The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト樹状細胞に対するニコチンの免疫学的影響
Author(s)	小林, 良平
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49220
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【33】

氏　　名	小　林　良　平（こばやし りょうへい）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２１９３５　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**ヒト樹状細胞に対するニコチンの免疫学的影響**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　村上　伸也 （副査） 教　授　川端　重忠　　准教授　永田　英樹　　准教授　和田孝一郎

論 文 内 容 の 要 旨

（研究目的）

慢性炎症疾患である歯周病は、その発症および進行に宿主の免疫反応が深く関与している。近年、喫煙量と歯周病の重症度には正の相関があることが示されており、ニコチンをはじめとするタバコの煙が口腔組織へ及ぼす健康被害は甚大であると考えられる。口腔粘膜においては数多くの免疫担当細胞が存在しているが、その中でも樹状細胞は生体の免疫応答制御において重要な役割を果たしている。主に単球から分化する樹状細胞は、末梢組織において抗原を取り込むとリンパ節へ遊走する過程において成熟樹状細胞へと分化する。そしてリンパ節に到達した樹状細胞は主にT細胞領域における抗原提示や、サイトカインの産生、ナイーブT細胞の分化誘導を制御している。このように樹状細胞は自然免疫と獲得免疫の橋渡しにおいて中心的な役割を果たしていると考えられているが、タバコの煙主要成分であるニコチンが樹状細胞に及ぼす影響に関しては、未だ不明な点が多い。そこで本研究ではニコチンが樹状細胞の免疫機能に及ぼす影響について検討した。

（材料および方法）

ヒト末梢血液から CD14 陽性単球（Monocyte：Mo）を分離・採取し、IL-4（20μg/ml）、GM-CSF（50μg/ml）存在下で単球由来樹状細胞（monocyte-derived dendritic cell：moDC）へ分化誘導させ、以下の実験に供した。1）Mo および moDC におけるニコチン受容体（nAChR）サブユニットの発現解析：nAChR のサブユニットのうちα1～7、9、10 およびβ1～4 の発現を RT-PCR 法にて検討した。2）ニコチンレセプターを介した細胞内へのカルシウムイオン流入量測定：Mo および moDC にニコチン刺激した際の細胞内へのカルシウムイオン流入量の変化を FACS にて測定した。また nAChR のアンタゴニストにて前処理を加えることにより細胞内へのカルシウムイオン流入量の変化を比較検討した。3）樹状細胞の抗原貪食能に及ぼすニコチンの影響：moDC およびニコチン存在下で分化させた樹状細胞（niDC）に FITC-dextran（200μg/ml）を加え、1時間培養した後に FACS を用いて貪食量を比較検討した。4）樹状細胞の T 細胞増殖誘導能におけるニコチンの影響：moDC および niDC を LPS（*S. minnesota*、*P. gingivalis*）、ペプチドグリカン（*S. aureus*）を用いて刺激を加え成熟させた後に、ナイーブ T 細胞と 7 日間共培養した。共培養後に T 細胞の増殖活性を WST-1 法およびトリチウムチミジンの取り込み量を用いて比較検討した。5）樹状細胞の共刺激分子発現に及ぼすニコチンの影響：moDC および niDC を LPS（*S. minnesota*）を用いて成熟させた後、細胞表面上の共刺激分子（HLA-DR、CD80、CD86、PD-L1、PD-L2、ILT-3、ILT-4）の発現を FACS にて比

較検討した。6）樹状細胞のサイトカイン産生能におけるニコチンの影響：moDC および niDC を LPS（*S. minnesota*）にて刺激し、24 時間培養した後に細胞培養上清中におけるサイトカイン（IL-8、IL-10、IL-12、TNF-α）濃度を ELISA 法にて比較検討した。

（結果）

１）Mo、moDC いずれにおいてもα1～7、β2、4 の nAChR サブユニット mRNA の発現を RT-PCR 法にて確認した。２）Mo および moDC をニコチン刺激することにより細胞内へのカルシウムイオン流入量が上昇することを確認した。また nAChR のアンタゴニスト処理を行うことで Mo および moDC 内へのカルシウムイオンの流入が阻害された。３）ニコチン存在下で分化誘導した niDC は moDC と比較して抗原貪食能が減弱傾向を示すことが認められた。４）niDC は moDC と比較してアロ反応性 T 細胞に対する増殖誘導能がニコチン濃度依存的に減少していることが明らかになった。５）DC 上に発現する共刺激分子のうち、HLA-DR などは特に変化は認めなかった。しかし T 細胞増殖誘導において抑制的に働くと考えられている共刺激分子である PD-L1、PD-L2、ILT-3、ILT-4 の発現が、niDC において moDC よりも高発現していることが明らかになった。６）IL-8 の産生量がニコチン低濃度存在下で分化した niDC において減少していること、また IL-10、IL-12、TNF-α の産生量がニコチン高濃度存在下で分化した niDC において減少していることが明らかになった。

（結論と考察）

樹状細胞の前駆細胞である単球、および単球由来樹状細胞において機能的な nAChR のサブユニットが複数発現していることが示唆された。またニコチン存在下において単球から分化した樹状細胞は、抗原貪食能や T 細胞増殖誘導能、サイトカイン産生能が減弱していることが示唆された。これらのことから喫煙時のタバコに含まれているニコチンによって樹状細胞の免疫機能が修飾され、*P.g.* などの歯周病原因菌に対する宿主の口腔内における免疫応答が低下することで歯周病の病態悪化に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は歯周病のリスク因子である喫煙に着目し、タバコの煙主成分であるニコチンが、免疫応答制御において主要な役割を果たしている樹状細胞の各種機能に及ぼす影響を解析したものである。

その結果、ヒト単球及び樹状細胞には機能的なニコチンレセプターが発現していることが示されると共に、ニコチン存在下で単球から分化した樹状細胞においては、抗原貪食能、T 細胞増殖誘導能および種々のサイトカインの産生能が低下することが明らかとなった。

これらの知見は歯周病の病態形成に及ぼす喫煙の影響を理解する上で重要な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。