

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593099

研究課題名(和文)ニコチンが血管内皮細胞を介し骨吸収を促進することを証明する

研究課題名(英文)Nicotine promote bone resorption through the vascular endothelial cells

研究代表者

廣瀬 公治(Kimiharu, Hirose)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：10218836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙が歯周病のリスクファクターであることを実験的に証明するためにヒト静脈血管内皮細胞(HUVEC)に対しニコチンが骨吸収を促進するサイトカインの産生を制御するか否かについて検索を行った。その結果、ニコチンはHUVECから豊富に産生され、骨吸収に抑制的に作用するOsteoprotegerin(OPG)のmRNA発現を抑制した。一方これとは反対に骨吸収を促進するReceptor activator of nuclear factor kappa-B ligand(RANKL)のmRNA発現を促進した。以上の結果は、喫煙が歯周病のリスクファクターとなることを強く示す基礎的知見である。

研究成果の概要(英文)：In this study used human vein endothelial cells to examine whether nicotine regulated production of cytokines which promoted bone resorption in vitro. Nicotine inhibited the mRNA expression of osteoprotegerin in the HUVEC. In contrast, nicotine promoted the mRNA expression receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand to promote bone resorption from the HUVEC. These results provide fundamental knowledge that indicates strongly that smoking is a risk factor for periodontal disease.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯学 細胞 歯周病

### 1. 研究開始当初の背景

喫煙が歯周病のリスクファクターであることが広く知られるようになった。これら知見を支える基礎的研究の多くは、喫煙による免疫担当細胞や歯周組織構成細胞に対する障害を示しているが、歯周病の最も典型的症状である骨吸収を喫煙が促進するという直接証拠は得られていなかった。

### 2. 研究の目的

歯周組織を構成する細胞のうち、毛細血管内皮細胞は歯周疾患の発症や進行に重要な役割を果たしているとともに、破骨細胞分化因子である RANKL と競合し骨吸収を抑制するオステオプロテゲリン(OPG)の重要な産生細胞であることが明らかにされてきた。

申請者は歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) が血管内皮細胞からの OPG 産生を NF- $\kappa$ B 依存的に誘導すること (BBRC, 2004) また、OPG が *P.gingivalis* の持つシステインプロテアーゼが招来する血管内皮細胞のアポトーシスを抑制すること (FEMS Microbiol. Lett. 2006)、さらには、OPG が血管内皮細胞のマイグレーションと増殖を促進することを示した (Microvascular Res. 2008, in press)。これらの報告は、血管内皮細胞の産生する OPG が歯周組織において骨吸収抑制の他にもサバイバルファクターとして重要な役割を果たしていることを示すものである。そこで本研究ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞に対するニコチンの作用について OPG をはじめとする骨代謝に強く関連する生物活性を指標として検索を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

血管内皮細胞はヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いた。単層を形成した HUVEC にニコチン ( $10^{-3} \sim 10^{-5}M$ ) を添加し所定の時間培養を行った。培養終了後、細胞からフェノ

ール法を用い total RNA を回収した。回収した RNA は、RT-PCR による mRNA 発現検索に用いた。一方、培養上清は、そこに産生されたサイトカイン量測定のための試料とした。サイトカイン測定は ELISA により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) HUVEC におけるニコチンレセプターの存在

本研究で用いる HUVEC においてどのような種類のニコチンレセプターが発現しているかを確かめるために RT-PCR によるニコチンレセプターの mRNA 発現を検索した。その結果、HUVEC では 3~7 のレセプターの発現が認められた (図 1)。

3            4            5            7



図 1 血管内皮細胞におけるニコチンレセプターの存在

#### (2) ニコチンが及ぼす HUVEC における OPG mRNA 発現に対する作用

OPG は骨吸収を抑制する効果を持つ。この OPG の産生細胞のひとつとして HUVEC がある。そこで、ニコチンが HUVEC における OPG 産生にどのような影響を与えるかについて検討を行った。ニコチン添加後 12 時間で HUVEC を回収し、そこから total RNA を回収し RT-PCR にて OPG の mRNA 発現を調べた。その結果、ニコチンは HUVEC からの OPG mRNA 発現を抑制することが示された (図 2)。一方、OPG がそのデコイとして機能する Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) について同様に検索したところ、ニコチンは HUVEC からの RANKL mRNA 発現を促進することが認められた (図 2)。このことは、ニコチンが歯周組織において豊富に存在する血管内皮細胞に作用することにより、歯槽骨吸収を促

進する RANKL の産生を促進させ、これとは逆に、骨吸収を抑制する OPG の産生を抑制する可能性が示さる。

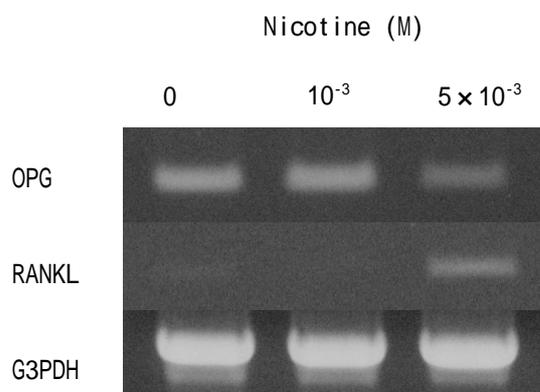


図 2 ニコチンは血管内皮細胞からの OPG m-RNA 発現を抑制し RANKL m-RNA の発現を誘導した。

### (3) ツボクラリンによる HUVEC に対するニコチンの作用の減弱効果

ニコチンが HUVEC に対し、OPG を抑制しそれとは逆に RANKL を促進することが示された。この効果が、ニコチンレセプターを介したシグナルによるものを確認するために、HUVEC にニコチンとニコチンのアンタゴニストであるツボクラリンを添加に同時した培養上清中の OPG 産生量を ELISA にて測定した。その結果、ツボクラリンは、ニコチンにより抑制された HUVEC からの OPG 産生を一部回復することが示された (表 1)。

表 1 ニコチンによる HUVEC における OPG 産生抑制に対するツボクラリンの効果

Nicotine	Tubocurarine	OPG production (pg/ml: mean ± SD)
(10 <sup>-3</sup> M)	(10 <sup>-4</sup> M)	
-	-	60 ± 2.2
+	-	22 ± 12.2
-	+	68 ± 16.8
+	+	46 ± 11.4

HUVEC はニコチン、ツボクラリン存在下または非存在下で 12 時間培養を行った。

このことは、ニコチンの HUVEC に及ぼす作用として、ニコチンレセプター以外の系の存在を示唆する。

### (4) ニコチンが HUVEC からの OPG 産生抑制に対する p38 MAPK 及び Protein kinase C (PKC) の関与

ニコチンが HUVEC からの OPG 産生を抑制する経路としてレセプターを介したものの以外の系が示唆されたことから、セカンドメッセンジャーである p38 及び PKC の関与について検索を行った。p38 阻害剤としては SB203580 を、PKC 阻害剤として H7 を用いた。その結果、SB203580 及び H7 では培養上清中の OPG 産生に有意な効果を見出すことはできなかった。

### (5) ニコチンによる HUVEC からのサイトカイン産生

ニコチンは HUVEC からの OPG 及び RANKL 産生を制御することが示されたが、他の osteotropic なサイトカイン産生に対しどのような影響を与えているかを検討した。その結果、ニコチンは、HUVEC の培養上清中への IL-1 の産生を抑制することが示された。IL-1 はいくつかの細胞からの OPG 産生を促

進することが示されている。今回の研究では、ニコチンのアンタゴニストであるツボクラリンが HUVEC におけるニコチンによる OPG 産生抑制を完全に解除できないことを示している。よって、ニコチンによる OPG 産生抑制機構にはオートクリンで作用する IL-1 の存在が示唆されるが、確証を得るには今後の検討が必要であると考え。。

以上の結果から、喫煙は歯周局所の血管内皮細胞から、骨吸収抑制因子である OPG の産生を抑制し、骨吸収促進に働く RANKL の産生を促進するというきわめて注目すべき害作用を持つことが示された。また、その作用発現機序にはオートクリンで産生された IL-1 の関与が示唆された。IL-1 は有力な骨吸収促進因子である。しかしながらニコチンは HUVEC からの IL-1 産生を抑制した。このことは、喫煙が歯槽骨吸収を抑制するとも見えるが、喫煙者の歯肉炎症が顕著とならないなど、炎症反応の抑制を反映していると考え。そしてさらに、ニコチンによる HUVEC からの IL-1 産生抑制は間接的に OPG の産生も抑制する。これらのことを併せ考えると喫煙は、単に歯周局所の細胞を障害したりするのではなく、歯周局所の防御機構、特にサイトカインネットワークを攪乱させる可能性を示すものとして興味ある知見と考える。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

佐藤直生、廣瀬公治、大植一樹、福井和徳、歯肉上皮細胞における抗菌タンパク質産生機構に関する研究、Orthod. Weves-Jpn.Ed., 査読有、Vol.72、No.1、17-24、2013

門倉弘志、山崎崇秀、和田康弘、菊井徹哉、西村 翼、廣瀬公治、横瀬敏志、塩化リチウムによる  $\beta$ -catenin のリン酸化阻害がラット象牙芽細胞分化と ectodin 発現に及ぼす影

響について、日歯保存誌、査読有、Vol.56、No.3、2013、231-238

黒田栄子、廣瀬公治、佐藤直生、福井和徳、培養環境 pH が及ぼす骨芽細胞のサイトカイン産生についての研究、奥羽大歯誌、査読有、Vol.39、No.4、2012、219-226

〔学会発表〕(計4件)

廣瀬公治、ニコチンは単球におけるカスパーゼ-1 の発現を増強する、第 62 回日本口腔衛生学会・総会、2013 年 5 月 17 日、松本市

廣瀬公治、ニコチンが誘導する歯肉上皮細胞からの炎症性サイトカインの誘導、第 61 回日本口腔衛生学会・総会、2012 年 5 月 27 日、横須賀市

廣瀬公治、ニコチンによるマクロファージの TLR-2 発現誘導について、第 60 回日本口腔衛生学会・総会、2011 年 10 月 9 日、松戸市

大橋明石、ニコチンと LPS は血管内皮細胞の TLR-2 の mRNA 発現を誘導する、第 60 回日本口腔衛生学会・総会、2011 年 10 月 9 日、松戸市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

廣瀬 公治(HIROSE Kimiharu)

奥羽大学・歯学部・歯学科・教授

研究者番号：10218836

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし