



Title	タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に及ぼす影響
Author(s)	辰巳, 真理
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76300
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏 名 (辰 巳 真 理)	
論文題名	タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に及ぼす影響
論文内容の要旨	
<p>【研究目的】</p> <p>歯周病は歯周病原性細菌を含むバイオフィルムが原因となり、歯周組織の破壊が惹起される慢性炎症性疾患である。歯周組織の主要な構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞は、歯肉結合組織中に存在し細胞外基質の産生および分解制御等を介して同組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている。歯周病の発症・進行は原因に加えて、様々なリスク因子が関与している。とりわけ喫煙は歯周病の進行に多大な影響を及ぼす主要な環境因子としてこれまで多くの研究報告がなされている。喫煙者の歯周組織にみられる特徴として、同年代の非喫煙者と比較して重度歯周炎の罹患率が高いのみならず、歯周基本治療に対する反応が低く、歯周組織再生療法においてもその成功率が有意に低いことが知られている。これまでなされた喫煙と歯周病に関するほとんど全ての基礎研究において、歯周組織構成細胞に対して、タバコ煙成分を最長で72時間程度の刺激を行い、その細胞機能の変化を検討している。しかし、喫煙習慣は長期間にわたり継続されることが一般的である。そこで本研究では、タバコ煙成分存在下での長期間に及ぶ培養条件下において歯肉線維芽細胞（HGF）の機能がどのような影響を受けるのか検討することにより、長期間に及ぶ喫煙習慣が歯周病の病態形成・進行へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。</p>	
<p>【材料および方法】</p> <p>1) 細胞培養</p> <p>タバコ煙の代替物質としてNicotineとタバコ煙濃縮物（Cigarette Smoke Condensate: CSC）を実験に供した。Nicotineの濃度を10^{-8} M、10^{-6} M、CSCの濃度を0.073 μg/ml、7.3 μg/mlとした。HGFをNicotineあるいはCSC存在下・非存在下で4日間培養した群を短期培養群、概ね25日間培養した群を長期培養群とし、以下の方法にてタバコ煙成分がHGFの細胞機能に及ぼす影響について検討した。</p> <p>2) タバコ煙の長期曝露がHGFの細胞機能に及ぼす影響の検討</p> <p>短期培養および長期培養したHGFにおけるタバコ煙の曝露が細胞増殖能に及ぼす影響についてWST-1法、細胞遊走能に及ぼす影響について創傷治癒実験にて検討した。タバコ煙の長期曝露により誘導されるCollagenをはじめとするECMタンパクの産生および炎症性メディエーターの遺伝子発現をReal-time PCR法およびタンパク発現をELISA法にて検討した。</p> <p>3) タバコ煙の長期曝露がHGFの細胞老化に及ぼす影響の検討</p> <p>短期培養および長期培養したHGFにおける老化関連遺伝子の発現をReal-time PCR法にて検討し、老化関連β-Gal活性を指標として細胞レベルでの老化形質の解析を行った。短期培養および長期培養したHGFのmiRNAを抽出し、miRNAアレイを用いてその発現プロファイルを検討した。さらに発現変動の認めたmiRNAの機能を解析するため、miRNA mimicを導入して実際の機能制御を検討した。</p>	
<p>【結果】</p> <p>1) 短期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群では細胞増殖能に有意な差を認めなかった。一方で、長期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群では細胞増殖能の有意な低下傾向を認めた。</p> <p>2) 短期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群では細胞遊走量に有意な差を認めなかった。一方で、長期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群では細胞遊走量の有意な減少を示した。</p> <p>3) 短期培養したHGFにおいて、いずれの条件下でも I 型Collagen、III型Collagen、Fibronectin、Decorinの遺伝子発現</p>	

に有意な差を認めなかった。これに対して、長期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群ではこれらの遺伝子発現の有意な増加を認めた。また I 型Collagenのタンパク発現を反映するPIPについて検討したところ、長期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群では発現の有意な増加を認めた。

- 4) 長期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群ではIL-6、IL-8の遺伝子発現の有意な増加を認めた。またIL-6、IL-8タンパク発現は、遺伝子発現とはほぼ同様の傾向を示した。興味深いことに、タバコ煙成分非存在下で短期培養したHGFと比較して、長期培養したHGFにおいてIL-6の遺伝子発現およびタンパク発現は有意に増加した。
- 5) 短期培養したHGFにおいて、いずれの条件下でもp16、p21、p53の遺伝子発現に有意な差を認めなかった。一方で、タバコ煙成分非存在下で短期培養したHGFと比較して、長期培養したHGFにおいて老化関連遺伝子の発現の有意な増加を認め、タバコ煙刺激群ではさらに増加した。
- 6) 短期培養したHGFにおいて、タバコ煙刺激群では老化関連β-Gal陽性細胞の存在をわずかに認めた。一方、長期培養することによりタバコ煙成分非存在下でも老化関連β-Gal陽性細胞は検出され、タバコ煙成分存在下で顕著な増加を示した。またタバコ煙成分存在下で短期培養したHGFと比較して、長期培養したHGFにおいて老化関連β-Gal陽性細胞数の有意な増加を認め、タバコ煙成分存在下で長期培養することによりその数はさらに増加した。
- 7) 長期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群で1/2以下に抑制されたmiRNAは4種類存在した。そのうちmiR-29b、miR-199aに着目し、発現傾向を検討した結果、短期培養したHGFにおいて、いずれの条件下でもmiR-29b、miR-199aの発現に有意な差を認めなかった。その一方、長期培養したHGFにおいて、対照群と比較してタバコ煙刺激群では発現の有意な減少を認めた。発現変動を認めたmiRNAの機能解析を行うため、短期培養および長期培養したHGFにmiR-29b、miR-199a mimicをそれぞれ導入した。miR-29bでは、短期培養したHGFにおいて、いずれの条件下でもIL-6、IL-8、I型Collagen、III型Collagenの遺伝子発現の有意な差を認めなかった。一方、長期培養したHGFにおいて、短期培養したHGFよりもこれらの遺伝子発現が減少し、さらにタバコ煙成分存在下において、その遺伝子発現の有意な減少を認めた。同様に、miR-199aでは、短期培養したHGFにおいて、いずれの条件下でも遺伝子発現の有意な差を認めなかったが、長期培養したHGFにおいて、IL-6、IL-8、I型Collagen、III型Collagen、Fibronectinの遺伝子発現が減少し、さらにタバコ煙成分存在下で遺伝子発現の有意な減少を認めた。

【考察および結論】

喫煙者の体内に存在する濃度のタバコ煙成分を、長期間にわたり歯肉線維芽細胞へ曝露することで、炎症反応の増悪、ECMタンパク産生の変調、細胞老化の促進および創傷治癒反応の遅延が認められた。これらの結果から、長期間にわたる喫煙習慣は、歯肉線維芽細胞においてECMタンパクの発現異常、および慢性炎症の誘導により生じる歯周組織構成細胞の老化促進および組織修復の抑制さらには線維化の亢進を通して、歯周病の発症ならびに歯周病の病態増悪に関与する可能性が示唆された。また長期間タバコ煙に曝露された歯肉線維芽細胞の細胞老化におけるエピジェネティックな分子機構として、miRNAの関与が示唆された。本研究結果は、歯周病の主要な環境因子である喫煙が歯周病の発症・病態悪化を招く機序の一端を明らかにするものと考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (辰 巳 真 理)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	田熊 一敬
	副 査	准教授	伊藤 祥作
	副 査	講師	佐藤 淳

論文審査の結果の要旨

本研究は、喫煙習慣が歯周病の病態形成・進行へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、長期間タバコ煙成分が存在する培養条件下において歯肉線維芽細胞の機能がどのような影響を受けるのかを検討したものである。

その結果、長期間に及ぶタバコ煙存在下で継代された歯肉線維芽細胞において、炎症反応の増悪、様々な細胞外基質タンパク産生の変調、老化の促進および創傷治癒反応の遅延が認められた。本研究結果は、タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞に及ぼす影響を明らかにすると共に、歯周病の主要な環境因子である喫煙が歯周病の発症・病態悪化を招く機序の一端を明らかにしたものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。