

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19791627  
 研究課題名（和文） ヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチド産生にタバコ煙物質が与える影響について  
 研究課題名（英文） Effects of tobacco smoke components on expressions of antimicrobial peptide on human gingival epithelial cells  
 研究代表者  
 林 潤一郎 (jun-ichiro Hayashi)  
 愛知学院大学・歯学部・講師  
 研究者番号：30350937

研究成果の概要：歯周病は、喫煙によって増悪することが知られている。歯肉の上皮細胞から産生される抗菌物質がタバコの煙によりどのように影響を受けるかを調べた。歯周病菌で刺激した口腔上皮の細胞にタバコ煙抽出を加えたところ、抗菌ペプチド（ $\beta$ ディフェンシン）の発現量が減少することが明らかになった。また、初期の自然免疫に関係するインターロイキン8の発現量も減少していた。タバコより口腔上皮細胞の自然免疫が抑制されることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	450,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：(1)抗菌ペプチド (2)タバコ煙抽出物 (3)歯周病のリスク因子 (4) $\beta$ -difensin

(5)喫煙 (6)歯周病関連細菌

## 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、口腔内細菌の感染により生じる疾患であるが、その発症や進行にはその他の多くの因子がリスク因子として関与している。中でも、喫煙は最も影響の強いリスク因子で、報告により差がある。喫煙が関わる歯周病のメカニズムについては不明である。歯周炎の原因は歯周病関連細菌の感染であり、喫煙と口腔内細菌や歯周病関連細菌の関係についていくつかの報告がみられる。喫煙者と非喫煙者の歯肉縁下細菌叢を比較すると、喫煙者ではある特定の歯周病関連細菌の割合が多く、歯周病の治療が施された場合に

においても、それらの細菌は減少しにくいとされている。*Aggregatibacter actinomycetem-comitans* は定着しやすくなると報告している。しかしながら、これらの現象のメカニズムについては、報告が少なく、特に、歯肉上皮への細菌の定着に関しては、喫煙がどのようなメカニズムで影響を及ぼすかは、明らかにされていない。

歯周組織の炎症は、歯肉上皮が細菌により刺激されることから始まることを考えると、喫煙が歯肉上皮への細菌の定着に及ぼす影響について、そのメカニズムを明らかにすることは重要である。粘膜上皮は、自然免疫の

応答が最初に生じる場で、細菌が定着すると、上皮の防御的な反応として、粘膜上皮細胞から  $\beta$ -defensin などの抗菌ペプチドが産生されることが知られている。歯肉上皮においても、歯周病関連細菌の刺激で、抗菌ペプチドが産生されることが報告されている。この抗菌ペプチドによる歯肉上皮の自然免疫は、歯周病関連細菌の感染から歯周組織を守る最初のバリアであり、歯周病の発症や進行を防ぐ上で、極めて重要な機構である。この機構が喫煙により受ける影響については、報告がみられない。そのため、喫煙が歯肉上皮への細菌の定着に与える影響と、そのメカニズムを解明するための一助として、歯肉上皮における自然免疫機構である抗菌ペプチドの産生に注目し、ニコチンやコチニンなどのタバコ成分がヒト歯肉上皮からの抗菌ペプチド産生に及ぼす影響について調べる研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、歯周炎関連細菌の刺激による、ヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチド ( $\beta$ -defensin2) 産生が、ニコチンやコチニン、タバコ煙抽出物質 (cigarette smoke extracts, CSE) などのタバコ成分により、影響されるかどうかを確認する。ヒト歯肉上皮においては、細菌の刺激が直接的に作用することで抗菌ペプチドが産生される経路と、細菌の刺激により産生される IL-8 や TNF- $\alpha$  などのサイトカインが  $\beta$ -defensin2 の産生を促す経路が報告されている。また、肺胞の上皮細胞においては、CSE が IL-8 や TNF- $\alpha$  の産生が抑制されるとの報告があるため、タバコ成分により、歯周病関連細菌刺激による歯肉上皮細胞からの IL-8 や TNF- $\alpha$  などの各種サイトカイン産生が変化するかどうかについて調べる予定である。

また、細菌刺激による細胞内のシグナル伝達に、タバコ成分が与える影響についても検討する予定である。本研究では、MAP キナーゼ経路やその下流の転写因子 (AP-1) にタバコ成分が影響を及ぼし、その結果、直接的に抗菌ペプチドの発現が抑制されることや、IL-8 や TNF- $\alpha$  などのサイトカインが抑制されることで、間接的に抗菌ペプチドの産生が減少する可能性があるという仮説を立て、MAP キナーゼ経路の各種因子や AP-1、あるいは NF- $\kappa$ B などの活性の変化を調べていきたいと考えている。さらに、口腔上皮においては  $\beta$ -defensin の発現に toll-like レセプター (TLR2,4) や、フィブロネクチンが関与する場合があるという報告などがあるため、これらのレセプターに関連するタバコ煙の影響についても、検討したい。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

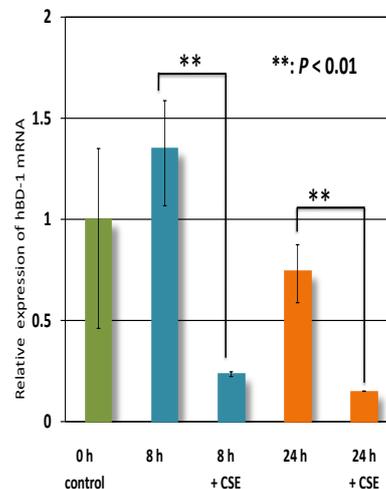
ヒト口腔上皮株化細胞 SCC25 細胞を L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン添加の DEM/Ham's F12 培地にて 5%CO<sub>2</sub>,37°C で継代培養した。

### (2) 細菌の調整

*Porphyromonas.gingivalis* ATCC33277 株を Yeast extract、ヘミン、メナジオン、DTT 添加の Trypticate Soy Broth にて、37°C 嫌気条件下で OD600 が 1.0 になるまで培養した。2000 $\times$ g にて 10 分間遠心分離し、ペレットを PBS で 2 回洗浄した。その後、OD600 が 0.3 になるよう PBS にて調整した。

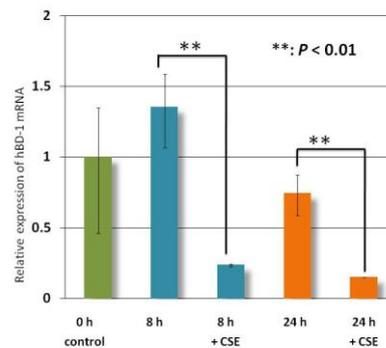
### (3) CSE の調整

フィルター付きタバコの煙を直接ポンプにて吸引し、PBS 中へ噴き出すことで、煙中の成分を溶出させ、これをタバコ煙抽出物質 (CSE) とした。



## 4. 研究成果

### (1) $\beta$ -defensin-1 (hBD-1) の産生に対する CSE の影響

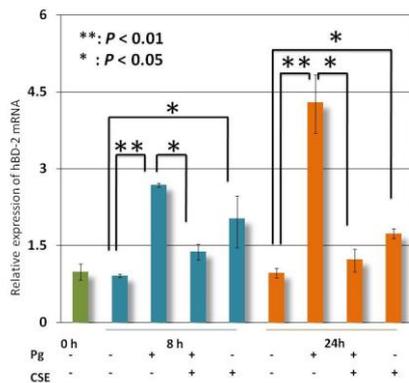


ヒト口腔上皮細胞 SCC25 細胞に、CES を作用させたところ、8 時間、24 時間ともに、hBD-1 の発現量は減少した。

Krisanaprakornkit らは、ヒト歯肉上皮細胞を *Fusobacterium nucleatum* の細胞壁成分にて

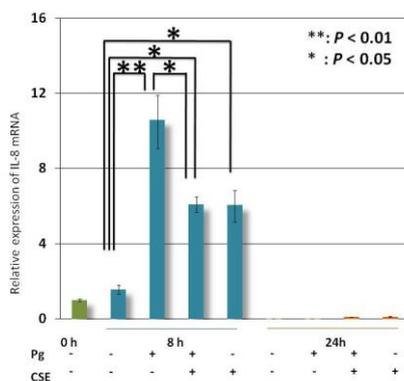
刺激しても hBD-1 の発現が変化せず、IL-8 の発現とも独立して発現していたため、hBD-1 の発現は炎症とは関係しない状態で恒常的に生じていることを報告している。また ouhara からも、ヒト歯肉上皮細胞を *A. actinomycetemcomitans* の外膜タンパクで刺激し、hBD-1 は炎症非依存的に産生されることを示している。これらは hBD-1 が健常歯肉の自然免疫応答に関与していることを示唆している。今回の結果は、この健常組織での自然免疫応答がタバコ煙に部分的に阻害される可能性を示唆しているといえる。

### (2) hBD-2 の産生に対する CSE の影響



SCC25 細胞に *P.gingivalis* を作用させると hBD-2 発現は増加した。この増加は、菌体だけでなく、CSE も同時に作用させると抑制された。

### (3) IL-8 に対する CSE の影響



(2) で調べた hBD-2 の発現と同時に、IL-8 の発現も測定したところ、8 時間において、*P.gingivalis* 刺激により IL-8 の産生の亢進が見られ、CSE の添加によりそれが抑制された。24 時間においては、すべてのサンプルにおいて、ベースラインより発現が低下していた。

ヒト歯肉上皮細胞において、hBD-2 は恒常的には産生されておらず、歯周病関連細菌や炎症性サイトカインの刺激により産生され

ることが、これまでいくつかの研究で明らかになっている。それらの報告では、同時に IL-8 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインも産生されることから、ヒト歯肉上皮細胞においては、hBD-2 の発現は炎症期の自然免疫応答のであるとされている。今回の結果においては、菌体刺激により増加した hBD-2 の発現は、CSE の作用により減少し、8 時間においては、IL-8 の発現も同様の増減を示した。IL-8 は炎症の初期において、炎症部位への好中球の遊走を促すケモカインとしての作用が知られている。今回の結果において、hBD-2 の発現が CSE により抑制されたことから、炎症期においても、タバコ煙はヒト口腔上皮の自然免疫に抑制的に働く可能性が示唆された。

これまでの結果により、タバコ煙中の成分が、ヒトの口腔上皮細胞における抗菌ペプチドの産生を抑制することが明らかとなった。このことは、喫煙が歯周炎の発症や、進行に関与するメカニズムについて、自然免疫の抑制という新たな視点を与えたことを意味する。CSE が hBD の発現を抑制するメカニズムについてはまだ明らかになっていない。当初の研究計画においては、20 年度中に細胞内伝達経路やレセプターの発現まで、解析する予定であった。今後も研究を継続し、これらの解析を行っていく予定である。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. Jun-ichiro Hayashi, Yosuke Kamiya, Sota Sato, Koji Inagaki, Toshihide Noguchi  
Tobacco smoke impairs the innate immune response in oral epithelial cells as a risk factor of periodontitis  
6<sup>th</sup> Congress of the European Federation of Periodontology, Stockholm, Sweden  
2009.6.5

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 潤一郎 (jun-ichiro Hayashi)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：30350937

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：