

令和元年6月10日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20681

研究課題名(和文)喫煙および禁煙がヒト歯周組織由来培養細胞に与える影響および効果について

研究課題名(英文)Effect of smoking and smoking cessation on human periodontal tissue cells

研究代表者

五十嵐 寛子(武内寛子)(Igarashi, Hiroko)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30713424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙による悪影響は多くの報告があるが、禁煙による効果についてはいまだに不明な点が多く存在している。そこで申請者はヒト歯周組織より樹立したヒト歯肉線維芽細胞、ヒト歯根膜由来線維芽細胞、ヒト歯肉上皮およびヒト歯根膜由来血管内皮細胞を用いてnicotineによる喫煙の影響を再度確認した後に、それらの細胞における禁煙中の回復効果に焦点を当て検討を行った。この研究の目的は、禁煙した後に時間の経過の中でどのような効果もたらされるか観察することである。

申請者の研究結果は、喫煙による細胞へのダメージが示された。しかしながら、喫煙によるダメージが細胞内に蓄積しているものの、禁煙による回復効果が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喫煙の為害作用について示し、喫煙刺激を除去した後の各種細胞変化について検討することで喫煙の影響および禁煙の効果について患者の理解を向上させると考える。患者への教育において歯科医から喫煙による口腔内への影響を教育説明するとともに、喫煙した後にどのような改善が認められるかを掲示することにより、患者によりよく理解してもらう義務がある。また、若年層への喫煙による影響を示す教育としても喫煙および禁煙後の一連の変化を示すことで、さらなる防止策の一環になると考えている。そこで、喫煙により傷害された細胞が禁煙により回復傾向を示すという喫煙から禁煙に関する一連の報告を行うことは、社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Adverse effect of smoking has been widely reported. However effect of smoking cessation has not entirely clear. Then, we try to confirm adverse effects of smoking on human periodontal tissue using nicotine again. Next, we focused on human gingival fibroblasts, periodontal ligament cells, epithelial cells and periodontal ligament endothelial cell's changes in repair period during smoking cessation. The purpose of this study was to investigate the effect of smoking cessation on human gingival fibroblasts, periodontal ligament cells, epithelial cells and periodontal ligament endothelial cell by time-dependently.

Our study demonstrated the cell damaging effects of smoking. On the other hand, actually damage of smoking was still remained in cells, we also indicated ability of the cell repairing effect of smoking cessation.

研究分野：歯周病学

キーワード：喫煙 禁煙効果 歯肉上皮細胞 歯根膜血管内皮細胞 ニコチン 空胞変性 Tubeformation

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喫煙は歯周病の最大の環境因子リスクファクターといわれる。しかしこの分野は、幅広く研究されているにも関わらず、多岐にわたるその影響についてのメカニズムの多くが、未だに解明されていない。実際、上記に述べた喫煙者の臨床的所見の一つである歯肉の肥厚に関し、数々の著書などに記載されているものの、有力な研究論文がないことから、申請者は線維化との関係で研究が行われている比較的新しい成長因子であり、当時歯学の分野に焦点を当てた研究が少なかった結合組織増殖因子(Connective Tissue Growth Factor: CCN2/CTGF)に着目し、タバコの有害成分である nicotine に暴露された歯周組織モデルとして、ヒト歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞を樹立し *In vitro* 喫煙と歯周組織の線維化について研究を行った。

申請者は歯周組織において CCN2/CTGF は細胞外マトリックス(ECM)との関係の深い TGF- β 1 の下流に位置することを示した(Takeuchi H. *et. al.*, *J Periodontal Res.* 2009, 4:161-169.)。次に、喫煙と歯周組織の線維化について：線維化の実態である Type I collagen と CCN2/CTGF の関係を中心に nicotine を作用させ、nicotine 刺激により誘導された CCN2/CTGF により Type I collagen が増加するのかを検討したところ、CCN2/CTGF 中和抗体使用群において Type I collagen の有意な抑制が認められた。この結果は nicotine 刺激により増加した CCN2/CTGF により Type I collagen の発現が誘導され線維化へ向かうことを示した(Takeuchi H *et.al.*, *J Dental Res.*2010, 89:34-39.)。さらに Type I collagen の恒常性の調節因子である MMP-1、TIMP-1 また ECM とかわりの深い TGF- β 1 との関係の検討を行った結果、申請者は nicotine 刺激により MMP-1 は有意な抑制が認められた一方、TIMP-1 は有意な発現の亢進が認められ、さらに、CCN2/CTGF の上流に位置する TGF- β 1 の有意な増加を示し、恒常性の機能の破たんが生じることを示した(Igarashi-Takeuchi H *et.al.*, *Odontology*, 2016: 104:35-43.)。

このように、申請者は nicotine による細胞への与えるダメージについて研究を行ってきたが、nicotine を作用させることにより生じる影響を研究を継続する過程において、申請者はこれらの刺激を中断した「禁煙」によって細胞がどのように変化していくのか検索を行う必要性を感じた。

2. 研究の目的

直接 nicotine の曝露に直面する上皮細胞への影響、さらに毛細血管への影響を検討し、喫煙の影響についてさらに研究を進展させる。そして、喫煙刺激を除去した後の歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、上皮細胞および血管内皮細胞変化について検討し研究結果を示すことで喫煙の影響および禁煙の効果について患者の理解を向上させる目的で行う。

患者への教育において歯科医から喫煙による口腔内への影響を教育説明するとともに、喫煙した後にどのような改善が認められるかを掲示することにより、患者によりよく理解してもらう義務があると考え。また、若年層への喫煙による影響を示す教育としても喫煙および禁煙後の一連の変化を示すことで、さらなる防止策の一環になると考えている。そこで、喫煙により傷害された細胞が禁煙によりどのような変化を示すのか、CCN2/CTGF をはじめとしたタンパク質の発現を検索し、申請者の過去の研究と比較することで喫煙から禁煙に関しての一連の報告を行う。

細胞内の nicotine の局在等、喫煙の影響についてさらに研究を進展させるとともに、喫煙という刺激を除去した後の細胞変化について歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞に加え上皮細胞、歯根膜由来血管内皮細胞について網羅的に検討を行う。

3. 研究の方法

各種細胞の樹立

矯正抜歯を希望する患者のなかで研究に同意を得られた患者より提供された抜去歯より、以下の細胞を樹立する。なお、研究の主旨を十分説明し、同意が得られた後に行い、日本歯科大

学生命歯学部倫理委員会の承認(平成 24 年度承認済み)のもとに行うものとする。

樹立予定細胞：歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞、歯根膜由来血管内皮細胞

(1) 喫煙について：各種細胞への nicotine の刺激による影響

各種細胞を通常培地にて培養後、Nicotine 含有培地に交換し培養を行う(Nicotine 刺激による喫煙モデルとする)。これらを経時的に観察を行う。

- ・ Control (健常群)：Nicotine による刺激を行わない。
- ・ Nicotine 作用群 (喫煙群)：Nicotine 含有培地により培養を行う。

上記について、細胞の形態変化、各種タンパク質の観察、アイソトープを用いた nicotine の取り込み・細胞内動態についての検索を行う。

(2) 禁煙について：Nicotine による刺激中断によってもたらされる各種細胞変化の観察

禁煙の効果 研究方法

- ・ Control (健常群)：Nicotine による刺激を行わない。
- ・ Nicotine 作用群 (喫煙群)：Nicotine による刺激後も Nicotine 含有培地により培養を継続。
- ・ Nicotine 交換群 (禁煙群)：Nicotine による刺激後、Nicotine を含有しない培地により培養を継続。

また、培地交換時を 0 時間とし、培地交換後経時的に観察を行う。

上記について、細胞の形態変化、各種タンパク質の観察、アイソトープを用いた nicotine の取り込み・細胞内動態についての検索を行う。

申請者は Nicotine に暴露した細胞の細胞質内に空胞変性が認められたことを発表している (Takeuchi H. et al. J Periodontol Res. 2009, 4:161-169)ことからこれらの空胞が経時的にどのように変化するか注目して観察する。

(3) ヒト血管内皮細胞の三次元培養による tubeformation に対する喫煙・禁煙の影響についての観察

Tube formation の禁煙・喫煙の影響 研究方法

ヒト血管内皮細胞用いて三次元培養を行い、tube formation を形成確認後、nicotine 刺激を行う。

- ・ 血管内皮細胞の三次元培養に対する nicotine 刺激の影響について網羅的に検索
- ・ 血管内皮細胞の三次元培養に対する nicotine 刺激除去後の変化について網羅的に検索

申請者は「ヒト歯根膜由来血管内皮細胞に対する CCN2/CTGF の血管形成に関する研究」(2013 年秋季保存学会にて優秀ポスター賞受賞)を継続中であり、三次元培養の手技を確立している。

4. 研究成果

(1) 喫煙について：各種細胞への nicotine の刺激による影響

喫煙群として、各種細胞を nicotine 1 μ g/ml 含有培地にて培養を行ったところ、時間依存的に有意な細胞数の減少が認められた。また、細胞遊走能の観察において nicotine 非添加である健常群には数時間で細胞の遊走が認められたのに対し、喫煙群では有意な遊走能の低下が認められた。

形態学的観察では、位相差顕微鏡下において喫煙群の nicotine 刺激開始数時間より空胞様構造物が認められた。大きさおよび数は時間依存的に増加し、刺激を継続すると死滅した。TEM による観察においても、空胞用構造物が細胞質に充実性に認められた。SEM による細胞表面

の観察では、空胞用構造物は細胞膜の連続性が失われた穴状構造物、円形陥没および隆起が認められた。血管内皮細胞で特に nicotine 刺激 48 時間後の細胞委縮が顕著であった。

アイソトープを用いた nicotine 動態の検索においても、空胞内に nicotine が取り込まれたことが示された。炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6、IL-8 および TNF- α も喫煙群にのみ有意な増加が認められ、炎症性反応が生じていることが示唆された。これらの反応はすべての細胞において同様に観察された。

(2) 禁煙について：Nicotine の刺激中断によってもたらされる各種細胞変化の観察

各種細胞を nicotine 1 μ g/ml 含有培地にて培養を行い、洗浄後、nicotine 非添加の培地に交換して培養を行った群を禁煙群として検討を行った。

その結果、nicotine 刺激 24 時間後に空胞変性が認められたが、禁煙群では時間依存的に空胞用構造物が減少した。細胞遊走は禁煙群において遊走能の回復が認められたものの、健常群まで回復できなかったことから、喫煙によるダメージが生じていることが考えられた。

形態学的観察では、位相差顕微鏡下において禁煙群で空胞用構造物の減少が認められた。TEM および SEM による観察においても同様な結果であった。

アイソトープを用いた nicotine 動態の検索において、禁煙群では空胞内に取り込まれた nicotine が時間依存的に排出されたことが示唆された。炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6、IL-8 および TNF- α も喫煙群では有意な増加が認められたが、禁煙群においても炎症正反応が継続していることが示唆された。これらの反応はすべての細胞において同様に観察された。

(3) ヒト血管内皮細胞の三次元培養による tubeformation に対する喫煙・禁煙の影響についての観察

樹立したヒト歯根膜血管内皮細胞を用いて、喫煙によるダメージとその後の禁煙の効果について検討を行った。

寒天培地にて三次元培養を行い、血管形成が生じていることエポキシ樹脂包埋し光学顕微鏡および電子顕微鏡にて確認した。その後、nicotine 1 μ g/ml 含有培地にて培養を行ったところ、時間依存的に網目状構造物が細くなり、死滅した細胞が多く認められた。

(Tube formation の禁煙・喫煙の影響 研究について、2018 年日本禁煙学会にて繁田正子賞最優秀賞を受賞した。)

5 . 主な発表論文等

現在執筆中

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：立花 利公

ローマ字氏名：(TACHIBANA, Toshiaki)

研究協力者氏名：沼部 幸博

ローマ字氏名：(NUMABE, Yukihiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。