

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 13 日現在

機関番号：42697

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593116

研究課題名(和文)喫煙者の歯周治療介入効果の細胞レベルでの新たな解明；タバコ中カドミウムの阻害作用

研究課題名(英文)Newly approach of the interventional treatment for periodontitis in smokers;Suppressive effects by cadmium

研究代表者

佐藤 勉 (Sato, Tsutomu)

日本歯科大学東京短期大学・その他部局等・教授

研究者番号：60130671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯肉由来の上皮性細胞と線維芽細胞、およびヒト大腿骨由来の骨芽細胞と市販のヒト骨芽細胞キットを用いて、細胞のカドミウム(Cd)に対する様々な応答を検討した。細胞のCdに対する応答は細胞種で異なっており、Cd曝露で誘導されるサイトカインについても、その種類や濃度が異なることが明らかになった。以上の結果から、喫煙者の歯周組織はタバコ中Cdにより障害を受けていることが確実となった。さらに、Cdに曝露された骨芽細胞では、cyclooxygenase(COX)の産生が促進されることが示された。このことは、歯周治療効果は非喫煙者に比べ喫煙者で劣る傾向にあるという臨床報告に有用な知見を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the various responses to cadmium (Cd) exposure of cells using human gingival epithelial cells, human gingival fibroblasts, human femur osteoblasts, and a commercial human osteoblast kit. The response to cadmium was different depending on the type of cell, and there were also differences in the cell type and concentration of cytokines induced by cadmium exposure. Based on the above results, it is concluded that the periodontal tissue of smokers is damaged by Cd present in tobacco. Also, increased production of cyclooxygenase (COX) was observed in osteoblasts exposed to Cd. We believe the present results provide useful information that supports the findings of previous clinical reports of an inferior periodontal therapeutic effect in smokers compared to nonsmokers.

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：カドミウム タバコ 歯周組織 創傷治療 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は歯周病原性細菌による感染症であるが、その発症・進行には様々な生活習慣が関与している。なかでも喫煙は最も重要なリスクファクターの一つであることが、社会・臨床疫学研究から明らかにされてきている。一方、喫煙による歯周組織破壊の経路については、これまで主に歯周病原性細菌、宿主応答および微小循環に着目した研究が行われてきた。そして、それらに影響を及ぼすタバコ(煙)中の成分として、ニコチン、タールおよび一酸化炭素が注目され、様々な研究が行われてきた。タバコ中には数千種類の化学物質が含まれていることから(厚生労働省報告書)喫煙者の口腔組織はこれらの化学物質に曝露されていることになる。なかでも、有害重金属であるカドミウム(Cd)は最も高濃度に存在する化学物質であり、歯周組織に有害作用をもたらしている可能性が高い。しかし、歯周組織破壊因子としてCdを捉えた研究は国内外でみることが出来なかった。そこで、研究代表者は1990年以降、Cdの口腔組織に及ぼす影響を明らかにする目的で、一連の*in vitro*の実験を行ってきた。その結果、喫煙者の唾液中に含まれる濃度のCdが、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF細胞)の炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8)産生を誘導し、さらにその誘導がLPS共存下で増強することを明らかにした(口腔衛生会誌、54:528-538、2004)。この結果から、タバコ中に含まれるCdは歯周疾患のリスクファクターであると結論づけ、その機序の解明を進めてきた。そして、細胞のCdに対する感受性・応答(サイトカイン誘導、DNA合成、アポトーシス等)は、細胞種で異なることを見出したことから(日歯周誌、51:107、2009)、Cdは歯周組織破壊を

惹起するが、その破壊の機序や程度は歯周組織を構成する細胞種で異なると考えた。

最近の研究成果として、タバコ中に存在する濃度のCdが、HGF細胞とHGK細胞に対してアポトーシスを惹起することを見出した(科学研究費課題番号; 185922915002)。さらに、ヒト歯髓由来の幹細胞の分化にもCdは影響を及ぼしている可能性が高いことを明らかにしつつある(科学研究費課題番号; 20592473)。以上の結果は、喫煙者における歯周組織破壊のメカニズム解明に重要な知見となると共に、喫煙が歯周疾患のリスクファクターであることに確固たる根拠をもたらすものである。

一方、歯周治療の場では、喫煙者は非喫煙者に比べて治療効果が劣るとの報告もみられる。そこで本研究では喫煙者において治療効果が劣るメカニズムを細胞レベルで解明することとした。

2. 研究の目的

喫煙は歯周疾患の重要なリスクファクターである。喫煙者は非喫煙者に比べ、歯周疾患の治療効果が劣ることが知られており、前者では治療介入が行われているにも関わらず、歯槽骨吸収や歯周ポケット形成が進行することも多いといわれている。しかし、その科学的な解明は行われていない。研究代表者は、タバコ中に高濃度に含まれるCdは、歯周組織破壊に関与することを明らかにしている。そこで、本研究では、Cdによる骨吸収と歯周ポケット形成の促進について、*in vitro*の実験を行い、喫煙者で歯周治療効果が劣るメカニズムを細胞レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1)細胞のCd感受性の測定

実験に使用した細胞はヒト歯肉由来の上皮細胞と線維芽細胞、およびヒト大腿骨より分離した骨芽細胞と市販のヒト骨芽細胞である。細胞のCd感受性は、放射性前駆物質(^3H -チミジン)の細胞の酸不溶性分画への取り込みとMTT法に基づく生細胞数の算定から評価した。

2)サイトカインの測定

(1)PGE₂の測定

Cd曝露された細胞におけるPGE₂の誘導を検討した。PGE₂は、ELISA法による測定キットを用いた。

(2)IL-6の測定

Cd曝露された細胞におけるIL-6の誘導を検討した。測定にはELISAキットを用いた。

3)EGFの測定

Cd曝露された歯肉細胞からのEGF産生について検討した。EGFは、sandwich ELISA法にて測定した。

4)phospholipase A₂(PLA₂)の測定

PLA₂は、PGE₂などの炎症性メディエータの律速酵素として働くと同時に、その異常産生は炎症、癌およびアポトーシス等に関与していることが考えられている。すなわち、PLA₂は歯周組織の破壊に関与していることが考えられる。そこで、Cd曝露時の骨芽細胞のPLA₂を測定した。PLA₂は、蛍光法に基づく測定キットを用いて測定した。

5)cyclooxygenase (COX)

Cdに曝露されたヒト骨芽細胞におけるCOX産生を検討した。COXの測定は、COX 1とCOX 2が同時に測定できるキットを用いた。

6)receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)の測定

RANKLは、骨芽細胞分化因子の一つで、骨芽細胞による骨吸収の調節に深く関与している。そして、骨吸収を促進する因子はそのほとんどが骨芽細胞のRANKLの発言を誘導する。そこで、Cdによるヒト骨芽細胞におけるRANKLの産生を検討した。本研究では、培養液中に放出される可溶性RANKLを測定した。測定には高感度の測定が可能なELISAキットを用いた。

7)細胞の形態観察

歯肉ケラチノサイトの増殖は、歯周ポケット形成を検討する上で重要となる。そこで、CdあるいはEGFを添加した培養液中で培養した時の同細胞の形態変化を、顕微鏡および顕微鏡観察した。後者については、通法により観察用試料を作成し、透過型電子顕微鏡により形態観察を行った。

以上の実験から得られた結果を検討し、タバコ中に含まれるCdによる骨吸収と歯周ポケット形成促進のメカニズムについて解析した。歯槽骨吸収のメカニズムの解明はかなり進んでいるが、その過程は極めて複雑で、未だ不明の点も多い。また、歯周ポケット形成のメカニズムも複雑で、多くの因子が関わっている。本研究の結果から、喫煙者における歯周病治療効果の阻害要因として、タバコ中に高濃度に含まれるCdが重要であることの科学的エビデンスの確立を試みた。

4. 研究成果

1)細胞のCd感受性

ヒト歯肉由来の上皮細胞と線維芽細胞、およびヒト大腿骨より分離した骨芽細胞と市販のヒト骨芽細胞のCd感受性を、DNA合成(^3H -チミジンの細胞の酸不溶性分画への取り込み)とMTTアッセイから測定した。曝露するCd濃度は 10^{-11}mM ~ 10^{-9}mM とした。これら2つの測定系を用いた実験結果は同

様な傾向を示した。DNA 合成と細胞増殖を抑制する Cd 濃度は細胞種によって異なっていたが、その範囲はおよそ $10^{-5} \sim 10^{-6}$ mM であった。最も感受性が高かったのは骨芽細胞であり、次いで線維芽細胞、上皮細胞の順であった。我々はこれまでに今回使用した細胞の他にも様々な細胞について、Cd 感受性を測定している。それらの結果も併せて考えると、細胞の Cd 感受性は細胞種で異なることが明確となった。さらに、細胞の DNA 合成や増殖を阻害した Cd 濃度は、喫煙により口腔組織が曝露される可能性のある濃度であることから、喫煙者の口腔組織は Cd により少なからず障害を受けていることが推察された。このことはすでに明らかとなっているニコチンやタールといった化学物質に加え、重金属であるカドミウムも歯周疾患のリスク要因になりうる可能性を強く示唆している。

2) Cd に曝露された細胞におけるサイトカインの産生

我々はこれまでに Cd 曝露に曝露された歯肉由来の線維芽細胞は炎症性サイトカイン産生を誘導することを明らかにした。今回の実験においても、Cd 曝露された歯肉由来の上皮細胞と線維芽細胞において IL-6 と PGE₂ の誘導が確認された。このことは喫煙者では、タバコ中に含まれる Cd により歯周組織に炎症が引き起こされる可能性があることを示唆している。

3) Cd に曝露された細胞における EGF の産生

本実験では Cd 曝露された歯肉由来の上皮性細胞で EGF の誘導が観察された。EGF の誘導がみられた Cd 濃度は、細胞の DNA 合成や増殖が抑制され始める濃度より低かった。このことは喫煙者における歯周ポケット形成の機序を解明するに有用な知見を与えるものと考えられる。

4) Cd に曝露された細胞における phospholipase A₂(PLA₂)の誘導

本実験では使用したすべての細胞において、Cd により PLA₂ が誘導される可能性が示された。PLA₂ の機能は多岐にわたることから、今回得られた結果の意義については不明な点も多い。しかし、Cd による歯周組織破壊の機序を解明するに重要な知見と考える。

5) Cd に曝露された細胞における cyclooxygenase (COX) の誘導

Cd に曝露された骨芽細胞において、COX 2 の誘導が観察された。COX 1 については明らかな変化はみられなかった。この結果は、タバコ中に含まれる Cd による歯槽骨吸収の促進の可能性について示唆しており、喫煙者における歯周治療の遅延効果を説明するデータとなりうるものと考えられる。

6) Cd に曝露された細胞における receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) の誘導

RANKL は破骨細胞の分化を調節する因子として発見されたが、骨芽細胞においても重要な役割を担っていることが明らかにされている。本実験において、Cd 曝露された骨芽細胞では RANKL が誘導されることが示された。この結果は骨芽細胞と破骨細胞の相互反応に Cd が関与していることを示唆している。したがって、今後タバコ中に含まれる Cd による破骨細胞の分化の可能性を検討することは十分に意義あるものと考えられる。

7) Cd に曝露された細胞の形態観察

Cd による歯周組織の障害機序を検討する上で、細胞の形態観察は重要と思われる。実験に用いたすべての細胞で、高濃度 Cd 曝露による形態変化が観察された。SEM 観察では細胞表面の平滑化が認められたが、

細胞種による明らかな違いはみられなかった。細胞内小器官については小胞体の膨大化や脂肪滴の増加が認められた。これらの結果はCdによる細胞障害を示しているが、細胞機能との関連は明らかに出来なかった。今後、Cdに曝露された細胞について、その細胞内局在について分析電顕を用いて検討する予定である。

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1件)

佐藤 勉，歯周病の病因と疫学．臨床環境医学．査読有．21：172-176，2012．

[学会発表](計0件)

[図書](0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 勉 (Sato Tsutomu)

研究者番号：60130671

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし