

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 10 日現在

機関番号：42697

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463177

研究課題名(和文) タバコに含まれるカドミウムによる歯槽骨吸収促進：破骨細胞の分化と骨吸収活性の解明

研究課題名(英文) Promotive activity to alveolar bone resorption by Cd in tobacco: Differentiation and bone resorption activity in osteoclasts

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(移行)

研究者番号：60130671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：タバコ中には極めて多くの有害物質が含まれている。イタイイタイ病の原因物質として知られているカドミウム(Cd)も、比較的高濃度に含まれている。歯周病は口腔に生息する歯周病細菌による感染症であるが、その発症や進行には様々な生活習慣が関係している。なかでも喫煙は最も重要な歯周病のリスク因子である。本研究は、タバコ中のCdに着目し、歯周病によって生じる歯槽骨吸収との関連について、検討した。具体的には、Cdを作用させたヒト由来の骨系細胞(骨芽細胞と破骨前駆細胞)の変化を観察した。その結果、Cdは細胞機能に影響を及ぼすことが示されたことから、喫煙者は歯周疾患に対して高リスクとなることが推測された。

研究成果の概要(英文)：Tobacco contains many harmful substances. Cadmium(Cd) which is known as the cause of Itai-itai disease is also present in comparatively high concentration. Periodontal disease is an infectious disease caused by periodontal bacteria living in the oral cavity, however, the onset and progression of the disease are deeply influenced by various habits and lifestyle choices, among which smoking is one of the most important risk factors. The objective of the present study was to examine the correlation Cd in tobacco and alveolar bone resorption occurred in periodontal disease using both human osteoblasts and pre-osteoclasts in vitro. As a result, Cd had effected on cellular functions. These results suggested that smoker was high risk person to periodontal disease.

研究分野：衛生学

キーワード：タバコ カドミウム 歯周病 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

タバコ中には極めて多くの有害物質が含まれており、その生体影響に関する研究が数多く行われている。歯科領域では、喫煙習慣は最も重要な歯周病のリスクファクターの一つであることが、臨床研究、基礎研究や疫学研究で明らかになってきた。これまでに国内外実施されてきた患者対照研究によると、歯周病に対する喫煙曝露のオッズ比は、ほとんどが2を超えており、高いものでは14を超えている。喫煙による歯周組織破壊の経路は、歯周病原性細菌や細菌に対する宿主応答に喫煙が何らかの影響を及ぼしているとの報告が多い。その他にも、歯肉微小循環への影響も注目されている。すなわち、喫煙による歯周組織破壊の経路は、微生物、宿主応答および微小循環に大別できる。そして、タバコ中の有害成分については、ニコチンに関する研究が数多く行われてきた。しかし、タバコ中には数千種類の化学物質が含まれており（厚生労働省報告）、それらの物質による生体影響については、十分に解明されていないものも多い。カドミウム（Cd）はイタイイタイ病の原因として、広く知られているが、その毒性作用に関する報告は多い。そして、Cdはタバコ中にも比較的高濃度に含まれている。しかし、タバコ中のCdと歯周病との関連については、ほとんど知られていない。そこで研究代表者は歯周病に対する喫煙のリスク因子として、Cdに着目し、一連の研究をスタートさせることになった。まず1990年以降、Cdの口腔組織に及ぼす影響を検討する目的で、口腔組織由来の各種細胞を用いた*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、ヒト歯肉由来の線維芽細胞（HGF細胞）の炎症性サイトカイン（IL-6、IL-8）産生を促進し、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となる可能性が大きいと結論づけ、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、アポトーシス誘導）は、同じヒト由来の細胞であっても、由来組織で異なることを見出した（日歯周誌、51:107、2009）。この結果から、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の種類で異なることと推察した。さらに、タバコ中に存在する濃度のCdは、HGF細胞とヒト歯肉由来の上皮細胞（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。続いて、ヒト歯髄由来の幹細胞を用いた実験では、Cdはその分化に影響を及ぼす可能性が高いことも見出した（科学研究費課題番号：20592423）。喫煙は歯周治療効果を阻害するという臨床報告があることから、HGF細胞とヒト大腿骨由来の骨芽細胞を用いた細胞レベルでの検討を行った（科学研究費課題番号：23593166）。その結果、これまでの結果と同様にCd曝露によって、IL-6とPGF2が誘導されることが確認された。HGF細胞ではEGF産生も確認された。骨芽細胞では、Cdによるphospholipase(PLA2)やcyclooxygenase(COX)の誘導が確認された。以上の結果は、喫煙者における歯周治療効果の良否に関する有用な所見を提供するものであった。

2. 研究の目的

喫煙習慣は歯周疾患の発症や進行に係る最も重要なリスクファクターの一つである。さらに、喫煙は歯周治療を阻害することも明らかになりつつある。喫煙による歯周組織破壊のメカニズム・経路については、タバコに含まれる有害物質を中心にこれまで多くの

研究が行われてきた。これまでに研究代表者は、タバコに高濃度に含まれるカドミウム (Cd) に着目し、口腔組織由来細胞を含む多種類の細胞を用いた検討を行ってきた。その結果、喫煙によって曝露される Cd により、これらの細胞はその機能や分化能に影響を受ける可能性があることが明らかになった。これらの成果は喫煙と歯周病発症との関連や喫煙者における低い歯周治療効果を解明する上で極めて有用な知見を与えるものである。また、Cd は硬組織との親和性は強いが、歯槽骨に及ぼす作用については、未だ十分に検討されていない。本研究の目的は骨系細胞に対するタバコ中の Cd の作用を *in vitro* にて解明することである。

3. 研究の方法

研究方法の概要は以下の通りである。DNA 合成や MTT アッセイを指標とした細胞機能性試験を実施し、各細胞における Cd 濃度とその影響との関連 (Cd 感受性) を明らかにする。Cd の細胞内局在の検討では、併せてメタロチオネイン (MT) の観察も行う。これらの電顕観察は、Cd の細胞レベルでの動態や作用を解明する上で多くの情報を提供する可能性が高い。なお、測定には分析電顕 (走査型と透過型) を用いる。以上の結果を基に、骨系細胞に及ぼすタバコに含まれる Cd の作用機序を解明するための基礎データを得ることとする。次いで、Cd の PGE₂ に及ぼす影響を、破骨細胞/破骨前駆細胞の機能との関連から検討する。破骨細胞/破骨前駆細胞の骨吸収と関連する酵素活性を測定する。なお、破骨細胞の骨吸収に及ぼす PGE₂ の作用については、相反する研究結果が示されており、現時点では一定の結論が得られていない。さらに、破骨細胞/破骨前駆細胞の機能や分化に及ぼすタバコの中に含まれる Cd の作用機序を検討

する目的で、分化過程におけるシクロオキシゲナーゼ (COX) と同酵素の挙動と関連する PGE₂ の誘導について観察する。

具体的な方法は以下の通りである。

(1) 骨芽細胞と破骨前駆細胞/破骨細胞の Cd 感受性の測定

骨芽細胞は、ヒト大腿骨より分離した細胞を用いる。破骨前駆細胞/破骨細胞は、市販の破骨前駆細胞を購入し、同細胞分化培地キットにて培養することにより得た。Cd 感受性は、細胞を喫煙者の唾液中に含まれる Cd 濃度を含む培養液中で培養し、この時の DNA 合成と生細胞数の測定結果から評価した。DNA 合成は、放射性前駆物質 (³H-チミジン) の細胞内の酸不溶性分画への取り込みから、生細胞数の算定は MTT 法により行った。

(2) Cd 曝露された細胞の超微形態観察と Cd・MT の細胞内局在の観察

MT は、Cd 等の重金属曝露によって誘導されるシスチンを多く含むタンパク質として発見されたが、近年、サイトカインによっても誘導されることが示された。MT の機能としては、重金属の解毒作用が広く知られているが、その一方、疾病や炎症との関連も示されている。また、過剰な MT は細胞に障害を与えるとの報告もみられる。したがって、Cd 曝露された破骨前駆細胞/破骨細胞における Cd と MT の局在を明確にすることは、細胞機能への影響を評価する上で重要となる。上記のごとく Cd 曝露させて破骨前駆細胞/破骨細胞について、通法に従い電顕観察用試料を作成し、超微構造の観察を行う。MT 局在の観察については、さらに MT 免疫染色を施す。免疫染色に用いる MT は市販抗体と北里大学医療衛生学部太田 久吉教授より分与された MT-1・MT-2 を使用した。観察には分析電顕を用いた。

(3) 破骨前駆細胞/破骨細胞の MT 誘導能の測

定

Cd に曝露させた細胞を測定試料とし、ELISA 法を測定原理とする市販の測定キットを用いて定量した。

(4)破骨前駆細胞/破骨細胞における COX と PGE₂の測定

破骨前駆細胞/破骨細胞の機能発現や分化過程で、Cd がどのような作用を及ぼしているかを明らかにする。具体的には、COX と PGE₂ を測定する。COX は、アラキドン酸をプロスタノイド (PGE₂ など) とよばれる生理活性物質の一群に代謝する過程に関与する酵素である。Cd は、マウス骨芽細胞の COX を誘導することが報告されており、Cd による骨吸収のメカニズム解明に重要な知見を与えている。また、破骨細胞では分化前期から細胞内に COX が認められ、成熟破骨細胞では COX-2 の発現が増加することが報告されている。そこで、タバコ中 Cd に曝露されたヒト破骨前駆細胞/破骨細胞の機能発現や分化過程を観察する目的で、COX と PGE₂ の測定を行う。COX については、COX 1 と COX 2 が同時に測定できるキット (フナコシ) を用いた。さらに、細胞から mRNA・タンパク質を調整し、COX 発現の経時的変化を転写レベル (RT-PCR 法)、翻訳レベル (Western Blot 法) で解析した。PGE₂ の測定には ELISA キット (R & D Systems) を使用した。

4. 研究成果

(1)骨芽細胞 (HOB 細胞) と破骨前駆細胞/破骨細胞 (HOC 細胞) の Cd 感受性の測定

Cd 曝露された細胞における MTT アッセイと DNA 合成の測定から、Cd 感受性を評価した。その結果、両細胞共に 10⁻⁵mM Cd 濃度以上で、生細胞数の減少と DNA 合成が抑制された。特に 10⁻³mM Cd 濃度以上の実験群で顕著であった。このことから、HOB 細胞と HOC 細胞の Cd

感受性には明らかに違いがないことが示唆された。

(2)Cd 曝露された細胞の超微構造の観察と Cd・MT の細胞内局在の観察

細胞増殖と DNA 合成阻害が観察された 10⁻⁵mM Cd 濃度群の細胞では、明らかな超微構造の変化は観察出来なかった。10⁻⁴mM 濃度以上の Cd に曝露された細胞では、明らかな細胞内小器官等に変化が認められた。10⁻²mM 以上の Cd 群では、細胞膜の損傷や核の逸脱が顕著であった。このような微細構造の変化は、HOB 細胞と HOC 細胞において観察された。図 1～図 3 に HOC 細胞の TEM 像を示した。Cd の細胞内局在については、明らかな観察結果が得られなかった。現在、引き続き観察を行っている。MT については、RER の周囲に多く染色像が認められたが、細胞による明らかな違いは認めることが出来なかった。

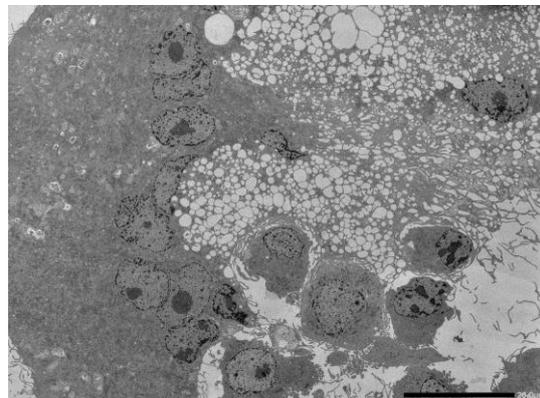


図 1-a HOC 細胞 (対照群)

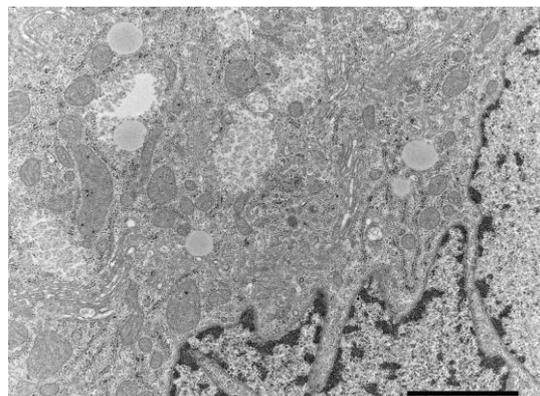


図 1-b HOC 細胞 (対照群)

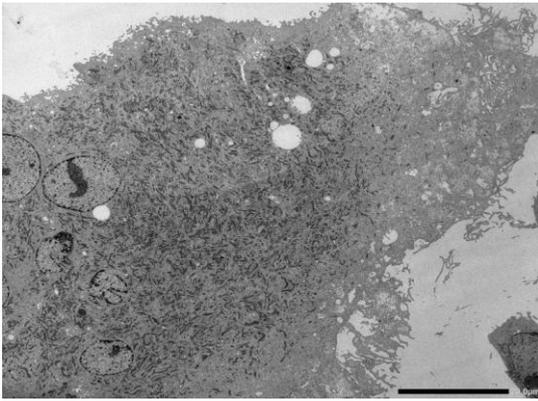


図 2-a HOC 細胞 (10⁻⁵mM Cd 群)

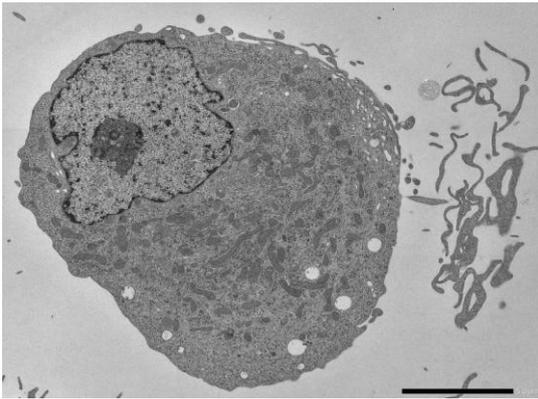


図 2-b HOC 細胞 (10⁻⁵mM Cd 群)

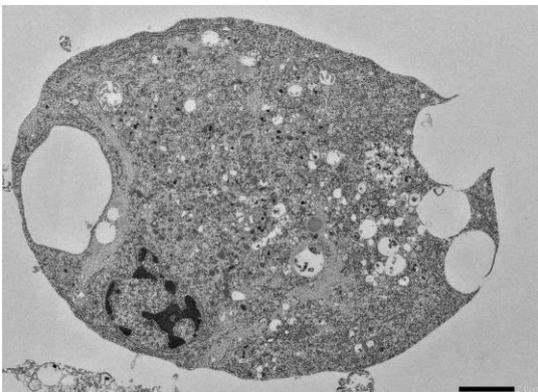


図 3-a HOC 細胞 (10⁻¹mM Cd 群)

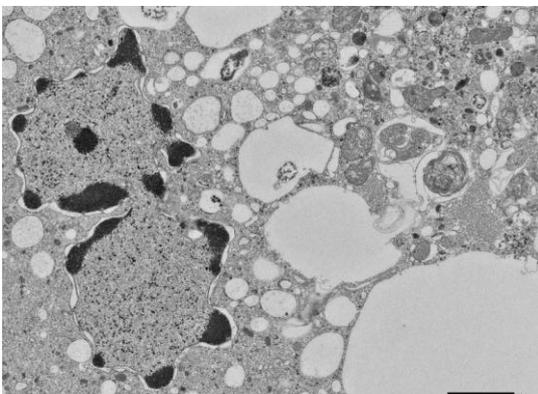


図 3-b HOC 細胞 (10⁻¹mM Cd 群)

(3)Cd による HOC 細胞の MT 産生

10⁻⁶~10⁻³mM Cd 濃度に曝露された HOC 細胞において、MT 産生が促進された。10⁻⁷mM Cd 以下と 10⁻²mM Cd 濃度以上の実験群では、MT の産生に変化はみられなかった。これらの結果は前述の MT の細胞局在の観察結果と矛盾しないであった。

(4)破骨前駆細胞/破骨細胞における COX と PGE₂ の測定

Cd 曝露された HOC 細胞における COX と PGE₂ については、一定の結論を得ることが出来なかった。現在、引き続き実験を行っており、明確な結果が得られ次第、報告する予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①佐藤 勉、櫻井四郎. 歯周疾患リスク因子としてのタバコ中カドミウムの細胞毒性に関する検討、第 86 回日本衛生学会、2016 年 5 月.

②SATO T. A study of the cytotoxicity of Cd in tobacco as a risk factor for periodontal disease. 94th IADR, July, 2017.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 勉 (SATO Tsutomu)

日本歯科大学東京短期大学・歯科衛生学
科・教授

研究者番号：60130671

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()