

令和元年5月27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：16K11832

研究課題名(和文) 糖尿病関連歯周炎のIL-6動態に着目したマクロファージ・線維芽細胞クロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk of Gingival Fibroblasts and Macrophages in Inflammatory Cytokine Cascade: Potential Mechanisms of Periodontitis with Diabetes.

研究代表者

成石 浩司 (NARUISHI, Koji)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：00346446

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)：本研究の目的は、歯周炎病巣に浸潤するMと歯肉線維芽細胞のクロストークに焦点を当て、高血糖(グルコース)やCPTIによって惹起されるIL-6関連分子の動態によって制御される一連の細胞カスケードを解明することである。

研究成果をまとめると好中球などから産生されるCPTIはMに作用してIL-1やsIL-6Rの産生を誘導し、それらの炎症関連分子の相互作用によって歯肉線維芽細胞のMMP-1産生が誘導され、歯周組織の破壊が起こること、そしてこの線維芽細胞とMのクロストークは、高グルコース状態にある歯周組織では一層増強され、結果的に糖尿病患者において歯周病の重症化が生じ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

「IL-6は歯周病の重症化機序の重要な因子である」という長年の研究成果を基盤にして、高グルコースとカルプロテクチンを基点としたIL-6動態の相乗的な増強効果を想定し、糖尿病関連歯周炎の重症化機序の一端を解明できた。また、歯肉線維芽細胞による歯周組織破壊機序を標的にした研究ではなく、その上流で繰り広げられるIL-6とsIL-6Rの産生機序に着目し、歯肉線維芽細胞と歯周組織に浸潤したマクロファージとの細胞クロストークに焦点を当てた点は独創的であり、本研究によってIL-6動態に着目した糖尿病関連歯周炎の重症化機序が明らかになり、将来、本領域疾患の創薬技術の発展に貢献し得ると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study was to explore the biological pathogenesis of severe periodontitis in diabetic patients focusing on the crosstalk of human gingival fibroblasts (HGFs) and macrophages. Results are shown as below: There were statistical correlation between IL-1 and sIL-6R levels in GCF and HbA1c in periodontitis patients with DM. HG and CPT significantly induced sIL-6R production in THP-1 macrophages. HG significantly enhanced IL-1 or IL-6/sIL-6R-induced MMP-1 production in HGFs. Finally, MMP-1 production in HGFs cultured with HG increased significantly by CM from THP-1 macrophages cultured with HG. The induction of MMP-1 by the CM from THP-1 macrophages cultured with HG was significantly inhibited by dose dependent of IL-1ra in HGFs cultured with HG. In conclusion, diabetic conditions such as HG induce IL-1 and sIL-6R production from macrophages in inflammatory periodontal tissues and may exacerbate the periodontitis synergistically via MMP-1 production from HGFs.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病関連歯周炎 歯肉線維芽細胞 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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 (糖尿病関連歯周炎と呼ばれる), その病態機序は不明である。

我々は, 高グルコースは歯肉線維芽細胞の IL-6 シグナル伝達分子 gp130 の発現を誘導し, 可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R: IL-6 アゴニスト) の存在下で, 結果的に IL-6 が血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生を増強することを報告した (Omori et al, J Biol Chem, 2004)。この知見は, 糖尿病関連歯周炎では angiogenesis がしばしば見られるという臨床所見に合致し, IL-6 と sIL-6R による糖尿病関連歯周炎の重症化機序を説明し得るものである。すなわち, 歯周炎病巣の IL-6 や sIL-6R の産生・作用機序が分かれば, 将来, 本疾患の創薬技術の発展に貢献できるかもしれない。

歯肉線維芽細胞は, IL-6 の有力な産生細胞である。我々は, IL-1 が歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を劇的に誘導することを報告した (Sawada et al, Biomed Res, 2013)。さらに, S100 蛋白のカルプロテクチン (CPT) が歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を誘導することも見出した (第 58 回春期日本歯周病学会, 千葉で発表)。CPT の標的レセプターは, Toll 様受容体 4 (TLR4) および最終糖化産物受容体 (RAGE) である (Kwon et al, Mol Cells, 2013)。我々は, 歯肉線維芽細胞における受容体の発現様態を調べたところ, 口腔上皮細胞と比較して TLR4 mRNA の発現レベルが有意に高いことを見出した。すなわち, CPT は TLR4 を介して IL-6 産生を誘導するのかもしれない。また, 糖尿病関連歯周炎の重症化機序を解明するために, 高血糖状態が gp130 と同様, TLR4 や RAGE の発現を増強するかも検討されるべき重要な課題である。

マクロファージ (M) は, sIL-6R の有力な産生細胞である。我々は, IL-6 が THP-1 M の sIL-6R 産生を有意に亢進することを報告した (Sawada et al, Biomed Res, 2013)。また, 高グルコース下で THP-1 M を培養しても, sIL-6R 産生は誘導されないという培養実験の結果も持ち合わせている。一方, 我々は遺伝子マイクロアレイ法によって, 高グルコース下の歯肉線維芽細胞で変動する遺伝子群を網羅的に捉えた結果, MMP-3 遺伝子の発現が有意に亢進することが分かった (未発表)。MMP-3 の発現亢進が糖尿病関連性歯周炎の重症化に直接的に関与するかどうかは不明であるが, MMP-3 は骨髄腫細胞の膜型 IL-6R を shedding して sIL-6R の細胞外への分泌を誘導すると報告されている (Hargreaves et al, Br J Haematol, 1998)。すなわち, 高血糖によって歯肉線維芽細胞から産生された MMP-3 が歯周組織に浸潤した M に作用して, その sIL-6R 産生 (shedding) を促進する可能性もあり, その細胞間クロストークの正当性が示されれば, sIL-6R 産生を基点とした糖尿病関連歯周炎の新たな病態機序が提唱できるかもしれない。

従来, 多くの研究者は, 標的疾患において IL-6 等のサイトカインの作用を抑制制御するという研究戦略の中で, 抗 IL-6 抗体や可溶性 gp130 を応用して, 標的細胞に対する IL-6 作用を抑制制御することに挑戦してきた (output の抑制)。一方, 我々は蛋白分解酵素カテプシン産生や angiogenesis を誘導する VEGF 産生の亢進を通じて, 糖尿病関連歯周炎の重症化に直接的に関与する歯肉線維芽細胞のさらに上流で繰り広げられる IL-6 および sIL-6R の産生に関わる領域の制御を念頭に, 高血糖 (グルコース) に起因する M と線維芽細胞のクロストークによって増強され得る IL-6 関連分子の動態カスケードを明らかできれば 細胞生物学的な糖尿病関連性歯周炎の病態形成における基点領域の解明に繋がり, 結果的に, その早期診断技術の発展に基づく治療戦略の立案に貢献できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、歯周炎病巣に浸潤する M $\alpha$  と歯肉線維芽細胞のクロストークに焦点を当て、高血糖(グルコース)や CPT によって惹起される IL-6 関連分子の動態によって制御される一連の細胞カスケードを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) 対象：徳島大学病院歯周病科を受診した 70 名の慢性歯周炎患者(男 35 名, 女 35 名)(糖尿病のため内科受診中の患者: 男 19 名, 女 14 名を含む)とした。なお, 本研究は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会において承認された(受付番号 2325)。
- (2) 臨床指標：歯周病関連の臨床指標は, 歯の総数, プロービング時出血, 歯周ポケット深さ, そして最深ポケット部位における GCF 中の IL-1 $\beta$ , sIL-6R および CPT レベルとした。糖尿病関連の臨床指標は, 随時血糖値, HbA1c とした。また皮下の推定 AGE レベルである Skin AF 値を AGE Reader<sup>®</sup> (Neuroscience) を用いて測定した。
- (3) 統計解析: 各群間の統計学的関連性は Mann-Whitney U 検定および Pearson's correlation coefficient 検定を用いて検定した。P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。
- (4) 細胞：ヒト末梢血単球 THP-1 (ATCC) を 100 nM PMA で M $\alpha$  化した THP-1 M $\alpha$  およびヒト歯肉線維芽細胞 CRL-2014TM (ATCC) を用いた。培養は, 通常のグルコース濃度 (5.5mM) を Normal glucose (NG), 高グルコース濃度 (25mM) を High glucose (HG) とした。なお, 浸透圧コントロールとして, NG に 19.5mM のマンニトールを添加した調製した群を MN 群として実験系に加えた。
- (5) 試薬：リコンビナントヒト CPT, IL-1 $\beta$ , IL-6, sIL-6R および IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) は R&D から購入した。TACE 阻害剤 TAPI-1 は Calbiochem から購入した。
- (6) 炎症関連因子の産生性の検：THP-1 M $\alpha$  およびヒト歯肉線維芽細胞の炎症関連因子の産生レベルは, ELISA キット (R&D) を用いて測定した (標的: IL-1 $\beta$ , IL-6, sIL-6R, MMP-1, TIMP-1 および VEGF)。
- (7) 細胞内シグナル伝達系の検討：ヒト歯肉線維芽細胞において, IL-1 $\beta$  および IL-6+sIL-6R 刺激による I $\kappa$ B $\alpha$ , p44/42 MAPK のリン酸化誘導の有無は, 通法にしたがいウエスタンブロット法で検討した。

## 4. 研究成果

- (1) 糖尿病患者群と非糖尿病患者群との間における Skin AF 値に有意差はなかった (P=0.34)。
- (2) 最深ポケット部位における GCF 中の IL-1 $\beta$  と sIL-6R レベルは, 糖尿病患者の HbA1c 値と有意な相関が見られた (IL-1 $\beta$ : P=0.035, sIL-6R: P=0.040)。
- (3) HG と CPT は, THP-1 M $\alpha$  の sIL-6R 産生を有意に誘導した。
- (4) HG は, 歯肉線維芽細胞の IL-1 $\beta$  および IL-6+sIL-6R による MMP-1 の産生誘導を有意に促進した。この MMP-1 産生の誘導は MAPK および NF- $\kappa$ B 系を阻害することで有意に抑制された。なお, TIMP-1 の産生性に変化は認めなかった。
- (5) HG は, 歯肉線維芽細胞の IL-1 $\beta$  および IL-6+sIL-6R による I $\kappa$ B $\alpha$ , p44/42 MAPK のリン酸化を著しく増強した。
- (6) HG 下で培養した THP-1 M $\alpha$  の培養上清によって, 歯肉線維芽細胞の MMP-1 産生は有意に誘導された。この MMP-1 産生は IL-1ra によって有意に抑制された。

以上の研究結果から，好中球などから産生される CPT は，M に作用して IL-1 や sIL-6R の産生を誘導し，それらの炎症関連分子の相互作用によって歯肉線維芽細胞の MMP-1 産生が誘導され，歯周組織の破壊が起こること，そしてこの線維芽細胞と M のクロストークは，高グルコース状態にある歯周組織では一層増強され，結果的に糖尿病患者において歯周病の重症化が生じる可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Lew JH, Naruishi K, Kajiura Y, Nishikawa Y, Ikuta T, Kido JI, Nagata T. High Glucose-Mediated Cytokine Regulation in Gingival Fibroblasts and THP-1 Macrophage: a Possible Mechanism of Severe Periodontitis with Diabetes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(3):973-986. doi: 10.1159/000494481. (査読有)
- (2) Naruishi K, Yumoto H, Kido JI. Clinical effects of low body mass index on geriatric status in elderly patients. *Exp Gerontol*. 2018;110:86-91. doi: 10.1016/j.exger.2018.05.017. (査読有)
- (3) Naruishi K, Nagata T. Biological effects of interleukin-6 on Gingival Fibroblasts: Cytokine regulation in periodontitis. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6393-6400. doi: 10.1002/jcp.26521. (査読有)
- (4) Kajiura Y, Nishikawa Y, Lew JH, Kido JI, Nagata T, Naruishi K.  $\beta$ -carotene suppresses *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-mediated cytokine production in THP-1 monocytes cultured with high glucose condition. *Cell Biol Int*. 2018;42(1):105-111. doi: 10.1002/cbin.10873. (査読有)
- (5) 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*. 2017;232(7):1862-1871. doi: 10.1002/jcp.25724. (査読有)
- (6) 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*. 2017;54(6):664-670. doi: 10.1177/0004563216680232. (査読有)
- (7) Naruishi K, Nishikawa Y. Crosstalk of Gingival Fibroblasts and Macrophages in Inflammatory Cytokine Cascade: Potential Mechanisms of Periodontitis. *J Cell Signal*, 2017;2(2): e149. doi: 10.4172/2576-1471.1000149. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) Nishikawa Y, Naruishi K, Yumoto H. Diabetic High-Glucose Condition Enhances Calprotectin-induced Inflammatory Responses in Gingival Fibroblasts. 97th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition, Vancouver, Canada, June 19-22, 2019.
- (2) 西川康史, 成石浩司, 木戸淳一, 湯本浩通 歯肉線維芽細胞においてカルプロテクチン誘導性炎症関連因子の産生に及ぼす高グルコースの影響 第 148 回日本歯科保存学会春期学術大会, 横浜, 平成 30 年 6 月 15 日
- (3) 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，宇都宮，平成 28 年 6 月 9 日

- (4) 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，鹿児島，平成 28 年 5 月 20 日

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：木戸 淳一

ローマ字氏名：(KIDO, Jun-ichi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部 (歯学系)

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 10195315

研究分担者氏名：梶浦 由加里\*

ローマ字氏名：(KAJIURA, Yukari)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部 (歯学系)

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁): 40758869

\*退職のため削除 (平成 29 年 4 月 6 日)

### (2)研究協力者

なし

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。