub>量を低下させ、これらの影響が、歯周組織の抵抗力の低下につながると考えられている(J Periodontol 68, 842-850, 1997)。

しかし、歯周病の発症と進行とくに歯槽骨

の吸収に視点をおいて、骨形成と骨吸収に及ぼすニコチンおよびLPSの影響を調べた報告は少なく、その分子機構の詳細は不明な点が多い。我々は、タバコの成分中で最も含有量の高いニコチンの刺激を受けた骨芽細胞は、自らの骨形成能を低下させるとともに、骨代謝のバランスを骨吸収に傾けるのではないかと考えた。また、口腔清掃状態不良の喫煙者は、同条件の非喫煙者よりも歯槽骨吸収の程度が大きいのではないかと考えた。

そこで我々は、まず骨芽細胞による石灰化nodule形成と細胞外マトリックスタンパク発現に及ぼすニコチンの影響について検討した。具体的には、骨芽細胞としてヒト骨肉腫由来の株化骨芽細胞Saos-2を用いて、*in vitro*での石灰化nodule形成と、その形成に必要なアルカリホスファターゼ(ALPase)活性、細胞外マトリックスタンパクとしてI型コラーゲン(COL-1)、骨シアロタンパク(BSP)およびオステオポンチン(OPN)の発現に及ぼすニコチンの影響を調べた。その結果、ニコチン刺激によって、石灰化nodule形成能、nodule中のカルシウム量およびALPase活性ともに低下した。また、ニコチン刺激によってCOL-1とOPNの発現も低下した。以上の結果から、骨芽細胞がニコチンによって刺激されると、ALPase活性、COL-1およびOPNの発現低下によって、骨形成能が低下することが明らかになった(Life Sci 77, 2273-2284, 2005)。

破骨細胞の形成は、骨芽細胞が発現するreceptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)と破骨細胞前駆細胞(単球/マクロファージ)が発現するRANKL受容体(RANK)を介する細胞間相互作用によって行われ、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)はこの過程に不可欠な液性因子として知られている。また、骨芽細胞のRANKL発現はインターロイキン(IL)-11やプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)によって促進される一方、骨芽細胞はRANKLに対するおとりの受容体osteoprotegerin(OPG)を産生し、破骨細胞前駆細胞との細胞間相互作用を抑制して破骨細胞の形成を調節している。

そこで我々は、LPS刺激の強弱を口腔清掃状態の指標として捉え、骨芽細胞を介する破

骨細胞形成に及ぼすニコチンおよびLPSの影響を調べた。具体的には、Saos-2のM-CSFとOPG発現およびPGE<sub>2</sub>産生に及ぼすニコチン単独刺激およびLPSとの同時刺激の影響を調べた。その結果、Saos-2のM-CSF発現とPGE<sub>2</sub>産生は、ニコチン単独刺激でわずかに増加し、LPSとの同時刺激で顕著に増加した。一方、OPG発現は、ニコチン単独刺激ではほとんどその影響が認められなかったが、同時刺激では低下した。また、あらかじめニコチン単独またはLPSと同時刺激したSaos-2の培養上清を破骨細胞前駆細胞(マウス単球RAW264.7)に作用させたところ、同時刺激では、酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色陽性かつ多核の破骨細胞様細胞が多数観察された。これらの結果から、骨芽細胞がニコチンおよびLPSによって刺激されると、M-CSFとPGE<sub>2</sub>の産生促進、およびOPGの産生抑制によって、破骨細胞の形成が促進されることが明らかになった(Life Sci 78, 1733-1740, 2005)。

## 2. 研究の目的

骨吸収の主要な役割を演じるのは破骨細胞であるが、破骨細胞形成の初期段階では骨芽細胞の存在が不可欠である。我々は、歯垢中の嫌気性の歯周病原菌由来のLPS刺激の強弱を口腔清掃状態良否の指標として捉え、2007年度は、ニコチンとLPSが骨芽細胞のPGE<sub>2</sub>産生、シクロオキシゲナーゼ(COX), PG受容体(EP1-4)およびM-CSFの発現に及ぼす影響を調べた。また、破骨細胞の機能発現にも着目し、酸を産生して無機質溶解を担う炭酸脱水酵素II型(CAII)と有機質分解を担うカテプシンK (CK)の発現に及ぼすニコチンの影響を調べた。その他、関連実験として、歯周病原菌の代謝産物の一つである酪酸を用いて、骨芽細胞の機能発現および骨芽細胞を介する破骨細胞の形成に及ぼす酪酸の影響を調べた。さらに、軟骨マトリックス産生に及ぼすIL-6およびsoluble IL-6受容体の影響も併せて検討した。

2008年度は、骨芽細胞による類骨層のタンパク代謝に着目し、骨芽細胞のマトリックス金属プロテアーゼ(MMP), 金属プロテアーゼ組織インヒビター(TIMP), プラスミノゲンアクチベーター(PA)およびPAインヒビター-1発現に及

ぼすニコチンとLPSの単独刺激および同時刺激の影響を調べた。また、破骨細胞前駆細胞をニコチンで刺激したときのシグナル伝達についても調べた。その他、関連実験として、破骨細胞の分化に及ぼすIL-17の影響、ならびに軟骨細胞のPGE<sub>2</sub>産生およびEP受容体の発現に及ぼすIL-1Bの影響を検討した。

## 3. 研究の方法

ニコチンおよびLPSの刺激を受ける供試細胞には、破骨細胞前駆細胞としてマウス由来の株化単球/マクロファージ(RAW264.7), 骨芽細胞としてヒト骨肉腫由来の株化細胞(Saos-2細胞)を用いた。また、関連実験として用いる軟骨細胞は、市販のヒト正常軟膏細胞を用いた。これらの細胞の培養には、10%ウシ胎児血清と1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含むDulbecco's modified Eagle's mediumを培養液として用いて、5%炭酸ガス存在下で行った。なお、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させるためには、RANKLとM-CSFの存在とくにRANKLの存在が不可欠であるので、これらのタンパクの存在のもとで、細胞をニコチンで刺激した。刺激期間は10日間とし、経日的に検索因子の発現を調べた。なお、軟骨細胞の培養期間は28日間とした。

骨芽細胞のPGE<sub>2</sub>産生は、専用のkitを用いて調べた。また、骨芽細胞のCOX-2およびPG受容体の遺伝子およびタンパク発現は、それぞれreal-time PCR法およびELISA法で調べた。

破骨細胞形成の確認は、細胞を酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色して調べた。RAW264.7細胞に対するニコチン刺激後の細胞内シグナル伝達因子(PKC, MEK/ERK)のリン酸化は、専用のkitを用いて調べた。また、RAW264.7細胞のCAIIおよびPKの遺伝子およびタンパク発現は、それぞれreal-time PCR法およびELISA法で調べた。

骨芽細胞の骨基質タンパク代謝に関連する様々な種類のMMPs, TIMPs, PAsおよびそのインヒビターPAI-1の遺伝子およびタンパク発現は、それぞれreal-time PCR法およびELISA法で調べた。

軟骨細胞は、LPS刺激によって骨吸収を促進するIL-1BおよびIL-6を産生する。そこで、関連実験として、PGE<sub>2</sub>産生とその受容体およ

びCOXの発現に及ぼすIL-1βの影響, 次いで軟骨細胞を介する破骨細胞の形成を想定し, RANKL, N-CSFおよびOPGの発現に及ぼすIL-1βの影響を上記の方法で, 遺伝子およびタンパクレベルで調べた。なお, 破骨細胞形成の有無は, TRAP染色して調べた。さらに, 軟骨基質タンパク産生に及ぼすIL-6とsoluble IL-6 receptorの影響を, 上記の方法で, 遺伝子およびタンパクレベルで調べた。

また, 骨芽細胞による骨形成および破骨細胞形成に及ぼす酪酸の影響を検討する際の石灰化物の形成はアリザリン赤染色で, 骨基質タンパクおよび破骨細胞形成関連タンパク(M-CSF, RANKL, OPG)の遺伝子およびタンパク発現は, 上記のように, それぞれreal-time PCR法およびELISA法で調べた。

#### 4. 研究成果

<2007 年度>

LPSは, ニコチン刺激によって増加したPGE<sub>2</sub>産生(図 1), COX-2, EP4 およびM-CSF発現をさらに増加させた。

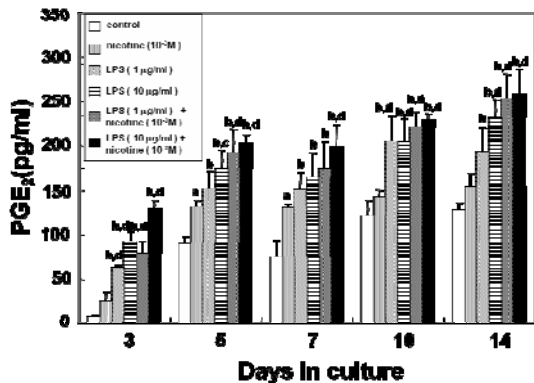


図 1. PGE<sub>2</sub>産生に及ぼすニコチンとLPSの影響

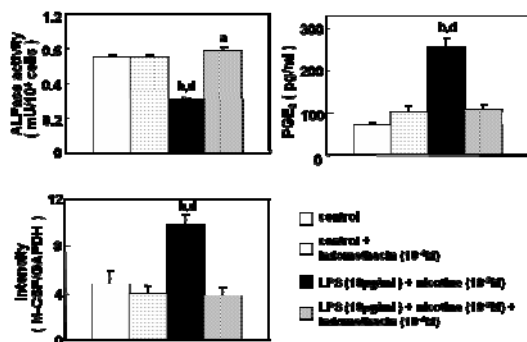


図 2. ALPase 活性, PGE<sub>2</sub> 産生および M-CSF 発現に及ぼす COX-2 阻害剤の影響

また, ニコチンとLPSの同時刺激で増加したPGE<sub>2</sub>産生とM-CSF発現, 同時刺激で低下したALPase活性は, いずれもCOX-2 阻害剤添加によって, コントロールレベルまで戻った(図 2)。これらの結果から, LPSは骨芽細胞のCOX-2 発現増加を介してニコチン依存性のPGE<sub>2</sub>産生量をさらに増加させること, また, 増加したPGE<sub>2</sub>はautocrineに骨芽細胞に作用し, M-CSF産生を介して破骨細胞形成を促進させることが示唆された。破骨細胞の機能発現に及ぼすニコチンの影響では, ニコチン刺激によってCAII発現は増加したが, CK発現は低下した。この相違は, 細胞内シグナル伝達の違いによるものと推定された。

その他, 関連実験として, 歯周病原菌の代謝産物である酪酸は, 低濃度では石灰化物形成を促進し, 破骨細胞の形成を抑制すること, また, IL-6がsoluble IL-6受容体の存在下で, 軟骨基質タンパク産生を促進することを明らかにした。

<2008 年度>

MMP-1, -2, -3 (図 3)およびtPAの発現は, それぞれの単独刺激で上昇し, 同時刺激ではさらに上昇した。

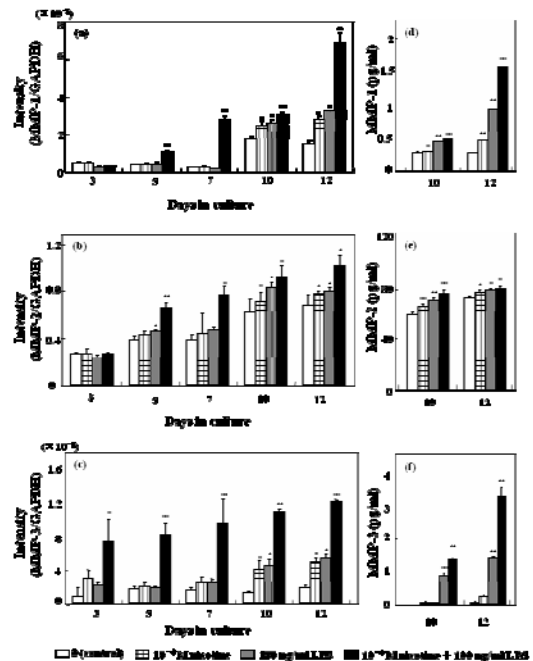


図 3. MMP-1, -2, -3 産生に及ぼすニコチンとLPSの影響

一方, TIMP-1, -3, -4の発現は, 単独刺激で低下し, 同時刺激ではさらに低下した。また, ニ

ニコチンとLPS刺激によって上昇したMMP-1発現は、ニコチンとD-tubocurarineあるいはLPSとpolymyxin Bとの同時刺激によって、コントロールレベルまで低下し、MMP-1発現がニコチンとLPSの作用によって上昇したことが確認された。我々は、ニコチンとLPSが、骨芽細胞のPGE<sub>2</sub>産生を増加させることを、前年度の研究で明らかにした。そこで、上昇したMMP-1発現は、PGE<sub>2</sub>産生を伴うオートクリン作用によるものではないかと考え、MMP-1発現に及ぼすCOX-2選択阻害剤(NS398, celecoxib)の影響を調べた。その結果、ニコチンとLPS刺激によって上昇したMMP-1発現には、阻害剤の影響は認められず、PGE<sub>2</sub>のオートクリン作用は関与してないことが明らかになった(図4)。

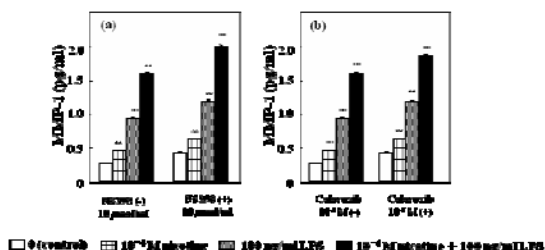


図4. ニコチンとLPS刺激によって増加したMMP-1発現に及ぼすCOX-2阻害剤の影響

これらの結果から、ニコチンおよびLPSは、骨芽細胞による類骨層のタンパク代謝を分解系に傾けることが示唆され、この傾向は、それらの同時刺激の方がより顕著であることが明らかになった。また、破骨細胞の機能発現に及ぼすニコチンの影響では、ニコチンはERKを介して酸産生酵素CAHの発現を増加することが明らかになった。以上のことから、歯周病原菌の内毒素と喫煙という2つのリスクファクターの重複によって、歯槽骨における骨基質代謝はより一層分解系に傾く可能性が示された。

その他、本研究の関連実験として、炎症性サイトカインの中で、IL-1 $\beta$ がPGE<sub>2</sub>産生を介して軟骨細胞のEP4受容体発現を促進すること、また、IL-1 $\beta$ が軟骨細胞のRANKLおよびM-CSFの発現低下とOPG発現増加によって、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞の分化を抑制することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Watanabe Y, Suzuki N, Tanabe N, Maeno M 他5名(2009) IL-1 $\beta$  stimulates the expression of prostaglandin receptor EP4 in human chondrocytes by increasing production of prostaglandin E<sub>2</sub>. Connect Tissue Res, in press 査読有
- ② Katono T, Tanabe N, Tanaka H, Suzuki N, Maeno M 他5名(2009) Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. Arch Oral Biol 54(2), 146-155 査読有
- ③ Katono T, Tanabe N, Suzuki N, Maeno M 他4名(2008) Sodium butyrate stimulates mineralized nodule formation and osteoprotegerin expression by human osteoblasts. Arch Oral Biol 53(10), 903-909 査読有
- ④ Namba A, Suzuki N, Maeno M, 他6名(2007) Effects of IL-6 and soluble IL-6 receptor on the expression of cartilage matrix proteins in human chondrocytes. Connect Tissue Res 48(5), 263-270 査読有
- ⑤ Shoji M, Tanabe N, Suzuki N, Maeno M 他4名(2007) Lipopolysaccharide enhances the production of nicotine-induced prostaglandin E<sub>2</sub> by an increase in cyclooxygenase-2 expression in osteoblasts. Acta Biochim Biophys Sin 39(3), 163-172 査読有

[学会発表] (計13件)

- ① 渡部悠介 他6名(2008年10月29日) IL-1 $\beta$ はPGE<sub>2</sub>産生を介して軟骨細胞のEP4受容体発現を促進する. 第26回日本骨代謝学会学術集会, 大阪
- ② 北見 聡 他7名(2008年10月4日) IL-17は破骨細胞の形成を抑制する. 第57回日本口腔衛生学会・総会, 大宮
- ③ 田中秀樹 他6名(2008年10月4日) ニコチンは破骨細胞のERKを介して酸産生酵素の発現を増加する. 第57回日本口腔衛生学会・総会, 大宮
- ④ 上遠野朋子 他6名(2008年10月4日) 骨芽細胞の骨基質タンパク代謝に及ぼすニコチンとリポ多糖の影響. 第57回日本口腔衛生学会・総会, 大宮
- ⑤ 田中秀樹 他4名(2008年8月30日) ニコチンは破骨細胞の炭酸脱水酵素II型の発現を増加させる. 第17回硬組織再生生物学会学術大会・総会, 徳島
- ⑥ 上遠野朋子 他3名(2008年3月24日) 酪酸が骨芽細胞による石灰化 nodule 形成と破骨細胞分化調節因子の発現に及ぼす影響. 第81回日本細菌学会総会, 京都

- ⑦田中秀樹 他 7 名 (2007 年 10 月 4 日) ニコチンは破骨細胞の炭酸脱水酵素 II 型とカテプシン K の発現を増加させる. 第 56 回日本口腔衛生学会・総会, 東京
- ⑧上遠野朋子 他 7 名 (2007 年 10 月 4 日) 酪酸は骨芽細胞の石灰化 nodule 形成を促進し破骨細胞分化を抑制する. 第 56 回日本口腔衛生学会・総会, 東京
- ⑨Namba A 他 6 名 (2007 年 9 月 18 日) The effect of IL-6 and sIL-6R on the expression of cartilage matrix proteins. JBMR 22. 29<sup>th</sup> ASBMR Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑩Tanaka H 他 7 名 (2007 年 9 月 18 日) Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E<sub>2</sub> production by osteoblasts. JBMR 22, 29<sup>th</sup> ASBMR Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑪難波亜希 他 4 名 (2007 年 7 月 19 日) IL-6 は sIL-6R 存在下でヒト軟骨細胞による軟骨基質タンパク発現を増加する. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 札幌
- ⑫難波亜希 他 6 名 (2007 年 5 月 19 日) IL-6 は sIL-6R 存在下で軟骨細胞の分化を抑制し軟骨基質形成を促進する. 第 59 回日本大学歯学会総会, 東京

- ⑬上遠野朋子 他 5 名 (2007 年 5 月 19 日) 骨芽細胞の骨タンパク代謝におけるニコチンの影響. 第 59 回日本大学歯学会総会, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前野 正夫 (MAENO MASAO)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号: 6 0 1 4 7 6 1 8

### (2) 研究分担者

鈴木 直人 (SUZUKI NAOTO)  
日本大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 1 0 2 2 6 5 3 2

### (3) 連携研究者 (2007 年度のみ)

田邊 奈津子 (TANABE NATSUKO)  
日本大学・歯学部・助教  
研究者番号: 1 0 4 0 9 0 9 7

### (3) 連携研究者 (2008 年度のみ)

田中 秀樹 (TANAKA HIDEKI)  
日本大学・歯学部・専修研究員  
研究者番号: 9 0 4 3 4 0 7 6