様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 １７ 日現在

機関番号：１６１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１１５０６

研究課題名（和文）PKRが骨代謝を制御し糖尿病関連歯周炎を重症化する分子機構の解明

研究課題名（英文）The effects of PKR on progression of periodontal diseases-associated diabetes mellitus.

研究代表者

吉田　賀弥（YOSHIDA, Kaya）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・講師

研究者番号：６０３６３１５７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯周病原菌とAGEsがPKRを介して歯槽骨代謝にどう影響をするかを検討した。P. gingivalis (Pg)感染は骨芽細胞においてPKRを誘導・活性化した。高血糖状態はPgのPKR誘導・活性化作用を亢進したが、Pgの細胞侵入率や、骨芽細胞の形態には影響しなかった。Pgにより活性化したPKRは、骨芽細胞の分化を亢進するが、破骨細胞に対しては直接的な効果よりも、RANKLを介した活性化機構が存在すると思われた。以上より、高血糖状態はPg感染によるPKR活性化をより亢進させ、骨芽細胞分化を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
歯周病原菌への感染（歯周病）は、PKRを誘導活性化して骨芽細胞分化を抑制することにより、歯槽骨吸収を引き起こす。この状況に高血糖（糖尿病）が加わると、PKRの誘導活性化はさらに増強され、歯槽骨は吸収されやすくなる。以上のような現象が、糖尿病関連歯周炎が重症化する機序の一端であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether Porphyromonas gingivalis (Pg) and AGEs affect bone metabolisms by regulating PKR activation. The treatment with Pg induced and activated PKR in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. The high glucose conditions by treating with glucose increased the effects of Pg on PKR activation, whereas it induced no change of Pg internalization and morphology of osteoblasts. The PKR activated by Pg induced the differentiation of osteoblasts but not osteoclasts. These results suggested that high glucose conditions might be result in the inhibition of osteoblast differentiation by accelerating PKR under Pg infection.

研究分野：口腔組織学

キーワード：歯周病　糖尿病　ＰＫＲ　ＡＧＥｓ　骨芽細胞

１．研究開始当初の背景

　糖尿病とともに併発した糖尿病関連歯周炎は重症化する傾向があり、効果的な予防・治療法の確立が望まれている。最終糖化産物 AGEs は糖尿病の進行とともに体内に蓄積し、骨代謝異常を含む様々な糖尿病関連疾患を引き起こす主要因子である。AGEs は糖尿病関連歯周炎の重症化にも関与すると考えられているが、その分子機構は未知の点が多い。

　Double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) はウイルスや細菌感染などにより活性化され、炎症反応に関与する蛋白質リン酸化酵素である。現在までに我々は、PKR が生理的な骨形成に加え、歯周病原菌感染による病理的な骨代謝に関与する分子であることを解明してきた。近年、PKR が AGEs に応答して糖尿病を制御すると報告されたが、糖尿病関連歯周炎での PKR と AGEs の関係については全く報告されていない。

２．研究の目的

本研究では、糖尿病発症と歯周病原菌由来の炎症の両方に関与する PKR に着目し、歯周病原菌と AGEs が PKR を介して歯槽骨代謝にどのような影響を及ぼすかを検討し、糖尿病関連歯周炎の進行機序の解明を目指す。

３．研究の方法

　糖尿病と歯周病の主要因子である AGEs および *P. gingivalis* が歯周組織に及ぼす影響と PKR との関連について、モデルマウスと PKR 発現を特異的に抑制・増加させた骨芽細胞を用いて解析する。糖尿病と歯周病およびその両方を併発したマウスの歯周組織における PKR 発現と活性を調べる。AGEs および *P. gingivalis* 処理した骨関連細胞での PKR の発現と活性を調べる。PKR 発現を抑制・増加させた骨芽細胞を用いて、PKR が AGEs および *P. gingivalis* の機能に影響するか調べる。

４．研究成果

(1). PKRは*P. gingivalis*感染やAGEsにより誘導・活性化されるか？

① *P. gingivalis*によるPKRの誘導・活性化について

マウス骨芽細胞株MC3T3-E1を用いた培養細胞実験系を確立した。野生型の*P. gingivalis*及びSNAP-*P. gingivalis*(細胞内動態を追跡するためにSNAP26bをタグ蛋白質として発現させた菌株)を嫌気培養する手技を確立した。

　MC3T3-E1に*P. gingivalis*を感染させると、30分以内にPKRのリン酸化が認められた。一方で、*P. gingivalis*感染後1時間以降にPKR蛋白質の発現が亢進した。以上より、培養細胞実験系において、*P. gingivalis*がPKRを誘導・活性化することが明らかになった。

② 高血糖状態が*P. gingivalis*によるPKRの誘導・活性化に及ぼす影響について

　AGEs には複数の構造体がある。本研究では、BSA と DL-glyceraldehyde を用いた合成条件を設定し、生理活性を有する AGEs を合成した。

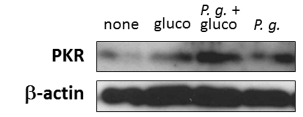

図１ 高濃度の糖を加えた培地(gluco) で*P. gingivalis* (*P. g.*)を感染させると、PKRの発現は増強する。

　MC3T3-E1の培養上清中にAGEsや D-glucoseを添加して高血糖状態にして、*P. gingivalis*を感染させた後に、PKRのリン酸化及び発現変化を測定した。その結果、AGEsやD-glucoseは*P. gingivalis*によるPKRの誘導・活性化を亢進する傾向があることがわかった（図１）。

　これまでの研究から、*P. gingivalis*がMC3T3-E1に侵入することが判明している。MC3T3-E1の培養上清中にD-glucoseを添加して高血糖状態にして、*P. gingivalis*を感染させた後に、コロニー形成能を測定した。高血糖状態下において*P. gingivalis*の骨芽細胞への侵入率に、有意な変化は

見られなかった。また、電子顕微鏡により*P. gingivalis*感染時のMC3T3-E1細胞の形態を観察したが、感染による明らかな形態変化は認められなかった（図２）。

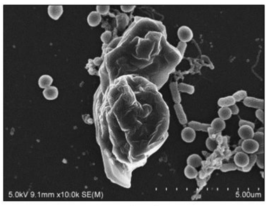

図２ MC3T3-E1の細胞形態は*P. gingivalis* 添加により変化しなかった。

(2). 活性化されたPKRは骨関連細胞の機能に影響するか？

①骨芽細胞及び破骨細胞の分化・機能について

野生型MC3T3-E1及びPKR発現を抑制したMC3T3-E1株（shPKR株）に*P. gingivalis*を24時間感染させて、骨芽細胞分化マーカーや骨芽細胞分化を制御する転写因子の遺伝子発現を、real-time PCRにより調べた。野生型MC3T3-E1において、*P. gingivalis*感染によりBSPやOPNの発現は亢進したが、type I collagenやRunx2、Osxの発現は変化しなかった。このような*P. gingivalis*感染の効果は、shPKR株では見られなかった。また、*P. gingivalis*感染はALP活性に影響を与えなかった。

骨芽細胞との共培養系に先立ち、破骨前駆細胞であるRAW264.7 細胞にP. gingivalisを感染させ、破骨細胞へ分化状態を顕微鏡下で観察した。*P. gingivalis*感染による破骨細胞分化への影響は認められなかった（図３）。

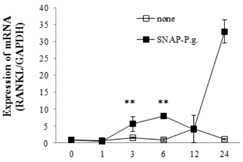

図３ *P. gingivalis* 添加によりRANKL発現は亢進した。

(3). in vivo におけるP. gingivalisによるPKRの誘導・活性

P. gingivalis (10^9 CFU/100 μl) を糖尿病モデルマウスの切歯部及び臼歯部歯肉溝に塗布し、糖尿病・歯周病マウスを作製した。下顎骨の形態変化と骨量をマイクロCTを用いて測定し、歯周病モデルが確立されていることを確認した。

糖尿病および糖尿病・歯周病マウスから下顎骨を摘出し、脱灰処理後に凍結切片を作製した。PKRおよびリン酸化PKR に対する抗体を用いて免疫組織染色を行ったが、良好な反応が見られなかった。

以上より、*P. gingivalis* 感染は骨芽細胞において PKR を誘導・活性化すること、高血糖状態はそれを亢進することがわかった。高血糖状態は、*P. gingivalis* の骨芽細胞への侵入率や、細胞形態を変化させないことより、*P. gingivalis* による PKR 誘導・活性化には、細胞侵入以外の機序が関与すると考えられた。*P. gingivalis* により活性化した PKR は、骨芽細胞の分化を亢進するが、破骨細胞に対しては直接的な効果よりも、RANKL を介した活性化機構が存在すると思われた。*P. gingivalis* による PKR 誘導・活性化に与える高血糖の影響は、今回明らかにできなかった。モデルマウス解析では、歯槽骨における PKR 誘導を明確に検出できなかった。実験手法の改善の余地がある。また、培養細胞系で得られた結果を慎重に解釈する必要がある。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　４件）

1. **<u>Yoshida K</u>**, Teramachi J, Uchibe K, Ikegame M, Qiu L, Yang D, <u>Okamura H</u>.
   Reduction of Protein Phosphatase 2A Cα promotes in vivo bone formation and adipocyte differentiation.
   Molecular and Cellular Endocrinology, 470, 251-258, 2018.（査読有り）
   doi: 10.1016/j.mce.2017.11.005.

2. **<u>Yoshida K</u>**, <u>Okamura H</u>, Hiroshima Y, Abe K, Kido JI, Shinohara Y, Ozaki K.
   PKR induces the expression of NLRP3 by regulating the NF-κB pathway in *Porphyromonas gingivalis*-infected osteoblasts.

Experimental Cell Research, 354(1), 57-64, 2017.（査読有り）
doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.028.

3. Okamura H, **Yoshida K**, Morimoto H, Teramachi J, Ochiai K, Haneji T, Yamamoto A.
Role of protein phosphatase 2A in osteoblast differentiation.
Journal of Clinical Medicine, 6 (3), 2017 *Review*.（査読有り）
doi: 10.3390/jcm6030023.

4. Takamura H, **Yoshida K**, Okamura H, Fujiwara N, Ozaki K.
Porphyromonas gingivalis attenuates the insulin-induced phosphorylation and translocation of forkhead box protein O1 in human hepatocytes.
Archives Oral Biology, 69, 19-24, 2016.（査読有り）
doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.010.

〔学会発表〕（計　8 件）

1. 吉田 賀弥、瀬山 真莉子、藤原 奈津美、尾崎 和美
Porphyromonas gingivalis 感染したマクロファージが由来の膜小胞が肝臓糖代謝に及ぼす影響、第 61 回 秋季日本歯周病学会学術大会、2018 年
2. 吉田 賀弥、藤原 奈津美、尾崎 和美、内部 健太、池亀 美華、岡村 裕彦
Porphyromonas gingivalis 感染したマクロファージが産生する膜小胞が肝臓糖代謝に及ぼす影響、第 60 回 日本歯科基礎医学会学術大会、2018 年
3. Kaya Yoshida, Natsumi Fujiwara, Kazumi Ozaki, Kenta Ucjibe, Mika Ikegame, Hirohiko Okamura
Extracellular vesicles from *Porphyromonas gingivalis*-infected macrophages include histone proteins and translocate to the liver、第10回日本RNAi研究会・第5回日本細胞外小胞学会, 2018年
4. 瀬山 真莉子、吉田 賀弥、藤原 奈津美、尾崎 和美
Porphyromonas gingivalis の分泌小胞は肝臓の糖代謝に影響を与える、第 61 回日本歯周病学会学術大会、2018 年
5. 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、2018 年
6. 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、2017 年
7. 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 Cαの役割、第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年
8. 吉田 賀弥、岡村 裕彦
PKRは骨芽細胞において*Porphylomonas gingivalis*が誘導するNLRP3発現をNF-kB経路を介して制御する、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：岡村　裕彦

ローマ字氏名：(OKAMURA, Hirohiko)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：教授
研究者番号（8 桁）：20380024

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。