

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06451

研究課題名(和文) 糖尿病関連歯周炎におけるS100A8の生理的役割と作用機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism of S100A8 in diabetes-associated periodontitis

研究代表者

廣島 佑香 (HIROSHIMA, Yuka)

徳島大学・先端酵素学研究所(プロテオ)・特任助教

研究者番号：60545143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病関連歯周炎では歯周組織における最終糖化産物(AGEs)の蓄積により炎症や組織破壊が促進し、病態が重症化する場合がある。しかしその詳細なメカニズムは解明されていない。本研究では、ヒト歯肉上皮細胞において、糖尿病関連歯周炎に関連する病原因子(AGEとPgLPS)がカルプロテクチン(S100A8とS100A9のヘテロ二量体)の発現に及ぼす影響とその発現調節機構について検討を行った。その結果、AGEやPgLPSは、MAPKやNF- $\kappa$ Bのシグナル伝達経路を介してヒト歯肉上皮細胞のカルプロテクチン発現を誘導し、糖尿病関連歯周炎の病態や生体防御反応に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end-products (AGEs) in gingival tissues of diabetes patients aggravate periodontal disease, but the mechanisms are unknown. The aim of this study is to investigate effects of AGE and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide (PgLPS) on calprotectin (S100A8/S100A9) expression in human gingival epithelial cells. Results demonstrate that AGE acts in synergy with PgLPS to increase S100A8 and S100A9 expression through the p38, JNK MAPK, and NF- $\kappa$ B and modulate localization of S100A8 and S100A9 in gingival epithelial cells. Calprotectin may be involved in the pathogenesis of diabetes-associated periodontitis.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：終末糖化産物 歯周病 カルプロテクチン

1. 研究開始当初の背景

ヒト S100A8 は生体内で S100A9 とヘテロ二量体 (S100A8/S100A9, 別名カルプロテクチン) を形成して発現しており、その発現は歯周病を含む様々な炎症性疾患と関連している。これまでにカルプロテクチンは歯周炎罹患部位の歯肉溝滲出液中で増加していることが報告されている。また、申請者はカルプロテクチンがヒト歯肉上皮細胞で恒常的に発現することを報告しており、さらにカルプロテクチンは抗菌ペプチドや DAMPs (傷害関連分子パターン) の一つとして自然免疫や自然炎症に関与しており、口腔内の感染防御に重要な役割を果たしている。

歯周病は糖尿病の合併症の一つであり、糖尿病患者では歯周病の罹患率が高く、その病態が悪化しやすいことが知られている (糖尿病関連歯周炎)。糖尿病関連歯周炎の病態においては、歯周組織への最終糖化産物 (Advanced glycation end-products: AGEs) の蓄積により炎症や組織破壊が促進し、歯周炎の病態が重症化することなどがこれまでに報告されている。加えて、歯周病原細菌のリポ多糖 (LPS) が Toll-like receptor (TLR) を介して炎症性反応を誘導することで、炎症の持続や組織修復の傷害が生じ重篤化をもたらしている。歯肉上皮は歯周病原性細菌と宿主が最初に接する部位でありながら歯肉上皮に着目して糖尿病関連歯周炎の病態について調べた報告はほとんどない。そこで本研究では、歯肉上皮細胞で恒常的に発現しているカルプロテクチン (S100A8/S100A9) に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病関連歯周炎に関連する病原因子がヒト歯肉上皮細胞におけるカルプロテクチン (S100A8/A100A9) 発現に及ぼす影響とその作用機構について検討を行った。歯肉上皮におけるカルプロテクチンの発現変化を検討することにより、糖尿病関連歯周炎の病態について新たな見解を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養:

不死化したヒト歯肉上皮細胞株 (OBA-9 細胞) を bovine pituitary extract (BPE) と epidermal growth factor (EGF) を含んだ keratinocyte-SFM 培地を用い、5%CO<sub>2</sub> 存在下、37 にて培養した。サブコンフルエントに達した後、\*AGE (500 µg/ml) と \*\*PgLPS (1 µg/ml) を細胞に添加し、実験に供した。なお、添加前には BPE と EGF を含まない培地で 3 時間培養した。

\*AGE は BSA と glyceraldehyde の混合による Takeuchi らの方法 (Mol Med, 2000) により作製

\*\*PgLPS は *Porphyromonas gingivalis* 由来の Lipopolysaccharide

(2) 遺伝子発現分析:

OBA-9 細胞に AGE (500 µg/ml) と PgLPS (1 µg/ml) を添加し、6、12、24 および 48 時間培養した。培養後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から通法に従い cDNA を作製した後、S100A8 と S100A9 のプライマーを用いて real-time PCR 法にて遺伝子発現レベルを解析した。

(3) ELISA 法:

培養した細胞およびその上清中のカルプロテクチンの蛋白量を ELSIA キットにて測定した。

(4) 細胞免疫染色:

OBA-9 細胞に AGE (500 µg/ml) と PgLPS (1 µg/ml) を添加し、24 時間培養を行った。その後、細胞を固定し、抗 S100A8 抗体、抗 S100A9 抗体および抗カルプロテクチン抗体を用いて免疫染色を行った。

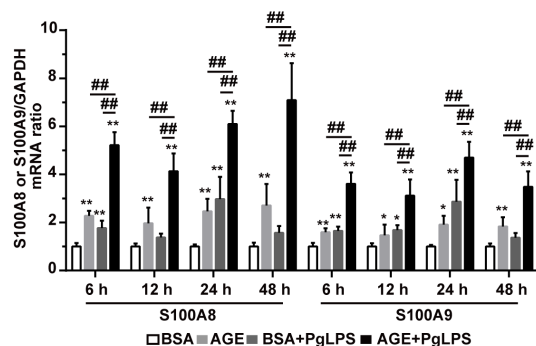
(5) AGE および PgLPS により活性化されたシグナル伝達経路の解析:

AGE および PgLPS はそれぞれ receptor for AGE (RAGE) および TLR2 を介して細胞内シグナル伝達を行うことが知られている。AGE および PgLPS による S100A8 および S100A9 の発現増加が RAGE および TLR2 を介しているか、siRNA を用いて検討した。

さらに細胞内シグナル伝達機構を確認するため、MAPK および NF-κB シグナル伝達経路に着目し、U0126 (MEK inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor), SP600125 (JNK MAPK inhibitor) および BAY11-7082 (NF-κB inhibitor) を細胞に 1 時間前処理した後、AGE および PgLPS を添加し、S100A8 および S100A9 の遺伝子発現を解析した。

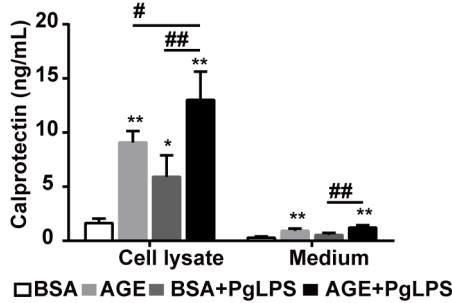
4. 研究成果

(1) カルプロテクチン (S100A8/S100A9) に及ぼす AGE および PgLPS の影響: ヒト歯肉上皮細胞 (OBA-9 細胞) において、S100A8 および S100A9 遺伝子発現は AGE と PgLPS の共存下で増強した (図 1)。



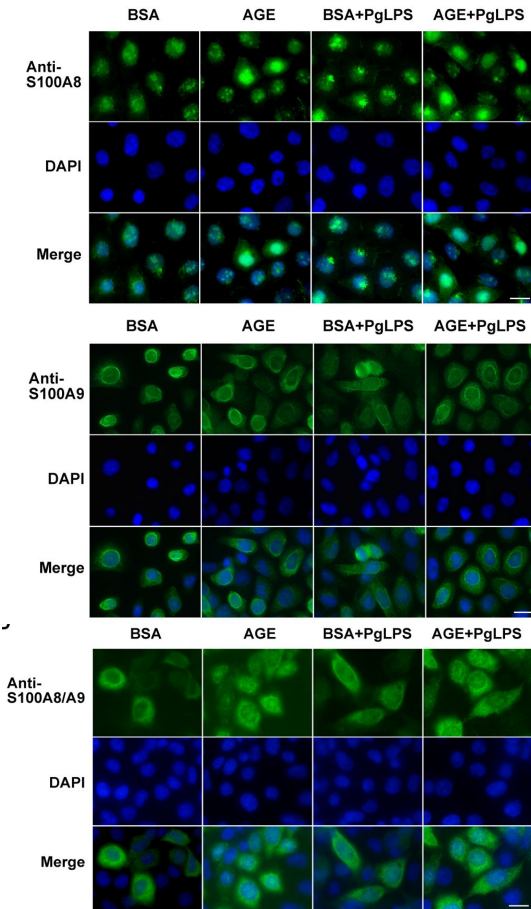
【図 1】AGE と PgLPS が S100A8 および S100A9 遺伝子発現に及ぼす影響

また、カルプロテクチン蛋白発現においても AGE と PgLPS の共存下で発現が増加した ( 図 2 )。



【 図 2 】 AGE と PgLPS がカルプロテクチン蛋白発現に及ぼす影響

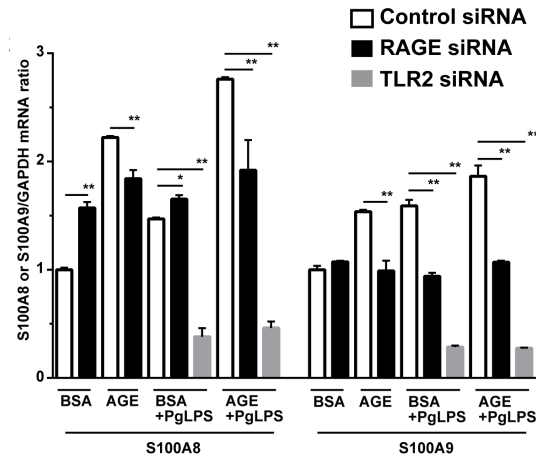
( 2 ) ヒト歯肉上皮細胞における S100A8, S100A9 およびカルプロテクチン蛋白の局在 : S100A8 は BSA 存在下では細胞核に局在しており、AGE および PgLPS の共存下では細胞核と細胞質でその発現が観察された。S100A9 は細胞質に局在しており、AGE および PgLPS 刺激による局在の変化は観察されなかった。カルプロテクチンは BSA 存在下では細胞質に局在しているが、AGE および PgLPS の刺激により細胞質と細胞核にもその発現が認められた ( 図 3 )。



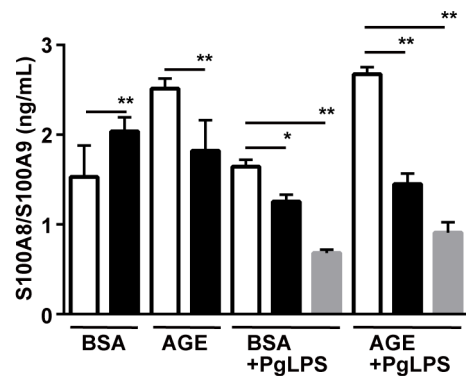
【 図 3 】 ヒト歯肉上皮細胞における S100A8, S100A9 およびカルプロテクチン蛋白の局在

( 3 ) AGE および PgLPS により活性化されたシグナル伝達経路の解析 :

AGE は RAGE を、PgLPS は TLR2 を介して細胞シグナル伝達を行うことが知られている。AGE および PgLPS による S100A8 および S100A9 発現の増加がこれらのレセプターを介して誘導されているかどうか、siRNA を用いて検討をおこなった。その結果、AGE および PgLPS による S100A8 および S100A9 遺伝子発現とカルプロテクチン蛋白の増加は RAGE および TLR2 を介した経路であることが示唆された ( 図 4 , 5 )。

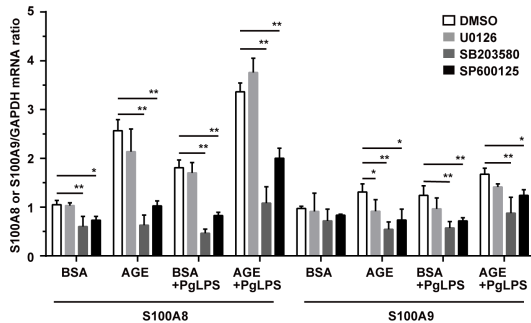


【 図 4 】 S100A8、S100A9 遺伝子発現に及ぼす RAGE および TLR2 ノックダウンの影響

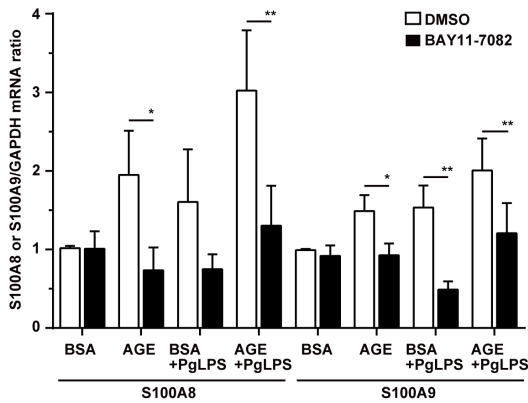


【 図 5 】 カルプロテクチン蛋白発現に及ぼす RAGE および TLR2 ノックダウンの影響

さらに、細胞内シグナル伝達経路を検討するために、MAPK および NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に着目した。その結果、p38 と JNK の阻害剤は AGE および PgLPS の共存下で増加した S100A8 および S100A9 遺伝子発現を抑制したが、MEK 阻害剤は発現に影響を及ぼさなかった ( 図 6 )。また、NF- $\kappa$ B 阻害剤は AGE および PgLPS の共存下で増加した S100A8 および S100A9 遺伝子発現を抑制した ( 図 7 )。

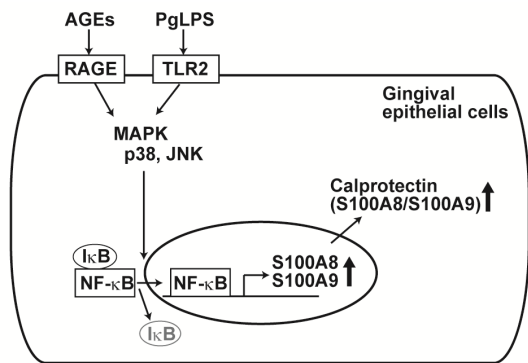


【図 6】 S100A8 および S100A9 遺伝子発現増加における MAPK の関与



【図 7】 S100A8 および S100A9 遺伝子発現増加における NF-κB の関与

<まとめ>



これらの結果から、AGE や PgLPS は MAPK や NF-κB のシグナル伝達経路を介してヒト歯肉上皮細胞におけるカルプロテクチン (S100A8/S100A9) 発現を誘導することが示唆された。糖尿病関連歯周炎の病態においてカルプロテクチンが関与していることから、カルプロテクチンの持つ上皮細胞への歯周病原性細菌の接着・侵入抑制 (抗菌作用) や抗炎症作用により、歯周組織における炎症の増悪を抑制し、生体恒常性を維持している可能性が考えられる。さらにヒト歯肉上皮細胞におけるカルプロテクチンの詳細な役割を解明することにより、糖尿病関連歯周炎に対する歯周治療における新たなターゲット因子になるとと思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2件)

Hiroshima Y, Sakamoto E, Abe K, Yoshida K, Naruishi K, Nagata T, Shinohara Y, Geczy CL, Kido J.

Advanced glycation end products increase calprotectin in human gingival epithelial cells.

95<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, March 23, 2017 (San Francisco, USA)

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 月 7 日 (朱鷺メッセ, 新潟県・新潟市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

廣島 佑香 (HIROSHIMA, Yuka)  
徳島大学・先端酵素学研究所 (プロテオ)・  
特任助教  
研究者番号: 6 0 5 4 5 1 4 3