

Title	ニコチンが歯肉上皮細胞の免疫応答に及ぼす影響
Author(s)	柏木, 陽一郎
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57605
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【17】

氏 名	柏 木 陽 一 郎 <small>かしわ き よういち らう</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 7 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 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	ニコチンが歯肉上皮細胞の免疫応答に及ぼす影響
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村 上 伸 也 (副査) 教 授 雫 石 聰 准教授 寺 尾 豊 講 師 中 澤 光 博

論文内容の要旨

<研究目的>

上皮細胞は外界と生体内を隔てる物理的なバリアーとしての役割だけでなく、外来の微生物に対する生体防御機構の一端を担っている。また、外来刺激を受けた上皮細胞からケモカインや抗菌ペプチド、フリーラジカルなどが産生されることや、上皮細胞自体が抗原提示能を有するという報告もあり、同細胞の多様な機能が明らかになりつつある。

歯周病の主な原因はデンタルプラークであり、その発症、進行を左右するリスク因子の一つとして喫煙があげられる。近年、タバコの主要な構成成分の一つであり神経伝達物質でもあるニコチンは、その受容体のニコチン様アセチルコリン受容体(Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR))を介して細胞内にシグナルを伝達することにより、神経系細胞のみならず、免疫系細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞などの非神経性細胞に対しても、細胞増殖、遊走、分化、あるいはアポトーシスに関与していることが報告されている。しかしながら、ヒト歯肉上皮細胞(HGEC)に対するニコチンの影響に関しては未だ十分な検討がなされていない。

喫煙により吸引したタバコの煙が最初に曝露する宿主の組織は口腔であり、歯周組織の最も外側に位置している歯肉上皮は高頻度かつ高濃度でタバコの煙に曝されている。このことからタバコの煙成分が歯肉上皮細胞の細胞機能に何らかの影響を及ぼしていることが予想される。

そこで本研究では、HGECの細胞機能に対する喫煙の影響の一端を解明することを目的として、ニコチンがHGECのケモカインおよび抗菌ペプチドの産生や細胞間接着分子の発現に及ぼすかを、歯肉上皮細胞株 epi 4 を用いて検討を行った。

<材料および方法>

インフォームドコンセントが得られた歯周炎患者より歯周外科時に採取した歯肉組織片から上皮細胞を単離し、上皮細胞用選択培地(Humedia-KG2)を用いて培養、増殖してきた細胞をHGECとした。HGECを2代継代培養の後、SV40T抗原遺伝子を含むプラスミド(pMT10D)をリン酸カルシウム法にて同細胞に導入した。得られた細胞をHumedia-KG2培地を用いて培養を続け、長期継代培養可能なヒト歯肉上皮細胞(epi 4)を確立し、60~80%コンフルエントとなったものを以下の実験に供した。

1. epi 4におけるnAChRの発現状態をRT-PCR法にて検討した。
2. epi 4をニコチン(10^{-8} ~ 10^{-3} M)とヒトリコンビナント(hr) IL-1 β (0.1 ng/ml)で刺激して、培養12、24時間後、IL-8、 β -defensin2(hBD2) mRNAの発現をリアルタイムPCR法にて検出した。また24、48時間後の培養上清中のIL-8、hBD2産生をELISA法にて測定した。
3. epi 4をニコチン(10^{-8} ~ 10^{-3} M)とhr IL-1 β (0.1 ng/ml)で刺激して、培養を12、24時間後、細胞間接着分子であるE-cadherin・ZO-1・occludin mRNAの発現をリアルタイムPCR法にて検出した。また、ニコチン(10^{-3} M)を添加して、24時間後のE-cadherin mRNAの発現をリアルタイムPCR法にて検出し、48時間後のE-cadherinタンパク発現を免疫染色法にて検討した。
4. nAChRを介したニコチンの影響について検討するために epi 4 を nAChR 非特異的阻害薬

d-tubocurarine で前処理後、ニコチン(10^{-3} M)とhr IL-1 β (0.1 ng/ml)で刺激して誘導されるIL-8の発現について検討した。

5. ニコチンにより誘導される細胞内シグナル伝達について検討した。ニコチンによるmitogen-activated protein kinase(MAPK)のERK1/2リン酸化に及ぼす影響に着目し、ニコチン(10^{-3} M)で5~60分刺激した後、cell lysateを回収し、Western Blot法にてERK1/2リン酸化発現の検討を行った。また、ニコチンにより誘導されるリン酸化に対してd-tubocurarine、Ca²⁺キレーターであるBAPTA-AMの阻害効果を検討した。さらに、ニコチンにより誘導されるIL-8産生増強に対する細胞内シグナルの影響を検討するためにBAPTA-AM、ERK1/2の阻害薬であるU0126それぞれで前処理後、ニコチン(10^{-3} M)とhr IL-1 β (0.1 ng/ml)で刺激して誘導されるIL-8の発現について検討した。

<結果>

1. epi 4においてnAChRサブセット α 2、 α 3、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 9、 β 1、 β 2、 β 4のmRNA発現が明らかになった。
2. IL-1 β 刺激を受けた epi 4 はニコチン存在下では、IL-8、hBD2の発現を有意に増強することが確認された。
3. IL-1 β 刺激を受けた epi 4 はニコチン存在下では、E-cadherin・ZO-1・occludinのmRNA発現を増強した。また、E-cadherin はニコチン単独刺激によってもmRNA発現・タンパク発現の亢進が認められた。
4. nAChR非選択的阻害薬d-tubocurarine 前処理した epi 4 は、ニコチンとIL-1 β によって誘導されるIL-8発現を抑制した。
5. epi 4においてMAPKのERK1/2のリン酸化は、ニコチン刺激後10分に最も強く誘導された。また、ニコチン刺激後のERK1/2のリン酸化はd-tubocurarineとBAPTA-AMにより明らかに阻害された。さらに、ニコチンによって誘導されるIL-8の産生増強はBAPTA-AMとU0126により有意に阻害された。

<結論および考察>

epi 4はニコチン存在下で、IL-8、hBD2のmRNA、タンパク発現を増強し、非特異的nAChR阻害薬の添加によりこのニコチンの効果は減弱した。このことからニコチンがnAChRを介してIL-8、hBD2産生亢進に関与している可能性が示唆された。さらに、ニコチンはnAChRを介する細胞内へのCa²⁺流入とERK1/2のリン酸化を惹起することにより epi 4の細胞機能に影響を及ぼすことが示された。

以上のことから、HGECはニコチンに曝露することにより、IL-8産生を増強する一方で、抗菌ペプチドや細胞間接着分子の発現も増強することにより、生体防御的な役割を強化するものと考察される。

論文審査の結果の要旨

本研究は歯肉上皮細胞の細胞機能に対して、タバコの煙主成分であるニコチンが及ぼす影響について検討したものである。

その結果、歯肉上皮細胞において複数のニコチン様アセチルコリン受容体mRNA

の転写を認めた。また、ニコチンはその受容体を介して歯肉上皮細胞の自然免疫機構を賦活化すると共に、同細胞における細胞連結装置の発現を増強させることが明らかとなった。

以上の知見は、喫煙者の歯周病病態解明の一端として有益な新情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。