

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11389

研究課題名(和文) 歯肉上皮細胞機能制御による歯周病原細菌全身移行への抑制効果の検討

研究課題名(英文) Regulation of gingival epithelial cell's function suppresses systemic infection of periodontal pathogen.

研究代表者

藤田 剛 (Tsuyoshi, Fujita)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・准教授

研究者番号：80379883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者における歯周病の制御は、両疾患のコントロールにおいて重要である。グリチルリチンはHMGB1阻害効果を持ち、抗炎症作用を示す。本研究では、糖尿病マウスに、絹糸結紮及び *Porphyromonas gulae* 塗布によって誘発した歯周炎に対するグリチルリチンの効果を検討した。グリチルリチンの口腔内塗布は、絹糸結紮及び *P. gulae* 感染による歯周組織の炎症を抑制することによって、血中の炎症性サイトカインの制御を行い、その結果、血糖値が改善することが明らかとなった。さらに、この経路には、HMGB1-RAGEが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is deeply associated with diabetes mellitus (DM) in both directions. Glycyrrhizin has an anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB1. Regulation of periodontal inflammation in DM patients may contribute to control both diseases. In this study, we examined the effects of oral treatment with glycyrrhizin on the inflammation and serum glucose levels using ligature-induced inflammation with *P. gulae*-infection on high fat diet-induced diabetic mice. Topical treatment of glycyrrhizin down-regulated gingival inflammation and the increased glucose levels in serum induced by the combination of ligature and *P. gulae* infection in diabetic mice. In conclusion, glycyrrhizin down-regulates inflammatory responses in gingival tissue and improve glucose levels by suppressing the circulating cytokine levels.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 糖尿病 *Porphyromonas gulae* サイトカイン HMGB1 RAGE 血糖値 マウス

1. 研究開始当初の背景

国民の健康意識の高まりとともに高齢者の残存歯数は年々増加している。しかしながら、歯周病に罹患した歯が増加することにも繋がっている。ブラッシングによる細菌バイオフィルム(プラーク)の除去は歯周病予防に有効であるが、身体的・精神的理由から高齢者には困難になることも多い。したがって、歯周病予防に対する新たな戦略が求められている。歯周病の予防法としては、寄生体である歯周病原細菌をターゲットとする方法と宿主機能を制御する方法の2つが考えられる。歯周病原細菌をコントロールすることは極めて重要であるが、多種多様な細菌から構成される口腔内細菌叢の中で歯周病原細菌だけをターゲットとする予防法の確立は困難である。歯周病の成立には上皮細胞が重要な役割を果たしていることから、これまでに歯肉上皮細胞の機能を制御する新しい概念の歯周病予防法に関する基礎的研究が報告されている。

一方で、近年、歯周病と全身疾患に関する研究が注目されている。歯周病は糖尿病を始め、早産・低体重児出産、心血管障害、関節リウマチなどの進行・増悪など疾患の重症化に関与し、全身の健康に及ぼす影響が次々に解明されている。原因として、歯周病原細菌の血管を介した全身移行と炎症歯周組織で産生されたサイトカインの全身移行が考えられている。さらに多くの臨床研究によって、歯周病治療が各種全身疾患の病態を改善することも報告されている。その中でも糖尿病と歯周病は、双方向の関係がある。糖尿病は、宿主の易感染性を引き起こし歯周炎の進行・重症化に関与する。一方、歯周炎は血中の炎症性サイトカインを上昇させインスリン抵抗性を惹起し糖尿病を増悪させる。従って、糖尿病患者における歯周組織の炎症制御は両疾患のコントロールに重要である。

これまでに、歯周炎はHigh mobility group

box 1(HMGB1)の発現を歯周局所で上昇させること、糖尿病患者においては最終糖化産物の受容体である receptor of advanced glycation end-products (RAGE) が増加することが報告されている。また、HMGB1はRAGEに結合し、炎症性サイトカイン産生を誘導する。これらのことから、両疾患の相乗的な進行にはHMGB1-RAGE axisの関与が考えられる。グリチルリチンは漢方薬である甘草に含まれ、HMGB1阻害作用による抗炎症作用を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、炎症歯周組織における血管と歯周病原細菌に着目し、歯周病原細菌が全身移行するメカニズム、その制御方法及び全身疾患に及ぼす効果を明らかにし、上皮細胞の機能制御による歯周病予防が、全身疾患の重症化予防、つまりは健康増進に寄与することを証明する。以上のことから、グリチルリチンのHMGB1阻害作用が歯周組織及び全身の炎症を制御し、並びに血糖値を改善する可能性について検討した。

3. 研究の方法

1) 糖尿病モデルマウスの作成

KK/TaJclマウスに高脂肪食であるHFD32を7週間給餌し糖尿病モデルマウスを作製した。

2) 糖尿病マウスにおける歯周炎の誘発

作製した糖尿病モデルマウスに、上顎左側第2臼歯に対する5-0絹糸の結紮及び動物の歯周病原細菌である *Porphyromonas gulae* の感染によって歯周病を誘導した。*P.gulae* の感染は *P.gulae* を 1×10^8 CFU の密度で 2% carboxymethyl cellulose に懸濁したものを綿球に浸漬させ口腔内に留置し行った。*P.gulae* 綿球の留置は結紮当日から2週間、毎週2回ずつおこない、これを歯周病糖尿病

モデルマウスとした。対照群として非処置群を用いた。歯周病の評価は2週間後の *P. gulae* に対する血清抗体価，及びマイクロ CT による骨吸収像，歯周組織の病理組織標本で行った。

3) グリチルリチン口腔塗布

歯周病糖尿病モデルマウスに対するグリチルリチンの影響を検討するため，グリチルリチンを 1% の濃度で hydroxiethyl cellulose (HEC) 3%ゲルに溶解し口腔内塗布した。塗布は，結紮と *P. gulae* 感染による歯周病誘導処置開始時から屠殺まで毎日行なった。非処置の DM モデルマウス群，歯周病 DMモデルマウスの HECゲルまたはグリチルリチン投与群の 3 群を作製し，2 週間後に屠殺した。

4) 炎症性関連因子の評価

炎症関連因子の評価を行うため，歯肉の total RNA ならびに血清を回収し，tumor necrosis factor (TNF) - α ，interleukin (IL) -1 β ，IL-6，RAGE 及び HMGB1 の mRNA 発現を real-time PCR で評価した。また，血清中の TNF- α ，IL-6，C-reactive protein (CRP)，Serum Amyloid A (SAA)，RAGE 及び HMGB1 の量を ELISA 法によって測定した。

5) 糖尿病の評価

4 週間飼育した歯周病 DM モデルマウスの 8 時間空腹時血糖を測定した。さらに，HMGB1 阻害が血糖値に与える影響を評価するため，4 週間飼育した群に抗 HMGB1 中和抗体 50 μ g を静脈内投与し 8 時間空腹時血糖の測定を行った。

4. 研究成果

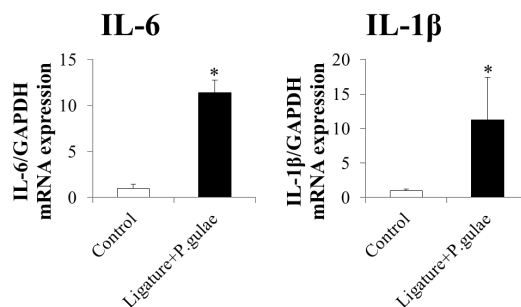
1) 糖尿病モデルマウスの作成

KK/TaJcl マウスに HFD32 を給餌することによ

って，体重および空腹値血糖値の上昇を確認した。今後，このマウスを糖尿病モデルマウスとして，実験に供した。

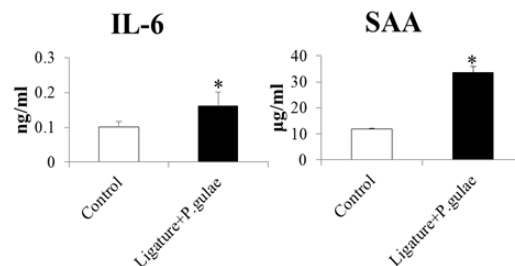
2) 糖尿病マウスにおける歯周炎の誘発

糖尿病モデルマウスに絹糸結紮及び *P. gulae* 塗布を行うことで，歯周炎を誘発した。歯周組織における IL-6，IL-1 β ，TNF- α などの炎症性サイトカイン mRNA が上昇した（図 1）。

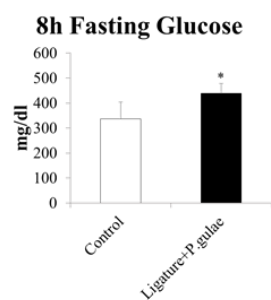


また，血中のサイトカインや SAA の上昇が認められた（図 2）。さらに，同時に血糖値の上昇も確認した（図 3）。

（図 2）



（図 3）

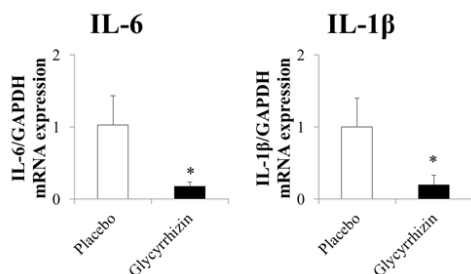


3) グリチルリチン口腔塗布が歯周組織及び血中サイトカイン，血糖値に及ぼす効果

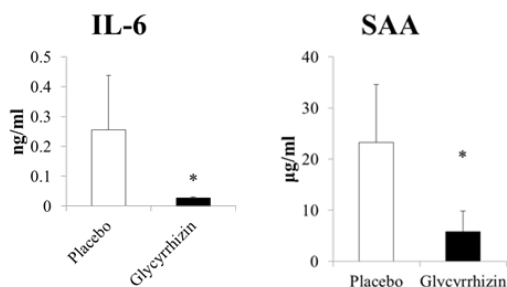
歯周病誘発糖尿病マウスに，グリチルリチンを口腔内に塗布すると，歯周組織の炎症性サイトカイン（図 4），さらに血中サイトカ

インの上昇が抑制された(図5)。

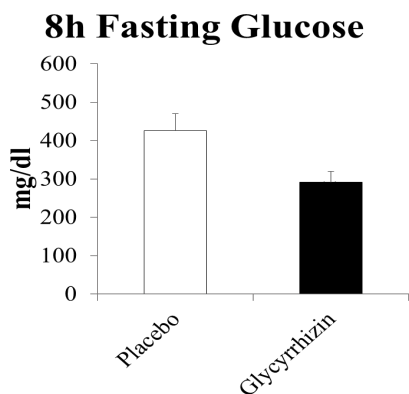
(図4)



(図5)



グリチルリチン口腔内塗布は *P. gulae* に対する血清抗体価も低下させた。さらに、血清中のSAAと血糖値の上昇も抑制された(図6)。



4) グリチルリチンがHMGB1-RAGEに及ぼす影響

歯周病糖尿病モデルマウスの歯肉におけるRAGE及びHMGB1のmRNA発現ならびに血清中のRAGE及びHMGB1が増加したが、グリチルリチン口腔内投与はそれらの増加を抑制した。

5) HMGB1 中和抗体が血糖値に及ぼす影響

HMGB1の中和抗体は、歯周炎によって誘発された血糖値の増加を抑制した。

6) 考察・結論

以上のことから、グリチルリチンの口腔内塗布は、絹糸結紮及び *P. gulae* 感染による歯周組織の炎症を抑制することによって、血中の炎症性サイトカインの制御を行い、その結果、インスリン抵抗性の上昇を阻害することで、血糖値が改善することが明らかとなった。さらに、この経路には、HMGB1-RAGEが関与することが示唆された。

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)

[雑誌論文](計 5件)

Fujita T, Yoshimoto T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Takemura T, Akutagawa K, Takeda K, Mizuno N, Kurihara H. Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease. *Jpn Dent Sci Rev.* 2018 May;54(2):66-75. 査読有

Imai H, Fujita T, Kajiya M, Ouhara K, Yoshimoto T, Matsuda S, Takeda K, Kurihara H. Mobilization of TLR4 Into Lipid Rafts by Aggregatibacter Actinomycetemcomitans in Gingival Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(5):1777-1786. 査読有

Yoshimoto T, Fujita T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Komatsuzawa H, Shiba H, Kurihara H. Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane protein 29 (Omp29) induces TGF-β-regulated apoptosis signal in human gingival epithelial cells via fibronectin/integrinβ1/FAK cascade. *Cell Microbiol.* 2016 Dec;18(12):1723-1738. 査読有

Miyagawa T, Fujita T, Yumoto H, Yoshimoto T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Shiba H, Matsuo T,

Kurihara H. Azithromycin recovers reductions in barrier function in human gingival epithelial cells stimulated with tumor necrosis factor- α . Arch Oral Biol. 2016 Feb;62:64-9. 査読有

Yoshimoto T, Fujita T, Kajiya M, Matsuda S, Ouhara K, Shiba H, Kurihara H. Involvement of smad2 and Erk/Akt cascade in TGF- β 1-induced apoptosis in human gingival epithelial cells. Cytokine. 2015 Sep;75(1):165-73. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

芥川桂一, 藤田 剛, 竹村 翼, 應原一久, 加治屋幹人, 松田真司, 田利美沙子, 水野智仁, 栗原英見
・歯周炎を誘発した糖尿病モデルマウスに対する Glycyrrhizin の作用について
日本歯周病学会 60 周年記念京都大会(2017 年 12 月, 京都)

芥川桂一, 藤田 剛, 竹村 翼, 應原一久, 加治屋幹人, 松田真司, 水野智仁, 栗原英見
・糖尿病マウスにおいて誘発された歯周炎に対する Glycyrrhizin の抗炎症作用の評価
第 38 回日本炎症・再生医学会(2017 年 7 月, 大阪)

竹村 翼, 藤田 剛, 松田真司, 加治屋幹人, 内田雄士, 芥川桂一, 應原一久, 武田克浩, 水野智仁, 栗原英見
・絹糸結紮による実験的歯周炎マウスモデルにおける接合上皮の経時的変化について
第 60 回春季日本歯周病学会学術大会(2017 年 5 月, 福岡)

芥川桂一, 藤田 剛, 水野智仁, 内田雄士, 竹村翼, 應原一久, 加治屋幹人, 松田真司, 栗原英見
・*Porphyromonas gulae* 感染糖尿病モデルマウスの歯周炎病態の評価
第 59 回春季日本歯周病学会学術大会(2016 年 5 月, 鹿児島)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 剛 (FUJITA TSUYOSHI)
広島大学・医歯薬保健学研究所(歯)・准教授
研究者番号：80379883

(2) 研究分担者

加治屋 幹人 (KAJIYA MIKIHITO)
広島大学・医歯薬保健学研究所(歯)・助教
研究者番号：00633041

松田 真司 (MATSUDA SHINJI)
広島大学・大学病院・病院助教
研究者番号：30611321

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

宮川 剛史 (MIYAGAWA TSUYOSHI)
今井 遥香 (IMAI HARUKA)
吉本 哲也 (YOSHIMOTO TETSUYA)
芥川 桂一 (AKUTAGAWA KEIICHI)
竹村 翼 (TAKEMURA TASUKU)