

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05054

研究課題名(和文)最終糖化産物AGEsによる糖尿病関連歯周炎の重症化機序の解明と診断システムの構築

研究課題名(英文) Pathophysiology of diabetes-associated periodontitis and establishment of novel diagnosis system of diabetes-associated periodontitis

研究代表者

永田 俊彦 (NAGATA, Toshihiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・名誉教授

研究者番号：10127847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病・糖尿病関連歯周炎患者を対象として、血糖値および歯周炎症の状態を比較検討した。糖尿病関連歯周炎群における血糖値・HbA1c値は有意に高い値を示したが、皮下AGEレベルに有意差はなかった。また、糖尿病関連歯周炎群では歯肉溝滲出液中のIL-1およびsIL-6Rレベルが高い傾向が見られた。Pg菌由来LPSは高血糖下におけるTHP-1単球のIL-6産生を有意に亢進した。また、高血糖下におけるTHP-1マクロファージはsIL-6R産生を有意に亢進した。また高血糖下において歯肉線維芽細胞をIL-1やIL-6で刺激すると、NF-κB・MAPK系を介してMMP-1産生が有意に亢進した。

研究成果の概要(英文)：By a cross-sectional study, statistical differences of several parameters in periodontitis patients with or without diabetes were examined. Both levels of casual blood sugar (BS) and Hemoglobin A1c (HbA1c) of patients with diabetes were significantly higher than in patients without diabetes. Whereas, there was no significant difference between periodontitis patients with and without diabetes in the skin AGE levels. In oral condition, there were no statistical difference between periodontitis patients with and without diabetes in the periodontal conditions. GCF sIL-6R levels in periodontitis patients with PPD over than 6mm were higher significantly than in periodontitis patients without PPD over than 6mm. In in vitro study, high glucose (HG) induced significantly Pg LPS induced IL-6 production in THP-1. Glucose increased significantly sIL-6R production in THP-1 macrophages in a dose dependent manner. Both IL-1 and IL-6/sIL-6R dramatically enhanced the MMP-1 production in HG condition.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病関連歯周炎 AGE 歯肉線維芽細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景目的

現在、我が国の糖尿病患者は激増している。また糖尿病患者の歯周病は重症化することが知られているが(糖尿病関連歯周炎)、その病態機序は不明である。昨今、最終糖化蛋白 AGEs は様々な糖尿病合併症に負の影響を及ぼすことが明らかになり、糖尿病関連歯周炎の重症化にも深く関与しているものと推測される。しかしながら、一般に糖尿病の臨床検査においては、AGEs の臨床値に着眼したものは少なく、空腹時血糖値や HbA1c 値が基本的な指標として用いられている。本研究では、我々は非侵襲的に簡便に AGEs の生体濃度を測定できる機器を用いて、AGEs 値と糖尿病関連歯周炎との関連性を調べる臨床研究を立案した。また、その学術的意義の妥当性が正当に評価されるために、併せて AGEs の歯周炎病態に及ぼす作用を分子生物学的に探求することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AGEs を標的として臨床・基礎研究の両面から糖尿病関連歯周炎の重症化機序を解明し、その成果を将来の診断システムの確立に役立てることである。

3. 研究の方法

(1) Supportive Periodontal Therapy (SPT) 期の歯周病患者における歯周病診断システムの構築 —新規臨床パラメータの探索—

これまで、我々の研究室では、歯肉溝滲出液 (GCF) 中のカルプロテクチンが歯周病患者の歯周組織の炎症の診断マーカーになり得ることを報告してきた (Kido et al, J Clin Periodontol, 1999)。しかしながら、いったん歯周治療が終了した歯周病患者において、カルプロテクチンが歯周組織の炎症を評価し得る診断マーカーになるかどうかは、依然として不明であった。とりわけ、歯周治療後も歯周組織に炎症が残存するため、定期的な積極的な歯周感染管理を実施する SPT という治療概念が提唱されていることから、SPT 期の患者における有用な歯周病診断システムの構築は臨床的に大きな意義があると考えられる。そこで、SPT 期の患者を対象にして GCF 中のカルプロテクチンが歯周病診断の有効なパラメータになるかどうかを検討することにした。さらに、新規の炎症マーカーとしてインターロイキン 6 (IL-6) の生物学的アゴニストである可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) にも注目し、この分子がカルプロテクチンと同様に SPT 期の歯周病診断の有用なパラメータになるかどうか併せて検討した。

徳島大学病院歯周病科を受診した SPT 期の歯周病患者 (N=34, 66.1±11.9 yr) を対象として、各口腔内を炎症部位および健常部位に群分けし、各群における歯周炎症の状態および GCF 中のカルプロテクチンおよび sIL-6R レベルを比較検討した (横断研究) (徳島大学病院倫理審査委員会承認番号 2325)。

(2) 糖尿病関連歯周炎患者に見られる歯周病の重症化促進因子の探索

徳島大学病院歯周病科を受診した歯周病患者 (N=37, 63.3±8.4 yr) と糖尿病関連歯周炎患者 (N=33, 64.9±7.2 yr) を対象として、各群における血糖値レベルおよび歯周炎症の状態を比較検討した (横断研究) (徳島大学病院倫理審査委員会承認番号 2325)。

(3) 歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生におけるカルプロテクチンの作用

カルプロテクチンは、好中球等から分泌される S100A8 と

S100A9 分子の複合体である。これまでに我々の研究室では、歯周病患者の GCF 中にカルプロテクチンが有意に高いレベルで存在することを報告した (Kido et al, J Clin Periodontol, 1999)。このことは、カルプロテクチンは歯周病診断に有用な疾患マーカーであることを示唆するが、歯周病の病態形成におけるカルプロテクチンの役割は不明である。一方、歯肉線維芽細胞は歯周炎病巣内のサイトカインネットワークの一翼を担い、歯周病の病態形成に重要な役割を果たすことが知られる。そこで本研究では、歯周病の病態形成においてカルプロテクチンが果たす役割を調べることを目的とし、歯肉線維芽細胞における炎症関連因子の産生性に及ぼすカルプロテクチンの影響について検討した。

(4) THP-1 単球における *Porphyromonas gingivalis* (Pg) LPS 誘導サイトカイン産生に及ぼす高グルコースの影響

歯周病の病巣に棲息する歯周病細菌あるいは炎症反応によって産生されるサイトカイン等の炎症関連因子が血中に侵入し全身を巡ることで、様々な全身疾患を増悪させる。一方、糖尿病合併症は脂肪細胞とその周囲に集積したマクロファージ (Mφ) との相互作用によって産生される TNF 等、インスリン抵抗性を惹起するサイトカインによって増悪する。本研究は、歯周病由来因子が血中の単球に作用することで糖尿病合併症を増悪させる可能性を探るために実施した。

(5) THP-1 Mφにおける sIL-6R および IL-1β 産生に及ぼす高グルコースの影響

糖尿病関連歯周炎の重症化機序を探るために、歯周組織炎症を想定して THP-1 単球を Mφに分化させた後、高血糖条件下で培養し、IL-6 のアゴニスト sIL-6R の産生性を検討した。

(6) 歯肉線維芽細胞の MMP-1 産生に及ぼす高グルコースの影響

高グルコース下で培養した歯肉線維芽細胞を IL-1 や IL-6 で刺激して MMP-1 産生性を検討した。

(7) 高グルコース下のヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 誘導性 MMP-1 産生におけるカロテノイドの抑制効果

糖尿病関連歯周炎の病態には、高グルコースによる歯肉線維芽細胞の IL-6 シグナルの増強が関与する (Omori et al, J Biol Chem, 2004)。また、その治療法として抗菌薬の併用が推奨されているが、臨床的にはより有効な治療戦略の確立が望まれる。野菜や果物に含まれるカロテノイド類の多くは抗酸化作用を有し、生活習慣病の予防に効果があるとされる。本研究では、高グルコース下で培養した歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性蛋白分解酵素産生に及ぼすカロテノイド (β-カロテン、リコピンおよびレチノイン酸) の効果を検討した。

(8) 高グルコース培養下の THP-1 単球における Pg-LPS 誘導性サイトカイン産生における β-カロテンの抑制効果

高グルコース下で培養した THP-1 単球を Pg-LPS で刺激して各種サイトカイン産生性に及ぼす β-カロテンの抑制効果を検討した。

(9) ラット歯周病モデルを用いたカルシトニンの歯槽骨吸収抑制効果の検討

新規の歯周病治療薬剤を提唱するため、実験的ラット歯周病モデルを用いて、カルシトニンの歯槽骨吸収効果を検討した。

(10) 超高齢者における誤嚥性肺炎の発症と口腔関連因子の横断解析

現在、我が国は類をみない超高齢社会に突入している。超高齢者の多くは全身的な廃用（フレイル）のため介護を必要とする生活を送っており、深刻な社会問題となっている。本研究課題の主たる研究テーマは糖尿病関連歯周炎の重症化機序を探ることであるが、この研究遂行の社会的意義を高めるために、我々は、歯周病治療専門家として超高齢者の現況に着目した臨床データを蓄積し、改めて歯周病治療の重要性を提唱することが必要であると考えた。

そこで、我々は鳥取市立病院（鳥取市）と社会福祉法人小湊会鳴門シーガル病院（徳島県鳴門市）に入院中の高齢患者 1,174 名（男性：444 名，83.0±6.4 歳，女性：730 名，85.4±6.5 歳）を対象にして、誤嚥性肺炎の発症と口腔内の諸因子の統計学的関連性を検討した（横断研究）（鳥取市立病院倫理委員会承認番号 1153，鳴門シーガル病院倫理委員会承認番号 16-0001）。

4. 研究成果

(1) 歯周炎症部位における GCF 中のカルプロテクチンおよび sIL-6R レベルは、ともに健常部位と比較して有意に高かった (P<0.0001, Mann-Whitney U test)。また、GCF 中のカルプロテクチンおよび sIL-6R レベルは、ともに歯肉炎指数 (Gingival index, GI) の重症化に相応して有意に高くなった (GI:0 vs GI:2, P<0.0001, ANOVA Tukey-HSD)。このことは、GCF 中のカルプロテクチンおよび sIL-6R レベルは、ともに SPT 期の歯周病患者における歯周組織の炎症を評価するための臨床パラメータとして有用であることを示唆する。

さらに、歯周炎症の有無を評価するためのカルプロテクチンおよび sIL-6R レベルのカットオフ値を調べるために、得られたデータを ROC 解析した。

GCF 中の sIL-6R のカットオフ値は 43.5 pg/site (AUC: 0.700)，そしてカルプロテクチンのカットオフ値は 134.3 pg/site (AUC: 0.830) だった (図 1)。

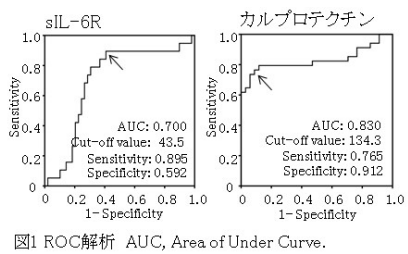


図1 ROC解析 AUC, Area of Under Curve.

以上の結果から、SPT 期の歯周病患者において、GCF 中の sIL-6R とカルプロテクチンは、新規の炎症マーカーとして歯周病診断に有用であると示唆された。

(2) Table 1 に示すように、糖尿病関連歯周炎群における随時血糖値および HbA1c 値は歯周病群と比較して有意に高い値を示したが、皮下 AGE レベルにおいては、有意差はなかった。一方、歯周炎症の状態においては、糖尿病関連歯周炎群において重症度が高い傾向が見られ、特に動揺歯の割合は有意に高かった (P=0.028, Mann-Whitney U test)。また、GCF 中の IL-1β および可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) レベルにおいては、有意差はないものの糖尿病関連歯周炎群において高い傾向が見られた。一方、GCF 中のカルプロテクチン (CPT) レベルについては、2 群間に特筆すべき有意差は見られなかった。

GCF 中の IL-1β および sIL-6R レベルに着目して、これらの炎症因子と臨床パラメータの関連性を統計学的に検討した (Table 2)。歯周病患者群においては、平均歯周

ポケット深さ (PPD) と GCF 中の IL-1β レベルは統計学的に有意な関連は見られなかったが、sIL-6R は有意な正の相関を示した (r=0.58, P=0.0001, Pearson's co-efficient)。また、興味あることに GCF 中の CPT と sIL-6R は有意な正の相関を示した (r=0.50, P=0.002, Pearson's co-efficient)。一方、各糖尿病関連パラメータと GCF 中の IL-1 および sIL-6R レベルに有意差は認められなかった。

Table 1. Comparison of several parameters between groups of periodontitis patients with or without diabetes

parameters	Periodontitis	Periodontitis with diabetes	P-value
number of subjects (M/F)	37 (16/21)	33 (19/14)	0.23
age (yr)	63.3 ± 8.4	64.9 ± 7.2	0.55
number of teeth	20.5 ± 6.0	21.1 ± 5.4	0.89
ratio of 4 mm<PPD (%)	36.1 ± 33.8	46.2 ± 35.0	0.25
ratio of mobile teeth (%)	12.2 ± 19.9	29.8 ± 32.3	0.028*
ratio of BOP positive (%)	34.8 ± 29.4	49.1 ± 31.4	0.056
number of with/without 6mm>PPD	15/22	20/13	0.094
BS (mg/dL)	125.9 ± 26.2	204.0 ± 104.9	0.0008*
HbA1c (%)	5.7 ± 0.4	7.6 ± 1.1	<0.0001*
Skin AF (AU)	2.2 ± 0.5	2.4 ± 0.9	0.34
IL-1β (pg)	31.9 ± 30.2	46.7 ± 38.1	0.083
sIL-6R levels (pg)	84.0 ± 47.6	102.0 ± 63.7	0.36
CPT levels (ng)	182.7 ± 124.7	185.6 ± 141.1	0.83

A total of 70 periodontitis patients was enrolled and divided into 2 groups: Periodontitis (N=37, 63.3±8.4 yr) and Periodontitis with diabetes (N=33, 64.9±7.2 yr) for cross-sectional study. Data were presented average ± SD. Levels of both sIL-6R and CPT in gingival crevicular fluid of deepest PPD [Average PPD (mm), group of Periodontitis: 5.5±1.4, group of Periodontitis with diabetes: 5.9±1.6] were measured using ELISA kit. *P<0.05 (chi-square test or Mann-Whitney U test). N, number of subjects; DM, diabetes; PPD, periodontal pocket depth; BOP, bleeding on probing; sIL-6R, soluble form of interleukin-6 receptor; CPT, calprotectin; Skin AF, Skin autofluorescence; BS, casual blood sugar; HbA1c, Hemoglobin A1c.

次に、糖尿病関連歯周炎患者群においては、PPD と GCF 中の IL-1β および sIL-6R レベルは統計学的に有意な正の相関を示した (IL-1β: r=0.38, P=0.030; sIL-6R: r=0.47, P=0.006, Pearson's co-efficient)。また、GCF 中の CPT と IL-1β および sIL-6R も有意な正の相関を示した (IL-1β: r=0.63, P=0.0001; sIL-6R: r=0.41, P=0.019, Pearson's co-efficient)。一方、各糖尿病関連パラメータと GCF 中の IL-1 および sIL-6R レベルの関連性を解析したところ、随時血糖値と皮下 AGE レベルについては関連性を認めなかったが、HbA1c 値については、共に有意な相関を示した (IL-1β: r=0.40, P=0.035; sIL-6R: r=0.38, P=0.040, Pearson's co-efficient)。

以上の結果から、GCF 中の IL-1β および sIL-6R レベルは、①有意差はないものの糖尿病関連歯周炎群において高い傾向が見られたこと、さらに②HbA1c 値と有意な正の相関が見られたことから、IL-1β および sIL-6R の産生亢進が糖尿病関連歯周炎患者に見られる歯周病の重症化に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。一方、皮下 AGE は糖尿病患者に蓄積する炎症増悪因子であり、様々な糖尿病合併症の疾患病態に影響を与えることが報告されている (Hu et al, Diabetes Metab Res Rev, 2015)。皮下 AGE の測定は非侵襲的に行えるので臨床的に非常に有用である。しかしながら今回の研究結果では、歯周病患者群と糖尿病関連歯周炎患者群において、皮下 AGE レベルに有意差は認められなかった (P=0.34, Mann-Whitney U test)。この結果は、AGE が糖尿病患者の歯周病重症化に影響を与えない可能性があること、そして同時に皮下 AGE 測定が糖尿病関連歯周炎の疾患マーカーにならないことを示すものであるが、今回の対象群が比較的安定した血糖コントロール状態を示したことから (HbA1c: 7.6±1.1 mg/dL)、血糖コントロールが悪い患者群に対象を拡充した上で、更なる統計学的検証が必要で

あると考えている。

Table 2. Correlation between GCF IL-1 β /sIL-6R levels and several clinical parameters

Diag.	parameters	IL-1 β		sIL-6R	
		r	P-value	r	P-value
Periodontitis	age	0.28	0.12	0.26	0.11
	PPD	0.17	0.34	0.58	0.0001**
	CPT levels	0.24	0.19	0.50	0.002**
	BS	0.09	0.65	0.14	0.43
	HbA1c	0.11	0.56	0.11	0.53
Periodontitis with DM	age	0.24	0.18	0.07	0.70
	PPD	0.38	0.030*	0.47	0.006**
	CPT levels	0.63	0.0001**	0.41	0.019*
	BS	0.17	0.38	0.20	0.29
	HbA1c	0.40	0.035*	0.38	0.040*
	Skin AF	0.22	0.30	0.23	0.28

A total of 70 periodontitis patients were enrolled and divided into 2 groups: Periodontitis (N=37, 63.3 \pm 8.4 yr) and Periodontitis with diabetes (N=33, 64.9 \pm 7.2 yr) for cross-sectional study. Correlation between GCF IL-1 β /sIL-6R levels of deepest PPD and several clinical parameters were analyzed using Pearson's correlation coefficient test. r, correlation coefficient. GCF, gingival crevicular fluid; sIL-6R, soluble form of interleukin-6 receptor; PPD, periodontal pocket depth; CPT, calprotectin; skin AF, Skin autofluorescence; BS, casual blood sugar; HbA1c, Hemoglobin A1c. *, P<0.05; **P<0.01.

(3) 歯肉線維芽細胞における炎症関連因子の産生に及ぼすカルプロテクチンの影響について得られた成果は、

- ①歯肉線維芽細胞は口腔上皮細胞に比較して、恒常的に有意に TLR4 mRNA を発現した。一方、RAGE mRNA 発現は有意に弱かった。
- ②カルプロテクチンは歯肉線維芽細胞の IL-6 および MCP-1 産生を誘導した。また、カルプロテクチン誘導性 IL-6 および MCP-1 産生は、TLR4 (細胞表層)、MAPKs および NF- κ B (細胞質内) の阻害によって有意に抑制された。
- ③TLR4 siRNA を遺伝子導入した細胞では、陰性対照と比較して、カルプロテクチンによる p38MAPK, JNK, ERK および I κ B のリン酸化が抑制された。また TLR4 siRNA を遺伝子導入した細胞では、陰性対照と比較してカルプロテクチンによる MCP-1 及び IL-6 の産生が有意に抑制された。

これらの研究成果から、カルプロテクチンは、TLR4 を介してヒト歯肉線維芽細胞の MAPK および NF- κ B 経路を活性化し、MCP-1 と IL-6 の産生を亢進することが示唆された。MCP-1 はマクロファージ等の炎症細胞の遊走能を惹起して炎症病巣への炎症細胞浸潤を促進する作用を有する。また、IL-6 は血管浸潤作用や骨吸収促進作用を有するので、歯周病の重症化を促進する機能を持つことが知られる。すなわちカルプロテクチンによる炎症性サイトカインの産生誘導は、歯周病の重症化をきたす細胞生物学的機序の一翼を担う可能性があると考えられる。

(4) 歯周病細菌 Pg 由来 LPS は、NF- κ B 系を介して高血糖条件下で培養した THP-1 単球の TNF 産生を有意に亢進することを見出した (図 2)。さらに、この知見に加えて IL-6 や MCP-1 産生も誘導されることを示した。本研究は、糖尿病患者における歯周病組織由来のマイクロインフラメーションの細胞学的機序の一端を明らかにした。

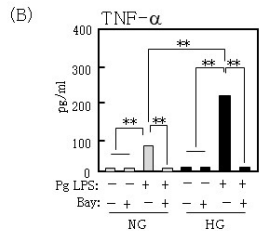
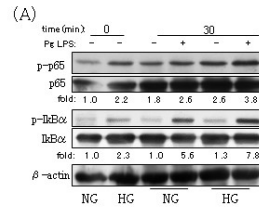


図2 Pg LPS 誘導性 TNF 産生における高血糖の影響

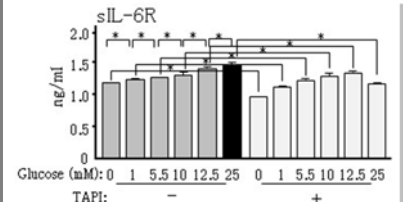


図3 sIL-6R 産生におけるグルコースの影響

(5) sIL-6R は作用を有する分子である (Naruishi et al, J Dent Res, 2001)。図 3 に示すように、THP-1 M ϕ はグルコース濃度依存性に sIL-6R 産生を有意に誘導した。

さらに興味あることに、高グルコース条件下 (25 mM グルコース) で THP-1 M ϕ を培養すると、同じ浸透圧条件となるようにマンニトールで調整した培養系と比較して IL-1 β の産生が有意に亢進することが分かった。このことは、グルコースが THP-1 M ϕ に作用することで未だ解明されない経路が活性化することで、IL-1 β の産生が亢進するものと考えられる。この詳細な機序の解明については、将来の新たな研究が必須である。

(6) 高グルコース下で培養した歯肉線維芽細胞を IL-1 や IL-6 で刺激すると、タンパク分解酵素 MMP-1 の産生が有意に亢進した (図 4)。

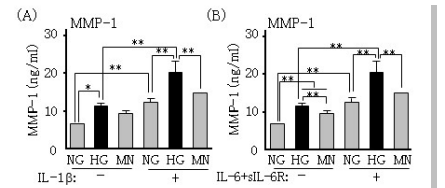


図4 IL-1 および IL-6/sIL-6R 誘導性 MMP-1 産生における高グルコースの影響

また、この MMP-1 誘導は NF- κ B 系あるいは MAPK 系によって制御されることも分かった。IL-1 は歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を劇的に誘導することから (Sawada et al, Biomed Res, 2013), IL-1 を基点とした IL-6 シグナルの惹起による歯周組織破壊が糖尿病関連歯周炎の重症化機序の一翼を担う可能性が示唆された。

以上のことより、高グルコースによる M ϕ の IL-1 および sIL-6R 産生に誘導を基点とした M ϕ ・線維芽細胞のクロストークが、糖尿病患者における歯周病重症化機序の一翼を担っていると考えられる (図 5)。

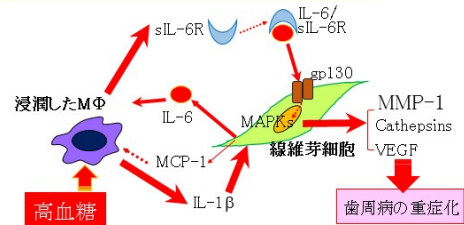


図5 糖尿病関連歯周炎の重症化機序における線維芽細胞-マクロファージのクロストーク

- (7) ヒト歯肉線維芽細胞において、
- ①高グルコース培養条件下で IL-6+sIL-6R 誘導性 MMP-1 およびカテプシン L 産生が有意に亢進された。
 - ② β -カロテン、レチノイン酸により、IL-6+sIL-6R 誘導性

MMP-1 およびカテプシン L 産生が有意に抑制された。

以上の結果から、β-カロテンとレチノイン酸は、高血糖条件下でのヒト歯肉線維芽細胞のIL-6による蛋白分解酵素の産生を抑制して、糖尿病関連歯周炎の進行を緩和する可能性が示唆された。

(8) 前述の通り、歯周病細菌 Pg 由来 LPS は、NF-κB 系を介して高血糖条件下で培養した THP-1 単球の TNF、IL-6 および MCP-1 の産生を有意に亢進することを見出した (図 2 参照)。さらに、この実験系に β-カロテンを添加すると、NF-κB 系の抑制に相応して、それらサイトカイン産生は有意に抑制された。

以上の研究成果は、カロテノイドの摂取が糖尿病関連疾患の重症化緩和に貢献し得る可能性を示唆するものである (図 6)。

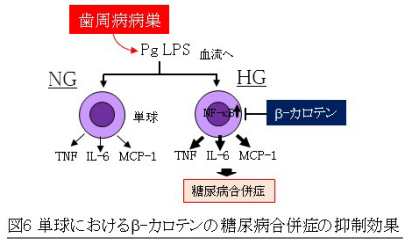


図6 単球におけるβ-カロテンの糖尿病合併症の抑制効果

この新規治療概念の是非については、高い水準の臨床研究を含む将来の綿密な研究遂行によって明らかになるものと期待する。

(9) 実験的ラット歯周病モデルを用いて、カルシトニンの歯槽骨吸収効果を検討したところ、カルシトニンの添加によって歯槽骨吸収を有意に抑制することが分かった (図 7)。また、カルシトニンは破骨細胞の活性化を抑制することも示した。

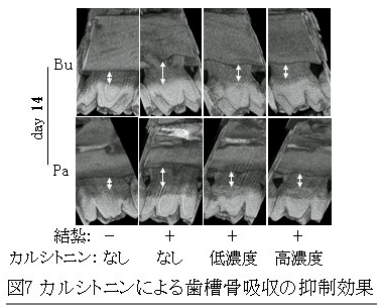


図7 カルシトニンによる歯槽骨吸収の抑制効果

本研究結果は、カルシトニンは歯周病の治療薬として有効であり、将来の創薬技術の発展に伴う新たな歯周病治療戦略の確立に貢献し得るかもしれない。

(10) Table 3 に示すように、誤嚥性肺炎の発症の有無と関連する因子を横断解析すると、その発症に関連する全身的因子として知られる脳血管障害はオッズ比 2.99、認知機能の減弱は 3.70 であった。

Factors	Odds ratio	95% CI	p-value
Loss of posterior occlusion	4.50	3.4 ~ 5.9	<0.0001*
Opened lips at all time	5.57	4.0 ~ 7.8	<0.0001*
Unfunctional tongue movement	4.02	3.0 ~ 5.4	<0.0001*
Remaining teeth	1.11	0.85 ~ 1.5	0.43
Presence of mobile teeth	1.09	0.76 ~ 1.5	0.64
Presence of cerebrovascular disease	2.99	2.3 ~ 3.9	<0.0001*
Presence of cerebrovascular disease +Loss of posterior occlusion	5.38	3.9 ~ 7.5	<0.0001*
Presence of cognitive impairment	3.70	2.7 ~ 5.0	<0.0001*
Presence of cognitive impairment +Presence of cerebrovascular disease	3.86	2.9 ~ 5.1	<0.0001*
Presence of cognitive impairment +Loss of posterior occlusion	5.16	3.9 ~ 7.5	<0.0001*
Presence of cognitive impairment +Presence of cerebrovascular disease +Loss of posterior occlusion	6.17	4.3 ~ 8.9	<0.0001*
Impairment of swallowing function	2.98	1.6 ~ 5.5	0.0003*

N=1,179. Swallowing function was examined by video-endoscopic evaluation of swallowing (VE) test (N=196). p-value, chi-square test.

一方、口腔内の諸因子との関連を調べてみると、臼歯咬合の喪失はオッズ比 4.50、常時開口はオッズ比 5.57、そして舌運動障害はオッズ比 4.02 を示し、これまで知られていた全身的機能障害よりも誤嚥性肺炎の発症に高い関連性を示すことが分かった。さらに、脳血管障害、認知機能の減弱および臼歯咬合の喪失の重複によって、

さらに高いオッズ比 6.17 を示したことから、これら因子は独立した因子である可能性が示唆された。

一般的に、臼歯咬合の喪失は歯周病が主な原因であると言われる。臼歯咬合の喪失は顎顔面関連筋群の虚弱を助長することから、結果的に摂食嚥下機能の低下を招き、誤嚥性肺炎発症の遠因になるものと推察される。すなわち、本研究結果は、超高齢世代になった後でも臼歯咬合を維持しておく (臼歯を抜歯しない) ために、我々自身、患者の将来を見据えて、中・壮年期において歯周病治療・予防に真摯に取り組むことの重要性を改めて意識させるものであった。

我が国の糖尿病予備軍を含めた糖尿病患者数は約 2,000 万人と推計され (平成 24 年厚労省統計より)、糖尿病は「国民を悩ます」疾患として広く認知されている。一方、歯周病は糖尿病の合併症の一つである。古くから糖尿病患者の歯周病は重症化することが知られるが (糖尿病関連歯周炎)、その病態機序は不明であった。

本研究結果から、歯周炎症巣に浸潤した好中球が産生するカルプロテクチンが歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を誘導するという環境下に、さらに高血糖によって誘導されるマクロファージの IL-1β および sIL-6R 分泌亢進という現象が相まって起こる“重複した炎症反応”が糖尿病関連歯周炎の重症化に関与する可能性が示唆された。我々はこれらの病態機序を基盤にして、糖尿病関連歯周炎に対する新たな診断技術の確立および治療戦略の提唱に貢献できるものと考えている。

今後、当該研究領域のエビデンスが益々蓄積されて更なる発展を遂げることで、将来、本疾患によって悩まされる患者が減少すること、ひいては国民の健康寿命の延伸に繋がることを期待する。

謝辞 本研究の遂行にあたり、終始、ご助言をいただいた徳島大学木戸淳一准教授ならびに梶浦由加里先生に心より感謝申し上げます。また、様々な局面でサポートいただいた徳島大学大学院医歯薬研究部歯周歯内治療学分野の諸先生方に感謝申し上げます。

<引用文献>

- ① Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M, Nagata T. Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 26(10):653-657, 1999.
- ② Naruishi K, Takashiba S, Nishimura F, Chou HH, Arai H, Yamada H, Murayama Y. Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6R. *J Dent Res.* 80(5):1421-1424, 2001.
- ③ Omori K, Naruishi K, Nishimura F, Yamada-Naruishi H, Takashiba S. High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J Biol Chem.* 20;279(8):6643-6649, 2004.
- ④ Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1β and IL-6. *Biomed Res.* 34(1):31-40, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Naruishi K, Nishikawa Y, Kido JI, Fukunaga A, Nagata T. Relationship of aspiration pneumonia to cognitive impairment and oral condition: a cross-sectional study. *Clin Oral Investig.* 2018. *in press.* doi: 10.1007/s00784-018-

- 2356-7. (査読有り)
- ② Naruishi K, Nagata T. Biological effects of interleukin-6 on gingival fibroblasts: cytokine regulation in periodontitis. *J Cell Physiol*. 233(9):6393-6400, 2018. doi: 10.1002/jcp.26521 (査読有)
 - ③ Kajiura Y, Nishikawa Y, Lew JH, Kido JI, Nagata T, Naruishi K. β -carotene suppresses *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-mediated cytokine production in THP-1 monocytes cultured with high glucose condition. *Cell Biol Int*. 42(1):105-111, 2018. doi: 10.1002/cbin.10873. (査読有)
 - ④ Wada-Mihara C, Seto H, Ohba H, Tokunaga K, Kido JI, Nagata T, Naruishi K. Local administration of calcitonin inhibits alveolar bone loss in an experimental periodontitis in rats. *Biomed Pharmacother*. 97:765-770, 2018. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.165. (査読有)
 - ⑤ Kajiura Y, Lew JH, Ikuta T, Nishikawa Y, Kido JI, Nagata T, Naruishi K. Clinical significance of GCF sIL-6R and calprotectin to evaluate the periodontal inflammation. *Ann Clin Biochem*. 54(6):664-670, 2017. doi: 10.1177/0004563216680232. (査読有)
 - ⑥ Nishikawa Y, Kajiura Y, Lew JH, Kido JI, Nagata T, Naruishi K. Calprotectin induces IL-6 and MCP-1 production via toll-like receptor 4 signaling in human gingival fibroblasts. *J Cell Physiol*. 232(7):1862-1871, 2017. doi: 10.1002/jcp.25724. (査読有)
 - ⑦ Naruishi K, Oishi K, Inagaki Y, Horibe M, Bando M, Ninomiya M, Kawahara K, Minakuchi J, Kawashima S, Shima K, Kido J, Nagata T. Association between periodontal condition and kidney dysfunction in Japanese adults: A cross-sectional study. *Clin Exp Dent Res*. 2(3):200-207, 2016. doi: 10.1002/cre2.39 (査読有)
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 木目隆大, 内部健太, 池亀美華, 吉田賀弥, 岡村裕彦 ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd3 は転写調節因子 Runx2 と Osterix を介して骨芽細胞分化を制御する 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2017 年
 - ② 坂本英次郎, 稲垣裕司, 木戸淳一, 高木亮輔, 成石浩司, 永田俊彦 最終糖化産物と LPS は MAPK および NF- κ B を介してマウス骨細胞のスクレロチンの発現を調節する 第 60 回春期日本歯周病学会学術大会, 2017 年
 - ③ Sakamoto E, Takagi R, Inagaki Y, Naruishi K, Kido J, Nagata T. AGE and *Porphyromonas gingivalis*-LPS increase sclerostin expression in osteocytes, 95th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition, 2017.
 - ④ 坂本英次郎, 稲垣裕司, 木戸淳一, 高木亮輔, 生田貴久, 成石浩司, 永田俊彦 マウス骨細胞株 MLO-Y4-A2 のスクレロチン発現における最終糖化産物および LPS の影響 第 145 回日本歯科保存学会春期学術大会, 2016 年
 - ⑤ Nishikawa Y, Naruishi K, Kajiura Y, Lew JH, Kido J, Nagata T. Calprotectin induces the expression of inflammation-related molecules in gingival fibroblasts, 94th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition. 6/23/2016.
 - ⑥ Lew JH, Naruishi K, Kajiura Y, Nishikawa Y, Kido J, Nagata T. High glucose enhances IL-6-induced protease productions in gingival fibroblasts, 94th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition, 6/23/2016.
 - ⑦ Kajiura Y, Naruishi K, Nakajima Y, Nishikawa Y, Lew JH, Kido J, Nagata T. High glucose enhances *P. gingivalis*-induced cytokine production in THP-1 monocytes, 94th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition. 6/23/2016.
 - ⑧ Lew JH, Naruishi K, Kajiura Y, Ikuta T, Nishikawa Y, Kido J, Nagata T. Periodontal evaluation using sIL-6R/calprotectin in GCF during SPT phase. The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, 9/10/2016.
 - ⑨ 廣島佑香, 木戸淳一, 坂本英次郎, 阿部佳織, 吉田賀弥, 永田俊彦, 篠原康雄 最終糖化産物はヒト歯肉上皮細胞における S100A8 および S100A9 発現を上昇する 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2016 年
 - ⑩ 板東美香, 梶浦由加里, 野中康平, 坂本英次郎, 成石浩司, 木戸淳一, 永田俊彦 最終糖化産物はヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 および ICAM1 の発現を増加する 第 59 回日本歯周病学会秋期学術大会, 2016 年
 - ⑪ 西川泰史, 成石浩司, 梶浦由加里, Lew Jung Hwan, 木戸淳一, 永田俊彦 カルプロテクチンはヒト歯肉線維芽細胞の TLR4 を介して炎症性関連因子の発現を亢進する 第 144 回日本歯科保存学会春期学術大会, 2016 年
 - ⑫ 岡村裕彦, 吉田賀弥, 内部健太, 池亀美華 骨芽細胞の分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A Ca の役割とその標的因子 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年
 - ⑬ Lew Jung Hwan, 成石浩司, 梶浦由加里, 西川泰史, 木戸淳一, 永田俊彦 カロテノイドは高グルコース下で培養したヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 誘導性蛋白分解酵素産生を抑制する 第 59 回日本歯周病学会春期学術大会, 2016 年
 - ⑭ 木戸淳一, 板東美香, 中島由紀子, 梶浦由加里, 稲垣裕司, 生田貴久, 坂本英次郎, 成石浩司, 永田俊彦 ヒト口腔上皮細胞と歯肉線維芽細胞において低酸素環境が誘導する遺伝子発現の比較 第 143 回日本歯科保存学会秋期学術大会, 2015 年
 - ⑮ 吉岡正太郎, 宮本健志, 成石浩司, 北里慶, 多田恵曜, 八木謙次, 桑山一行, 里見淳一郎, 永田俊彦, 原田雅史, 永廣信治 歯周病の重症度および原因菌は脳動脈瘤の発生および破裂に関連する 第 74 回日本脳神経外科学会学術大会, 2015 年
 - ⑯ 梶浦由加里, 木戸淳一, 中島由紀子, 板東美香, 稲垣裕司, 成石浩司, 坂本英次郎, 阿部佳織, 廣島佑香, 永田俊彦 低酸素環境が誘導するヒト口腔上皮細胞における遺伝子発現の解析 第 58 回日本歯周病学会秋期学術大会, 2015 年
 - ⑰ 坂本英次郎, 木戸淳一, 梶浦由加里, 板東美香, 稲垣裕司, 成石浩司, 生田貴久, 永田俊彦 最終糖化産物はヒト口腔上皮細胞の遺伝子発現を調節する 第 58 回日本歯周病学会秋期学術大会, 2015 年
 - ⑱ 岡村裕彦, 吉田賀弥, 寺町順平 骨芽細胞と脂肪細胞の分化におけるプロテインホスファターゼ PP2A Ca の役割 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年
 - ⑲ 吉田賀弥, 岡村裕彦 PKR は骨芽細胞において *Porphyromonas gingivalis* が誘導する NLRP3 発現を NF- κ B 経路を介して制御する 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年
 - ⑳ 西川泰史, 成石浩司, 梶浦由加里, 板東美香, 木戸淳一, 永田俊彦 カルプロテクチンはヒト歯肉線維芽細胞の炎症関連因子の発現に及ぼす影響 第 58 回日本歯周病学会春期学術大会, 2015 年
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
永田 俊彦 (NAGATA, Toshihiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学系)・名誉教授
研究者番号: 10127847
 - (2) 研究分担者
成石 浩司 (NARUISHI, Koji)
徳島大学・病院・講師
研究者番号: 00346446
吉田 賀弥 (YOSHIDA, Kaya)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号: 60363157