

ヒト歯根膜線維芽細胞におけるニコチン刺激による Cytokine の発現

Expression of Cytokine in the HPLF with Nicotine

鈴木幸江・金子(山口)和美・川瀬俊夫*・塗々木和男**・西口栄子

Yukie Suzuki, Kazumi Kaneko (Yamaguchi), Toshio Kawase*, Kazuo Todoki**, Eiko Nishiguchi

(湘南短期大学 歯科衛生学科)

* (神奈川歯科大学 基礎科学系自然科学講座歯科生体工学分野)

** (神奈川歯科大学 生体管理・医薬学系生体管理医学講座薬理学分野)

緒言

歯周疾患は、歯肉縁下プラーク中の歯周病細菌の感染によって発症・進行する細菌感染性疾患である。細菌が産生するプロテアーゼや毒素による直接的な為害作用と細菌抗原や産生物質の間接的な作用により誘導される生体の一連の炎症反応である。一部の細菌は組織中の好中球やマクロファージ・線維芽細胞などに作用して、活性酸素や炎症性サイトカイン・プロスタグランジン、さらに歯肉の中のマトリックスメタロプロテアーゼを産生、誘導し、結合組織や歯槽骨の破壊を引き起こす¹⁾。

喫煙による歯周組織破壊のメカニズムの方向性としては、微生物、宿主応答、微小循環の3つの面から検討されている。喫煙による歯周組織破壊の経路としては、全身への影響を介して、歯周組織に及ぶ間接的影響と歯周組織局所への直接的影響が考えられる。

間接的影響面からの基礎的研究としては、好中球への影響、免疫グロブリンへの影響、cytokine への影響などの面から多くの研究者によって観察されている。好中球への影響では、Sasagawa らは^{2,3)}、nicotine などのタバコの成分を好中球に作用させ、その後の好中球の機能変化を報告している。好中球は、歯周組織内に侵入してきた微生物などの細胞膜蛋白を含む外来物質に応答し、遊走、貪食、殺菌、消化などの

一連の生体から異物を排除するがニコチンによってその機能が低下すると報告している。また、免疫グロブリンへの影響では、喫煙者は非喫煙者に比べて、唾液 IgA や血清 IgG が減少を示しているとの報告がある^{4,5)}。cytokine 産生に対する影響では、主に炎症性 cytokine に関する報告である⁶⁻⁹⁾。炎症は、さまざまな侵襲に対する生体の局所的な生体反応の1つで、生体に細菌感染など侵襲が加わると、その部位では血管の拡張につづいて血管の透過性の亢進、さらに血漿成分の滲出が起こる。ついで好中球を中心とする炎症細胞が浸潤し、炎症性メディエーターが産生される。炎症性 cytokine には、IL-1、IL-6、IL-8、GM-CSF、TNF- α 、TNF- β 、EGF、FGF、PDGF、IFN- γ 、MCP-1、RANTES などがある。喫煙による炎症性 cytokine への影響として、Anderson ら⁶⁾、Bostromr ら⁷⁾は能動喫煙、受動喫煙ともに血清中の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、の変化は認められないが、歯肉溝滲出液では、TNF- α のレベルが喫煙者で増加していると報告している。最近では、Rawlinson ら⁸⁾は喫煙者の深い歯周ポケットで非喫煙者に比べ歯肉溝滲出液中の IL-1、IL-1 β 、の量が減少しているとの報告をしている。また、Fredrikson ら⁹⁾は喫煙者の末梢血の好中球からの IL-8 の産生能力は口腔内が健康な喫煙者よりも歯周病を有する喫煙者で低下しているとの報告をしてい

る。

しかし、まだ喫煙による歯周疾患のメカニズムは明らかでない。そこで今回我々は、喫煙による歯周組織破壊のメカニズムを直接的影響面から観察するため、ヒト歯根膜線維芽細胞にタバコの成分である nicotine を作用させ、細胞の形態変化と cytokine の関係を観察した。

材料および方法

1. ヒト歯根膜線維芽細胞の培養

歯根膜は、某歯科医院に来院した10~12歳の患者で、矯正治療を目的とした抜去歯から採取された。患者に本研究の概要を説明し、同意を得た上で試料とした。

ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPLF) は、Kawase¹⁰⁾ による歯根膜組織片の explant によるサンドイッチ法により、遊走した細胞を初代培養細胞とした。培養は dish にて行い、5%牛胎児血清 (FCS: Whittaker bioproduct)、50 μ g/ml アスコルビン酸 (和光純薬) および抗生物質 (100unit/ml penicillin & 100 μ g/ml streptomycin Gibco #600-5/40) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM: 日本製薬) 中に懸濁させ、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の CO₂ incubator 内で培養し、3~4日組織片から細胞が遊走していることを確認し、培地を交換した。組織片から遊走した細胞が増殖し、ウェルの面に対して約80%の confluent に達していることを確認した。細胞継代は、初代培養細胞を0.25%trypsin (1/250, Difco laboratories) を含む PBS (-) (Ca²⁺, Mg²⁺ free phosphate buffered saline: 日本製薬) で処理し、5、10継代の細胞を用いた。

HPLF の継代時の細胞密度は 1.8×10^4 cells/cm² で100mmの培養皿に confluent に達するまでの約7日間培養し、位相差顕微鏡を用いて HPLF が confluent であることを確認して用いた。

2. HPLF の形態変化

5代継代 HPLF に、nicotine (和光純薬) の濃度4.6 μ M、9.2 μ M、13.8 μ M を5時間作用させ、

HPLF の形態変化を位相差顕微鏡 (Nikon TE - 300) で観察した。次に、10代継代 HPLF に7.7 μ M、23.0 μ M の nicotine、を5時間作用させ、HPLF の形態変化を観察した。

3. Cytokine の発現

A. 試料

ほぼ confluent の状態の5代継代 HPLF に4.6 μ M、9.2 μ M、13.8 μ M の nicotine を5時間作用させ、試料とした。

また、ほぼ confluent の状態の10代継代 HPLF に nicotine を7.7 μ M、23.0 μ M、を5時間作用させ、試料とした。

B. 測定方法

Cytokine の観察には、RayBioTM Human Cytokine Array を使用し、以下の手順で行った。

- ① 8枚の組織培養用プレートに、膜を入れる。
- ② 2mlの1X Blocking Buffer (10% bovine serum albumin BSA) 加え、室温で30分浸漬する。
- ③ 各濃度の nicotine で5時間培養したヒト歯根膜線維芽細胞を遠心し、調整した1mlの検体を膜に固定させ、室温で1時間培養する。
- ④ 検体を取り去る。
- ⑤ 3回 1x Wash Buffer I (0.2M Tris HCl pH7.6, 3M NaCl 2% Tween) を室温で、各5分洗浄する。
- ⑥ 1X Wash Buffer II (0.2M Tris HCl pH7.6, 3M NaCl) で2回洗う。
- ⑦ 500倍に薄めた biotin-conjugated 抗体を1ml加え、室温で60分反応させる。
- ⑧ ステップ5、6を行う。
- ⑨ チューブ2から20,000 fold HRP-conjugated streptavidin を加える。(1 μ l の HRP-conjugated streptavidin を1,990 μ l の Blocking Buffer に加える。
- ⑩ 室温で60分反応させる。
- ⑪ ステップ5、6を行う。
- ⑫ 反応の検知は、Chemiluminescence imaging system を用いた。化学発光はフォトンカウンター (Lumicounter1000; マイクロテック・ニ

| | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | k | l |
|---|---------------|--------------|-------|-------|--------|------|----------------|--------|---------------|--------|---------------|----------------|
| 1 | Pos | Pos | Neg | Neg | ENA-78 | GCSF | GM-CSF | GRO | GRO- α | I-309 | IL-1 α | IL-1 β |
| 2 | Pos | Pos | Neg | Neg | ENA-79 | GCSF | GM-CSF | GRO | GRO- α | I-310 | IL-1 α | IL-1 β |
| 3 | IL-2 | IL-3 | IL-4 | IL-5 | IL-6 | IL-7 | IL-8 | IL-10 | IL-12 | IL-13 | IL-15 | IFN- γ |
| 4 | IL-2 | IL-3 | IL-4 | IL-5 | IL-6 | IL-7 | IL-8 | IL-10 | IL-12 | IL-13 | IL-15 | IFN- γ |
| 5 | MCP-1 | MCP-2 | MCP-3 | MCSF | MDC | MIG | MIP-1 δ | RANTES | SCF | SDF-1 | TARC | TGF- β 1 |
| 6 | MCP-1 | MCP-2 | MCP-3 | MCSF | MDC | MIG | MIP-1 δ | RANTES | SCF | SDF-2 | TARC | TGF- β 2 |
| 7 | TNF- α | TNF- β | EGF | IGF-1 | Ang | OSM | Tpo | VEGF | PDGF β | Leptin | Neg | Pos |
| 8 | TNF- α | TNF- β | EGF | IGF-1 | Ang | OSM | Tpo | VEGF | PDGF β | Leptin | Neg | Pos |

図1. Cytokine Map

チオン社製)を用いて検出した。検出した発光はA/D変換器(power Lab 4/20;エー・ディー・インストゥルメント)を介してコンピューターに記録し、Chart4.02解析ソフトにより発光量の変化を解析した。また、膜に発現したCytokineは、Map(図1)で判定した。

結果および考察

1. HPLFの形態変化

5代継代HPLFに、各種濃度のnicotineを5時間作用させた時の形態変化は図2に示した。

HPLFに4.6 μ M nicotineを作用させたものは、細胞が細くなった(図2-b)。9.2 μ M nicotineを作用させたものは、表面に孔が空き、網の目状を呈していた(図2-c)。これは細胞の内容物が外に出ている状態と考えられる。13.8 μ M nicotineを作用させたものは、細胞の溶解が始まり、一方が丸くなり、おたまじゃくし状を呈していた(図2-d)。

10代継代HPLFに、各種濃度のnicotineを5時間作用させた時の形態変化を図4に示した。

10代継代HPLFはcontrolですでに細胞が細くなり始めていた(図4-a)。7.7 μ M nicotineを作用させたものは、表面に孔が空き網の目状を呈していた(図4-b)。この状態は、5代継代細胞に9.2 μ M nicotineを作用させた時と同じであった。23.0 μ M nicotine作用させたものは、細胞が丸くなり始めて溶解が始まっていた(図4-c)。

このことにより、nicotineの濃度が、高くなるにつれ、細胞破壊が進むことが示唆された。

2. nicotine刺激によるcytokineの発現

5代継代HPLFに、nicotineを作用させた時のcytokineの発現を、図2に示した。

controlでは、MCP-1がわずかに発光していた(図2-a')。4.6 μ M nicotineを作用させたものは、IL-6、IL-8、MCP-1の発光が顕著であった。他に、GRO、IL-1 α 、IL-12、TGF- β 1、TGF- β 2、が観察された(図2-b')。9.2 μ M nicotineを作用させたものは、IL-6、IL-8が4.6 μ M nicotineを作用させたものに比べて、発光が薄くなった。MCP-1もIL-6、IL-8と同様に4.6 μ M nicotineより発光が薄くなっていた。他に新たにIL-12、TNF- β 、OSM、PDGF β が観察された。4.6 μ M nicotineで、観察されたGROは観察されなかった(図2-c')。13.8 μ M nicotineを作用させたものは、MCP-1が黄色く発光していた。TNF- β 、OSM、PDGF β 等は9.2 μ M nicotineよりもわずかに発光が強くなった。新たに、VEGF、TPO、Leptin等が観察された。9.2 μ M nicotineで観察されたIL-8は観察されなくなり、IL-6もほとんど発光しなくなった(図2-d')。

5代継代HPLFに各種のnicotineを作用させた時のIL-6、IL-8の経時的発光量を観察した結果、発光量は、どの濃度においても経時的に増加したが、両者共に4.6 μ Mのnicotineを作用させた時、最も強い発光量を示した(図3)。

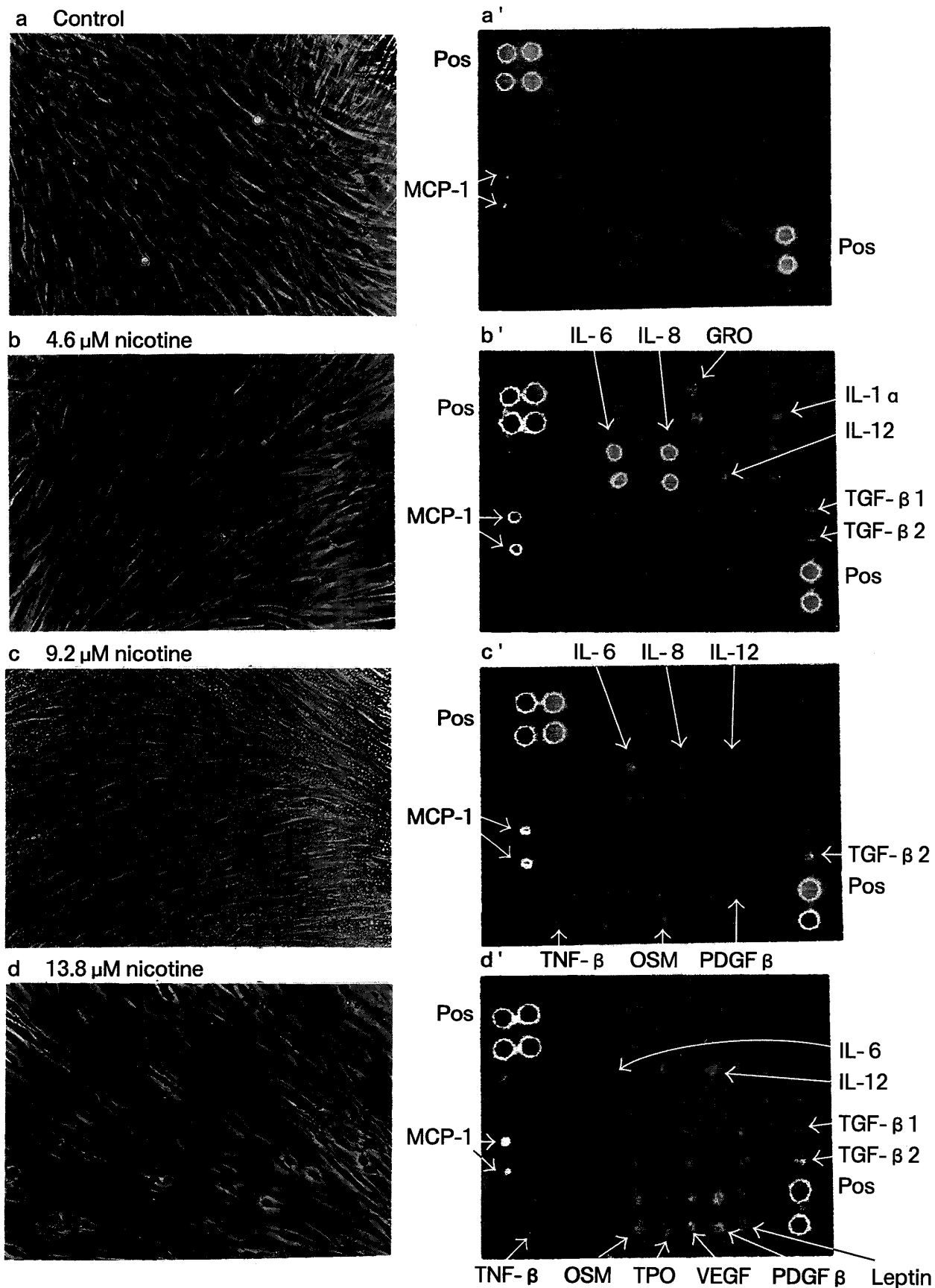


図 2. 5代継代 HPLF への nicotine 刺激による形態変化と cytokine の発現

次に10代継代 HPLF に、nicotine を作用させた時の cytokine の発現を、図 4 に示した。

control では、IL-8、IL-12、が赤く発光しているのが観察された。他に IL-1 α 、GRO、ENA-79 が観察された (図 4-a')。この結果より、

IL-8 などの炎症性 cytokine が、control で観察されたことは、すでに細胞に炎症が進んでいると考えられる。7.7 μ M nicotine を作用させたものは、ENA-79、IL-6、IL-8、IL-12、IL-1 α 、OSM、TPO が観察された (図 4-b')。23.0 μ M

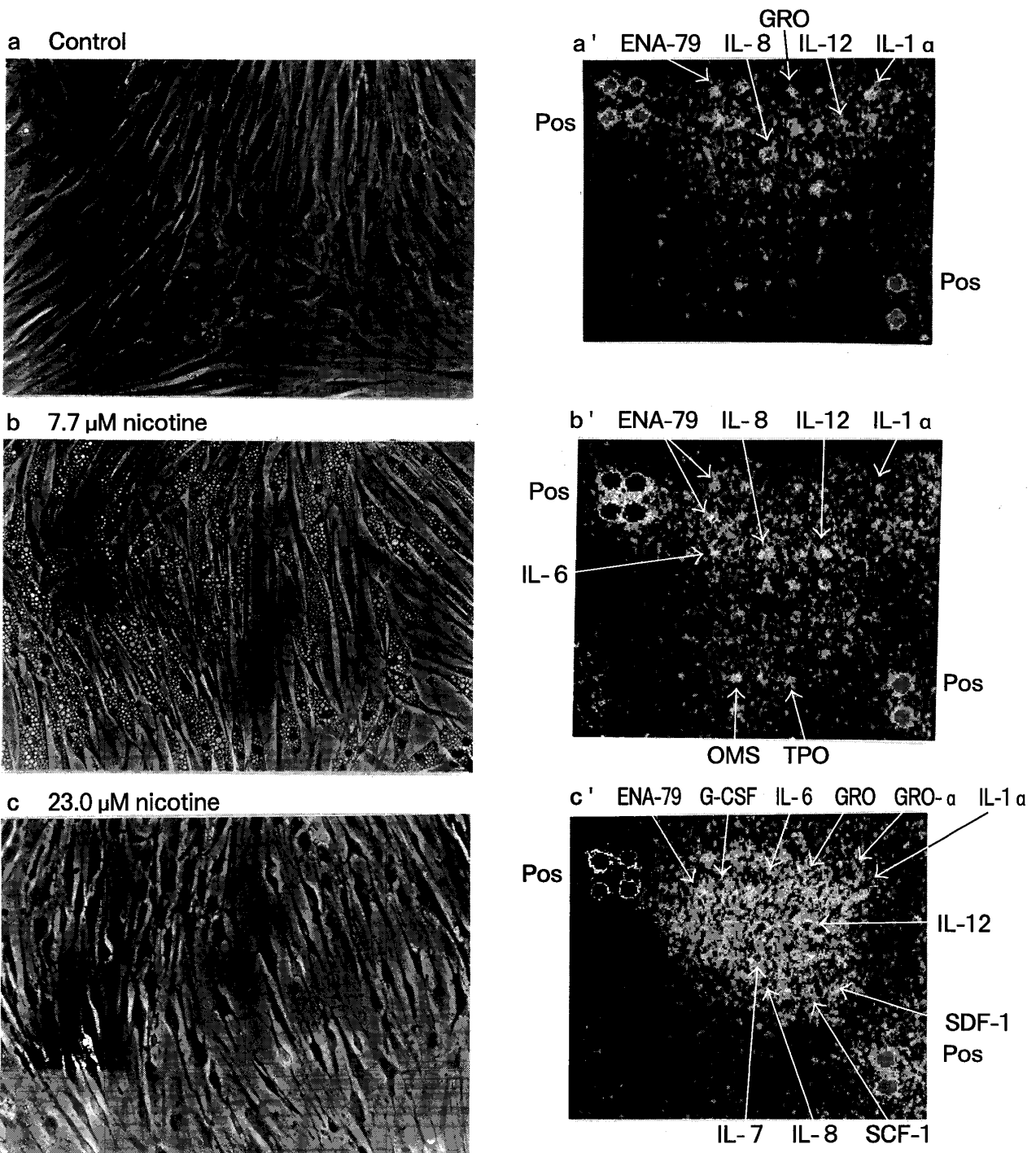


図 4. 10代継代 HPLF への nicotine 刺激による形態変化と cytokine の発現

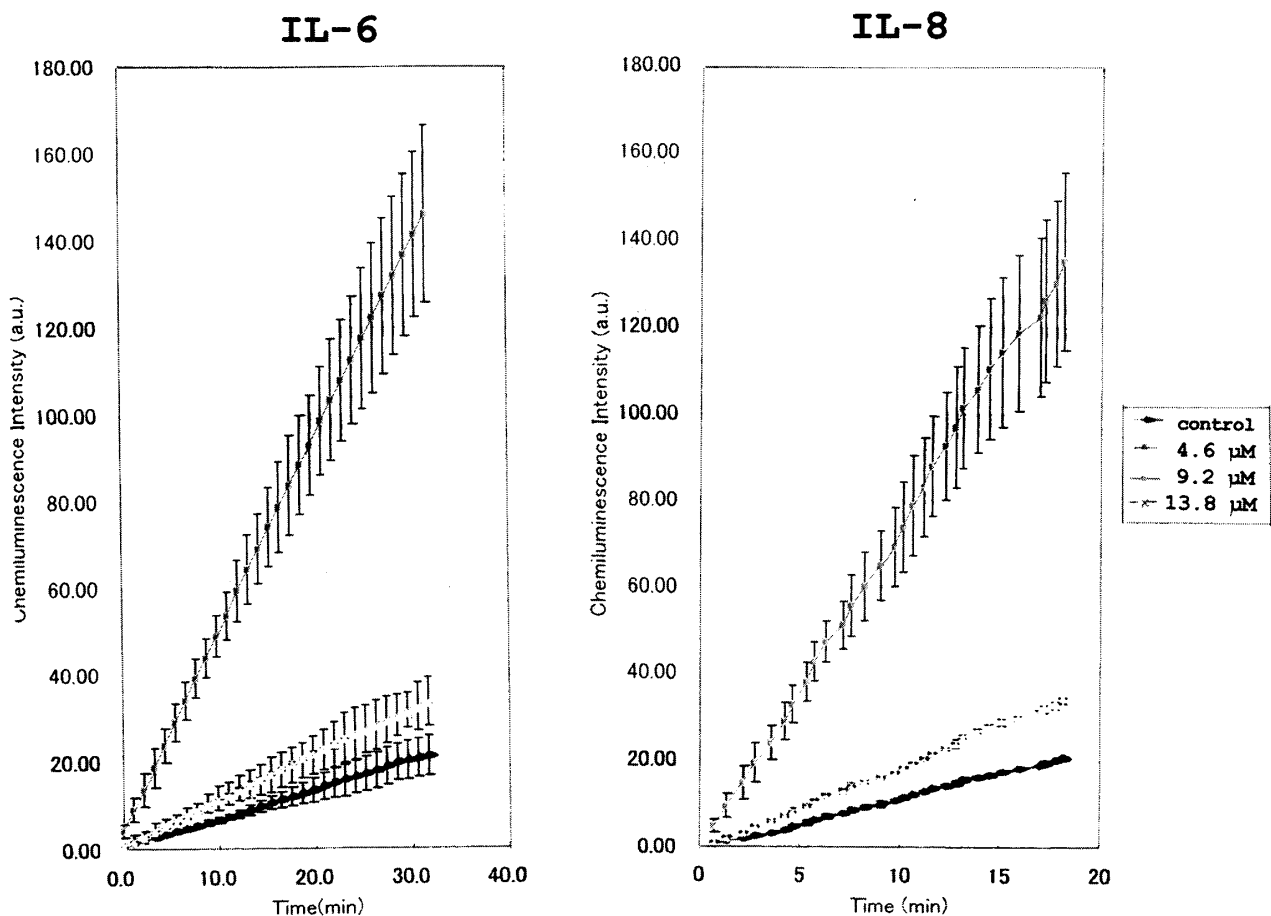


図3. 5代継代 HPLF への各種 Nicotine を作用させた時の IL-6、IL-8 の発光量の経時的変化

nicotine を作用させたものは、IL-8、IL-12 の発光が他に比べ、強く観察された。他に観察されたのは、ENA-79、G-CSF、GRO、GRO- α 、IL-1 α 、IL-7、SCF、SDF-1 であった (図4-c)。

炎症性 cytokine のうち、歯周疾患と関連があるといわれているものに、IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、M-CSF、RANKL などがある。そのうち骨吸収と関係のある cytokine の研究では Suda ら¹¹⁾が、マウスに M-CSF を投与すると、骨組織に破骨細胞が出現するとの報告をしている。また、Sakuma ら¹²⁾は IL-1、や TNF- α は、破骨細胞前駆細胞に直接作用して破骨細胞への分化を促進するなどの報告をしている。

今回、我々の結果からも、同種の cytokine の発現が観察された。特に、nicotine を HPLF に作用させ、4.6 μ M の低濃度の nicotine 作用で、

歯周疾患と関連があると言われて^{6,9)}、IL-6、IL-8 が観察されたことは、低濃度の nicotine 刺激でも歯肉の炎症を誘引することが考えられる。タバコの銘柄、1日の本数、喫煙歴も各個人で異なるので、生体に与える薬理作用もさまざまであると考え、タバコの成分の nicotine は歯周病のリスクファクターになり得るものと考え。

参考文献

1. 苔口進、村山洋二、歯周病の病因、岡田宏、石川烈、村山洋二監修、先端医療シリーズ、歯科医学2、歯周病、新しい治療を求めて、先端医療技術研究所、東京、215-221、(2000)
2. Sasagawa S., Kameda H., Sudou J., Tanabe T., Inhibitory effect of nicotine on chemiluminescence response of human polymorphonuclear leukocytes.

- clear leukocytes stimulated by opsonized zymosan in vitro, *J Toxicol Sci*, 9, 1-9, (1985)
3. Sasagawa S., Suzuki K., Sakatani T., Fujikura T., Effects of nicotine on the functions of human polymorphonuclear leukocytes in vitro, *J Leukoc Biol*, 37 493-502, (1985)
 4. Bennet K.R., Read P.C., Salivary immunoglobulin A levels in normal subjects, tobacco smokers, and patients with minor aphthous ulceration, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 53, 461-465, (1982)
 5. Barbour S.E., Nakashima K., Zhang J.B., Tangada S., Hahn C.L., Schenkien H A., Tew J.G., Tobacco and smoking, environmental factors that modify the host response (immune system) and have an impact on periodontal health, *Crit Rev Oral Biol Med*, 8, 437-460, (1997)
 6. Anderson R., Theron A.J., Ricahard G.A., : Passive smoking by human Sensitizes circulating neutrophils, *Am Rev Resp Dis*, 144, 570-574, (1991)
 7. Bostrom L., Linder L.E., Bergstrom J., Smoking and cervicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 26, 352-357, (1999)
 8. Rawlinson A., Grummitt J.M., Walsh T.F., LanDouglas C.W., Interleukin 1 and reseptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers Versus non-smoker, *J Clin Periordontol*, 30, 42-48, (2003)
 9. Fredrikson M., Bergstorom K., Asman B., IL-8 and TNF α from peripheral neutrophils and acute-phase proteins in periodontitis, *J Clin Periordontol*, 29, 123-128, (2002)
 10. Kawase T., Sato S., Miyake K., and Saito S., Alkaline Phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cell, *Adv Dent Res*, 2, 234-239, (1988)
 11. Suda T., Takahashi N., Udagawa N., Modulation of osteoclast differentiation and function by the new member of the tumor necrosis-factor receptor and ligand families, *Endocr Rev* 20, 345-357, (1999)
 12. Sakuma Y., Tanaka K., Suda M., Crucial involvement of the EP 4 subtype of Postaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokine and lipopolysaccharide, *J Bone Miner Res* 15, 28-227, (2000)