

機関番号：42697

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592473

研究課題名 (和文) タバコ中カドミウムの歯周組織分化への影響；歯周組織破壊機構の解明

研究課題名 (英文) Effects of cadmium in tobacco on the differentiation of periodontal tissues；Analysis on the destruction mechanism of periodontal tissues

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

研究成果の概要 (和文)：タバコ中に高濃度に含まれるカドミウム (Cd) の歯周組織破壊機構を解明する目的で、歯髄由来の幹細胞を含む数種類の細胞を用いて、実験を行った。歯髄由来細胞 (DPS 細胞) は抜歯埋伏歯より分離することが出来た。PS 細胞、マウス胎生幹細胞 (MES 細胞)、成人歯肉由来のケラチノサイト (HGK 細胞) と線維芽細胞 (FGF 細胞) に対する Cd 感受性を DNA 合成測定と MTT アッセイ法で測定した結果、細胞種によって異なっていた。Cd 曝露された PS 細胞では、約 50% がネクロシスを起こしていたが、アポトーシス細胞も認められた。さらに Cd 濃度を変え、PS 細胞における細胞死の形態を観察した結果、 $10^{-3}$  mM Cd 濃度で培養された DPS 細胞では、約 40-50% の細胞にアポトーシスが観察された。この Cd によるアポトーシス発現に関与するカスパーゼカスケードは、ミトコンドリアからの経路と細胞膜受容体からの経路が存在することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：To clarify the mechanism of Cd to destroy periodontal tissues, several kind of cells including the stem cells derived from dental pulp were studied. The sensitivity of these cells, i. e. stem cells from human dental pulp, mouse embryonic stem cells, human gingival keratinocytes and fibroblasts, to Cd were different among cells by DNA synthesis and MTT assay. Cd at concentration of  $10^{-3}$  mM induced apoptosis in DPS cells. The rate of apoptosis cells were 40-50 %. It was also suggested that Cd triggered the mitochondorial pathway and the cell membrane receptors causing apoptosis in DPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：タバコ、カドミウム、歯周組織、細胞分化、シグナル伝達、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

喫煙習慣は歯周疾患の重要なリスク因子として注目されている。しかし、両者の関連

については科学的実験データに乏しいのが現状である。研究代表者らは、これまでにタバコ中に含まれるカドミウム (Cd) は歯周組

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ことを明らかにした。さらに、Cdによる炎症性サイトカイン誘導やアポトーシス惹起の機構を明らかにすることで、その病態解明につながると考えた。

## 2. 研究の目的

従来、一般的な歯周炎について、炎症性サイトカインに関する研究は数多く行われているが、細胞分化に着目したものはみることが出来ない。また、Cd感受性は細胞種で異なることから、その影響を幹細胞分化との関連から検討することは、歯周病態研究に新たな分野を開拓する。そこで、本研究は智歯抜去時に得られる歯髄から分離した幹細胞と市販マウス幹細胞を用いて、幹細胞に及ぼすCdの影響をおもにアポトーシスの面から検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 幹細胞の培養と分離

#### ① 歯髄の採取と培養

抜去埋伏智歯を破碎し、歯髄を採取する。採取した歯髄を可久的に細切後、これを0.05%トリプシン+0.05%EDTA溶液中に入れ、37°C下で約1時間スターラーにて攪拌処理する。処理液をフィルターに通した後、0.05%EDTAおよび20%FCS含有DMEM/F12培地中に入れ、プラスチックディッシュ中(35mm径)で72時間~96時間培養した。細胞が容器底面をほぼ被うまで増殖した段階で前述のトリプシン溶液を用いてシングル細胞にし、継代を行った。継代後の培養液には10%FCS含有DMEM/F12培地を用いた。なお、実験には数回継代したものを使用した。

#### ② 幹細胞の分離と確認

幹細胞の分離は、磁気標識した各種マイクロビーズ抗体を用いた方法で行った。本研究では、CD271あるいはCD44抗体を細胞に接触させ、セパレーターにて分離した。分離した細胞の確認は、CD44-FITC染色あるいはCD271-FITC染色+PI標識後に、フローサイトメーターにて行った。

### (2) マウス胚性幹細胞を用いたCd曝露実験

#### ① マウス胚性幹細胞の細胞機能実験

種々の濃度のCdを添加した培養液中で細胞を培養し、この時の細胞機能に及ぼすCdの影響を測定した(<sup>3</sup>H-thymidineの酸不溶性分画への取り込みからみたDNA合成、MTTアッセイ)。

#### ② アポトーシスとネクローシスの測定

早期アポトーシス、後期アポトーシス+ネクローシスは、Guava PCA Nexin kit<sup>TM</sup>(GE Healthcare Bioscience Co.)によるAnnexin V/7-amino-actinomycin D' 7-AAD)染色を行い、Gava EasyCyte<sup>TM</sup>にてフローサイトメト

リーにて同定した。さらに、細胞質中のhistone-complexed DNA fragmentsをCell Death Detection ELISA kit<sup>TM</sup>(Roche Diagnostics)で測定し、フローサイトメトリーの結果と併せアポトーシスを評価した。ネクローシスについては、細胞質から逸脱するLDHをCytotoxicity Detection kit<sup>TM</sup>(Roche Diagnostics, USA)にて測定した。生死細胞の比率は、トリパンブルー染色法により行った。

(3) Cdによる歯髄由来幹細胞のアポトーシス  
① 幹細胞をCd添加培養液中で培養し、アポトーシス・ネクローシスを惹起させ、Cd濃度との関連を明らかにした。

② アポトーシス、ネクローシスの測定：前述の方法にて測定を行った。

#### (4) 歯髄由来幹細胞でのシグナル伝達機構

Caspase活性をCaspase 3 Detection Kit<sup>TM</sup>, Caspase-9 Colorimetric Assay

Kit-100 Assays<sup>TM</sup>, Caspase-8 Assay Kit-100

Assays<sup>TM</sup> (コスモバイオ、東京)にて測定した。

Cytochrome C ELISA (コスモ・バイオ、東京)により、ミトコンドリアからの逸脱チ

トクロームCの定量を行った。ミトコンドリアでのROSの過剰な産生はMitoSOX<sup>TM</sup> Red

Mitochondrial Superoxide Indicator

(Invitrogen, USA)とGava EasyCyte<sup>TM</sup>(GE, USA)にてROS陽性細胞数測定で定量した。

カスパーゼ3、4、6、8、9、10の膜透過性イン

ヒビター(コスモ・バイオ)各々の曝露下で、Cdによるアポトーシスが阻害されるか否か

Cell Death Detection ELISA kit<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics)にて観察した。一方、MEK

cascade、JNK、c-junの発現をWestern blot

にて、p53とp21 WAF1をELISA(共にコスモ・

バイオ、Bocompare)で検出した。以上の結果を総合して、「Cdによる歯髄由来幹細胞の

アポトーシス発生機序」でのシグナル伝達系

を明らかにした。

(5) 単細胞電気泳動法(コメット分析)

Cd曝露によるクロマチン・DNAの損傷の確認のため、単細胞電気泳動法(コメット分析)

により個々の細胞レベルでDNA損傷を確認した。本研究ではVisComet画像分析ソフト(NIH,

USA)を用いコメットや尾の全長、尾のDNA

量・総DNAの比率などを算出し、DNA損傷の

程度を検証した。

(6) 歯髄由来幹細胞からのケラチノサイトと線維芽細胞への分化

分離した幹細胞をケラチノサイト用培地あるいは通常の10%FCS含有DMEM中で培養することにより、両細胞を得た。

(7) 分化過程の細胞と分化後細胞におけるCd

によるアポトーシスの惹起

分離したケラチノサイトと線維芽細胞を

継代させ、継代数とCdによるアポトーシス

惹起との関係を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯髄由来幹細胞の分離と培養

抜去された埋伏智歯より歯髄を採取し、酵素処理法 (0.05%トリプシン+0.05%EDTA 溶液) にて幹細胞の分離を試みた。その結果、5 試料中 2 試料より幹細胞を分離することが出来た。なお、幹細胞の同定は、CD44-FITC 染色あるいは CD271-FITC 染色+PI 標識法にて行った。さらに、分離した幹細胞について継代操作を 2 回行い、目的の諸実験に供することが出来た。

##### (2) マウス胚性幹細胞を用いた Cd 曝露実験

市販のマウス胚性幹細胞を用いて実験を行い、以下の結果が得られた。

###### ①細胞機能実験

種々の濃度の Cd を添加した培養液中で細胞を培養し、この時の細胞機能の変化を <sup>3</sup>H-thymidine の酸不溶性分画への取り込みからみた DNA 合成と MTT アッセイから測定した。Cd 濃度が 10<sup>-5</sup>mM 前後でこれらの細胞機能が低下することが確認された (表 1)。

表 1 各種細胞の Cd 感受性

細胞	DNA 合成を抑制する 最少 Cd 濃度 (mM)
DPS 細胞	10 <sup>-4</sup>
MES 細胞	10 <sup>-6</sup>
HGK 細胞	10 <sup>-5</sup>
FGF 細胞	10 <sup>-6</sup>

###### ②細胞死の観察 (HGK 細胞と FGF 細胞)

Cd 曝露による細胞死を検討する目的で、早期アポトーシス、後期アポトーシス+ネクローシスおよびネクローシスを測定した。Cd 曝露 24 時間後の細胞において、アポトーシスの惹起が観察されたが、その割合は Cd 濃度と細胞種間で異なっていた (表 2)。

表 2 Cd 曝露 24 時間後のアポトーシス細胞

細胞	Cd 濃度	アポトーシス細胞 (%)
HGK 細胞	10 <sup>-4</sup>	20.3
	10 <sup>-5</sup>	10.6
	10 <sup>-6</sup>	2.7
	10 <sup>-7</sup>	0
FGF 細胞	10 <sup>-4</sup>	30.2
	10 <sup>-5</sup>	29.5
	10 <sup>-6</sup>	26.2
	10 <sup>-7</sup>	2.4

##### (3) 歯髄由来幹細胞の Cd によるアポトーシス細胞の観察

抜去された埋伏智歯より分離した幹細胞を種々の濃度の Cd 添加培養液中で培養し、細胞死の形態を観察した。幹細胞は 5 試料中、2 つの試料から分離することができた。細胞死については、Cd 濃度の高低に関わらず、Cd 曝露細胞に生じた細胞死の半数強はネクローシスと考えられた。しかし、アポトーシスを引き起こしていると推測される細胞も観察された。

##### (4) 歯髄由来幹細胞におけるシグナル伝達機構の解明

Cd によるアポトーシス発生機序を解明する目的で、シグナル伝達系の検討を行った。Caspase 活性については、各測定キットを用い、3、4、6、8、9、10 を測定している。また、それぞれの膜透過性インヒビターを用いて Cd によるアポトーシスの阻害を検討している。以上の測定は現在も継続中であるが、近日中に解析が終了する予定である。

##### (5) 単細胞電気泳動法 (コメット分析) によるクロマチン・DNA 損傷の検討

Cd 曝露によるクロマチン・DNA の損傷をコメット分析法で観察した。最終的な結論は得られていないが、Cd による DNA 損傷を示唆する結果が得られている。

##### (6) 歯髄由来幹細胞の Cd によるアポトーシス発生機序

10<sup>-3</sup>mM Cd 濃度以上の培養液中で培養された歯髄由来幹細胞において、濃度依存的な細胞死が観察された。それら細胞のうち、40-50% にアポトーシスの発現が確認された。さらに、アポトーシス発生機序を解明する目的で、シグナル伝達機構について観察を行った。その結果、Cd によるアポトーシス発生に関与するカスパーゼカスケードはミトコンドリアからの経路と細胞膜受容体からの経路が存在することが示唆された。

##### (7) 歯髄由来幹細胞からのケラチノサイトと線維芽細胞への分化

分離した幹細胞について各種培養液等を用いて継代培養を行った。その結果、形態学的にケラチノサイト様細胞と線維芽様細胞が得られた。

以上の研究成果を総括すると、タバコ中に高濃度に含まれる Cd は歯周組織を構成するケラチノサイトや線維芽細胞に障害を与えることが明らかになった。また、歯髄由来の幹細胞に対しても同様の作用をもたらすことから、Cd は口腔組織の発生過程の初期段階よりリスク要因となることが推察された。これらの結果は、喫煙が歯周疾患の発症や進行に極めて強く関わっていることの科学的根拠となるものと考えられる。

## 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4件)

- ①Bogdon Calenic, Ken Yaegaki, Takatoshi Murata, Toshio Imai, Izumi Aoyama, Tsutomu Sato: Oral malodorous compound triggers mitochondrial-dependent apoptosis and causes genomic DNA damage in human gingival epithelial cells. 査読有、J Periodont Res 2010; 45: 31-37.
- ②Maiko Fujimura, Bogdan Calenic, Ken Yaegaki, Takatoshi Murata, Hisataka Ii, Toshio Imai, Tsutomu Sato, Aoyama Izumi: Oral malodorous compound activates mitochondrial pathway inducing apoptosis in human gingival fibroblasts, Clinical Oral Investigations、査読有、(Epub、  
<http://www.springerlink.com/content/h64085462u418279/>)、2009.
- ③Bogdan Calenic, Ken Yaegaki, Murata Takatoshi, Toshio Imai, Izumi Aoyama, Tsutomu Sato, Hisataka Ii : Oral malodorous compound triggers mitochondrial-dependent apoptosis and causes genomic DNA damage in human gingival epithelial cells. 査読有、J Periodont Res. (Epub、  
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/122505741/abstract>)、2009.
- ④Toshio Imai, Hisataka Ii, Ken Yaegaki, Takatoshi Murata T, Tsutomu Sato, Takeshi Kamoda : Oral malodorous compound inhibits osteoblast proliferation、査読有、J. Periodontol、2009、80:2028-2034.

[学会発表] (計3件)

- ①佐藤 勉、イシュキティエフ ニコライ、カレニック ボクダン、八重垣健：タバコ中カドミウムによる歯肉細胞のサイトカインとアポトーシスの誘導、第52回春季日本歯周病学会学術大会(2009年)
- ②佐藤 勉、イシュキティエフ ニコライ、カレニック ボクダン、田中とも子、村田貴俊、八重垣健：タバコ中カドミウムによる歯肉細胞障害機構-サイトカインとアポトーシスの誘導-、第58回日本口腔衛生学会総会・大会(2009年)
- ③Toshio IMAI, Hisataka Ii, Takeshi KAMODA, Takatoshi MURATA, Tomoko TANAKA, Tsutomu SATO, Ken YAEGAKI : Effect of hydrogen sulfide on differentiation of osteoblast cell. IADR on 2009.

## 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

田中とも子 (TANAKA TOMOKO)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：70307958

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：