

学位論文内容の要旨

受付番号	第 346 号	氏名	沼田 匠 
論文題名	ニコチンによるマクロファージからの炎症性サイトカイン産生促進機構の検索		
指導教員	廣瀬公治		

(論文内容の要旨 2,000字以内)

歯周病患者と健常者を用いた患者対照研究において、高い喫煙のリスクオッズがあることが示されるなど、喫煙が歯周病のリスクファクターのひとつであることが広く認識されるようになってきた。そして、喫煙と歯周病との関連についての基礎的知見を得るために、*in vitro*におけるいくつかの研究がなされてきた。このうち、タバコ煙中の主要な有害物質であるニコチンが歯肉上皮細胞からの抗菌タンパクであるディフェンシンの産生を抑制すること、さらにニコチンは歯周病原性細菌の口腔上皮細胞への定着を修飾することも示されている。さらにニコチンは、歯周病原性細菌のリポ多糖(LPS)と相乗して口腔角化細胞、口腔上皮細胞、そして歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカインの産生を促進することが報告されている。しかしながら、これら研究の多くは歯周組織のバリアとなる上皮系細胞に対するもので、歯周病の発症や進行に関与する免疫応答に対する作用を検討したものではない。

そこで本研究では、ヒトマクロファージ様細胞に対するニコチンの作用を、歯周病細菌の菌体構成成分として重要なリポ多糖(LPS)との共存下において、その作用を相乗的に促進するか否かについて、炎症性サイトカインであるインターロイキン1 (IL-1) β を指標として検索を行い、喫煙と歯周病との関連を示す基礎的知見を得ることを目的に実験を行った。

U937細胞にニコチン(0~10⁻³M)とPorphyromonas gingivalis (P. g) のLPSを添加し培養を行った。培養終了後、細胞からはtotal RNAを回収しRT-PCRにてpro-IL-1 β のmRNA発現を検索した。また、U937細胞のライセートを用いウエスタンブロットを用いNOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) とカスパーゼ1の産生状態を検索した。さらに培養上清中のIL-1 β 産生についてもウエスタンブロットにて検索した。

その結果、ニコチンはP. g LPSが誘導するU937細胞からのpro-IL-1 β mRNAの発現を相乗的に促進することをRT-PCRプロダクトを用いたアガロースゲル電気泳動のバンド濃度から確認した。さらに、同条件下で得られたU937細胞の培養上清中のIL-1 β タンパク質の産生も促進されることがウエスタンブロットのバンドの色調濃度の増加により確かめられた。さらには、ニコチンが相乗的に誘導するこれら発現及び産生促進は、IL-1 β の前駆

体であるpro-IL-1 β をプロセッシングするNLRP3インフラマソームの活性化と、それに続くカスパーゼ1の活性化がニコチンにより促進された結果であることがウエスタンブロットにより示された。

マクロファージは歯周局所において異物排除や抗原提示など多彩な免疫応答に関わっている。免疫応答の際にはIL-1 β や腫瘍壊死因子など破骨細胞活性化因子とされる炎症性サイトカインを産生し、慢性歯周炎の代表的病変である骨吸収に関与していることが示されている。そこで、マクロファージ様細胞であるU937細胞にニコチンとP. g-LPSを同時に添加し、IL-1 β の前駆体であるpro-IL-1 β のmRNA発現と培養上清中のIL-1 β 産生を検索したところ、両者の発現と産生の促進が認められた。このことは、歯周病患者における喫煙行動は、歯槽骨吸収を促進し、歯周病を増悪させる要因となることが示唆された。

IL-1 β は、その前駆体であるpro-IL-1 β がスプライシングを受けたものである。このスプライシングを行うのがカスパーゼ1である。そして、このカスパーゼ1の活性化は細胞質にあるNLRP3インフラマソームタンパク複合体の活性化が必要である。よって、ニコチンによってこのNLRP3インフラマソームが活性化されるかについて検討した。その結果ニコチンはU937細胞においてP. g-LPSと相乗的にNLRP3インフラマソームの活性化を促進することを、それぞれの活性化型を認識する抗体を用いたウエスタンブロットで確認した。このことは、ニコチン自体にNLRP3インフラマソームを活性化させる効果があることを示唆すると同時に歯周病において最も重要なサイトカインであるIL-1の産生機構にニコチンが直接関与する可能性をも示唆する。

以上のことから、喫煙は、歯周組織においてニコチンの持つ直接的害作用のほか、歯周病原性細菌による免疫担当細胞からの炎症性サイトカインの産生機構を相乗的に増強する可能性が示唆され、喫煙と歯周病との関連を考える上で興味ある知見であると考える。