

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659975  
 研究課題名（和文）受動喫煙が誘導する歯・歯周組織関連遺伝子のエピジェネティック制御機構  
 研究課題名（英文）Passive smoking-induced epigenetic regulation in tooth・periodontal tissue-associated genes.  
 研究代表者  
 北村 正博 （KITAMURA MASAHIRO）  
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
 研究者番号：10243247

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ヒト歯周病病変部と類似した病態を示すマウス実験的歯周病モデルを構築し、そのマウス実験的歯周病モデルを用いて、タバコ煙構成成分が歯周病病態に及ぼす影響を検討した。その結果、タバコ煙構成成分の腹腔投与によりマウスの歯槽骨吸収が亢進することが明らかとなった。これらの結果は、ヒト口腔疾患に対する喫煙の影響を検討する上で、有益な動物モデルを提供するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, we established the mouse model of experimental periodontitis similar to human periodontal lesion and investigated the effects of cigarette smoke constituents for pathogenesis of periodontal diseases using this model. In result, we found that intraperitoneally administration of nicotine or cigarette smoke condensate accelerated alveolar bone loss in mice compared with control group. These results indicate the useful animal model to examine the effects of smoking for oral diseases in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療学

キーワード：喫煙、歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

喫煙者の歯周病の疾患罹患リスクが非喫煙者と比較して高いことはすでに明らかである。このことから、能動喫煙より有害成分が過剰で胎児から成長期を含め長期間影響を受ける受動喫煙により、歯や歯周組織の分化発達不全やう蝕、歯周病罹患率などを上昇させるようなエピジェネティック制御が関与している可能性が考えられる。しかしながら受動喫煙によって歯周病の疾患罹患率が上昇するとの報告は少なく、受動喫煙が及ぼす歯周病罹患リスクに関する細胞生物学的検討は皆無に近い。そこで我々は、歯・歯周

組織形成や歯周炎罹患性に及ぼす受動喫煙の影響を、実験動物モデルを用いて検討することとした。

## 2. 研究の目的

実験動物レベルで、長期間の受動喫煙がもたらす歯・歯周組織の形態・機能異常の発現や歯周病の疾患感受性（エピジェネティック制御）への影響を明らかにすることを直接の目的とした。そして、本研究が禁煙・分煙活動の科学的根拠を提示し、ひいては喫煙によって発症・重症化する口腔領域疾患の罹患率を低下に寄与し、国民の QOL の向上に貢献することを将来的な目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) マウス実験的歯周病モデルの検討

##### ① *P. gingivalis* 感染モデル

マウス実験的歯周病モデルを作成するため、まずはじめに、マウス口腔内に歯周病原性細菌を感染させることによる歯周病モデルの構築を試みた。感染させる細菌としては歯周病原性細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) の各種菌株である ATCC33277、381、W50、2561、53977、W83 から、最も強力に宿主細胞内に侵入する線毛蛋白遺伝子をもつ W83 株を選択した。5-6 週齢の C57BL/6 マウスに一週間抗生物質含有飲料水を投与した後、三日間抗生物質非含有飲料水に置き換えた。その後、*Pg* 菌 W83 株を 3 日毎に 10 回感染させた。血清を採取した後、マウス歯槽骨の骨吸収と歯周組織の炎症性細胞浸潤の程度を、それぞれマイクロ CT、HE 染色にて解析した。採取した血清中のサイトカインの発現は ELISA 法にて検討した。

##### ② 歯牙結紮モデル

研究成果の欄にも記載するが、前述の *P. gingivalis* 感染モデルでは歯槽骨の骨吸収が誘導されたものの、ヒトにおける歯周病局所病変部に通常認められる歯周組織中の炎症性細胞浸潤を認めなかった。このためヒトの歯周病病変部により近い病態をマウス口腔内に再現しうるマウス歯周病モデルの作成を試みた。すなわち、5-6 週齢の C57BL/6 マウスの片顎上顎第二大臼歯を絹糸で結紮し、一週間後に、マウス歯槽骨の骨吸収と、歯周組織の炎症性細胞浸潤の程度をそれぞれマイクロ CT、HE 染色にて解析した。

#### 2) タバコ煙構成成分がマウス実験的歯周病モデルの病態に及ぼす影響の解析

実験的歯周病モデルを確立した後、タバコの煙構成成分が、歯周病の病態に及ぼす影響について解析した。すなわち、ニコチン、あるいはタバコ煙濃縮物 (cigarette smoke condensate: CSC) を三日連続でマウス腹腔に投与したのち、歯牙結紮を行った。結紮一週間後にマウス歯槽骨の骨吸収と、歯周組織の炎症性細胞浸潤の程度をそれぞれマイクロ CT、HE 染色にて解析した。

### 4. 研究成果および考察

#### 1) マウス実験的歯周病モデルの確立

研究開始当初に検討した *P. gingivalis* 感染モデルではマイクロ CT による歯槽骨骨吸収を認めた。また感染群では非感染群と比較して血清中の IL-6 の発現が亢進していた(データは示さない)。このことから *P. gingivalis* の口腔感染により全身的な炎症状態が誘導されていることが示唆された。しかしながら HE 染色による歯周組織における炎症性細胞浸潤像は観察できなかった。このため、炎症性細胞浸潤を伴う歯槽骨吸収を誘導するマウス歯周病モデルを再構築することとした(3. 研究の方法参照)。

新たに構築した歯牙結紮モデルでは対照側と比較して介入側で歯周組織における炎症性細胞浸潤を伴う歯槽骨の吸収を認めた。このことから、マウス臼歯結紮誘導性歯周組織破壊モデルを、マウス実験的歯周病モデルと位置づけて以後の研究を行った。

#### 2) タバコ煙構成成分がマウス実験的歯周病モデルの病態に及ぼす影響について

マウス腹腔内にタバコ煙構成成分(ニコチンあるいは CSC) または PBS をそれぞれ投与したのち、各マウスの片顎第二大臼歯を結紮して実験的歯周病を惹起させた。PBS 投与群における対照側(非結紮側: 図 1) と介入側(結紮側: 図 2) の CT 像を示す。絹糸結紮することにより歯槽骨吸収が認められた。一方、ニコチン、CSC 腹腔投与群では、対照側(非結紮側) では PBS 群に比べてわずかな歯槽骨吸収の増加が観察されただけであったが、介入側(結紮側) では PBS 群と比較して歯槽骨吸収の亢進が認められた(図 3、4、5)。

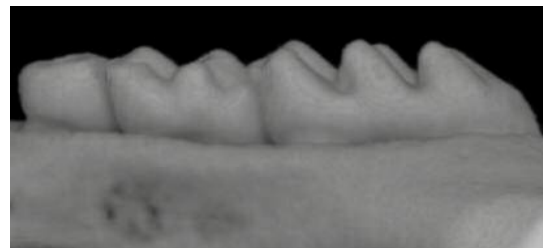


図 1 PBS-対照側

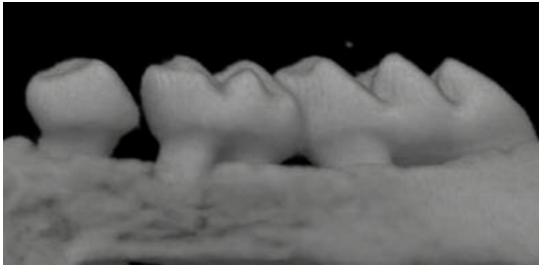


図 2 PBS-介入側

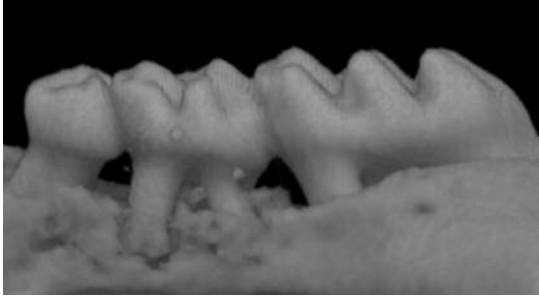


図 3 ニコチン-介入側

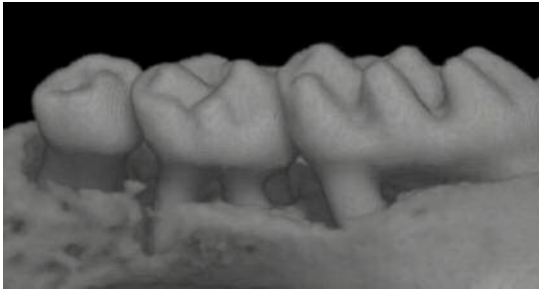


図 4 CSC-介入側

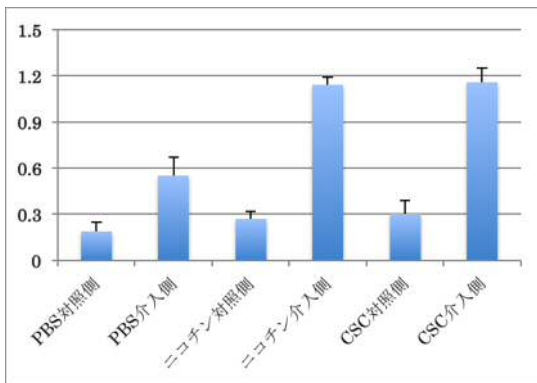


図 5 各群における骨吸収量 (単位は mm)

以上の結果より、マウス実験的歯周病モデルにおけるマウス臼歯結紮誘導性歯周組織破壊は、タバコ煙構成成分の存在で増強することが明らかとなった。今後はこの実験系を用いて、歯周病病変部の組織を採取し同組織中の様々な遺伝子発現を網羅的に検討し、エ

ピジエネティック制御に関する解析を継続していく予定である。

## 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 3 件)

1. Kojima Y, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Mini-review: Periodontal regeneration and FGF-2. *Inflammation and Regeneration* 2013, 33:72-77.
2. Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Ozasa M, Sawada K, Kubota M, Miki K, Kojima Y, Takedachi M, Kitamura M, Shimabukuro Y, Hashikawa T and Murakami S. Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *Journal of Periodontal Research* 2012. 47:563-571.
3. Yanagita M, Mori K, Kobayashi R, Kojima Y, Miki K, Kubota M, Yamada S, Kitamura M and Murakami S. Immunomodulation of Dendritic Cells Differentiated in the Presence of Nicotine with Lipopolysaccharide From *Porphyromonas gingivalis*. *European Journal of Oral Sciences* 2012. 120:408-414.

[学会発表] (計 1 件)

1. Ikegami K, Yamashita M, Nakamura T, Kawahara T, Yanagita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Effects of aging on ossification of periodontal ligament cells、第 60 回国際歯科研究学会日本部会学術大会、2012. 12. 14、新潟市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 正博 (KITAMURA MASAHIRO)  
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
 研究者番号：10243247

### (2) 研究分担者

柳田 学 (YANAGITA MANABU)  
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80379081

山下 元三(YAMASHITA MOTOZO)  
大阪大学・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：90524984