

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20666

研究課題名(和文) インスリン抵抗性が歯周組織再生におよぼす影響とそのメカニズム

研究課題名(英文) The effect of insulin resistance on periodontal regeneration

研究代表者

水谷 幸嗣 (Mizutani, Koji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60451910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周組織におけるインスリン抵抗性が歯周組織の治癒および再生療法に及ぼす影響について糖尿病モデル動物と臨床サンプルを用いて検討する。まず、歯周組織再生療法への影響を *in vivo* で評価するために、ストレプトゾトシン(STZ)の腹腔内注射で作製した糖尿病モデルラットの左右の上顎に外科的に作製した骨欠損モデルにエムドゲインを用い、歯周組織再生療法の効果を解析した。さらに歯肉線維芽細胞を健常群から単離し、高グルコース培地または対照培地で培養し、PI3K/Akt/VEGFシグナル経路に対するインスリン抵抗性およびエムドゲインの効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、歯周組織におけるインスリン抵抗性の詳細が明らかにされれば、未だ十分な解明がなされていない歯周炎と肥満・糖尿病の関連性を説明するメカニズムの一つになりうる。さらに、糖尿病患者における歯周病の悪化や治療効果の低さが、従来の説明によるだけでなく、糖尿合併症の血管障害の側面に起因している可能性が明確となれば、今後増加が予測されている、糖尿病を有する歯周病患者の治療に有効な新たなアプローチの開発につながる。そのような背景の中で、歯周組織再生療法が高血糖状態の患者に対してどのように効果を持つか検討できれば、臨床上の意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate the periodontal regenerative effect of enamel matrix derivative (EMD) in diabetes. Thirty-six rats were assigned to streptozotocin-induced diabetes or control (non-diabetic) groups. Three-wall intrabony defects were surgically generated in the bilateral maxilla molar, followed by application of EMD or saline. Primary wound closure and defect fill were evaluated via histomorphological analysis and micro-computed tomography. mRNA expression levels of inflammatory and angiogenic factors in the defects were quantified via real-time polymerase chain reaction. Gingival fibroblasts were isolated from control animals and cultured in high-glucose (HG) or control medium. Newly formed bone and cementum were significantly increased at EMD-treated sites in diabetic rats than at EMD-untreated sites in control rats. EMD might promote periodontal tissue regeneration via Akt/VEGF signaling, even in a diabetic condition.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 糖尿病 インスリン抵抗性 エナメルタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病と糖尿病が相互に影響を及ぼすことは、疫学的調査や介入研究により広く認識されている。近年では、肥満も、歯周病のリスクファクターとしてもなりうる多くの疫学的調査により示され始めており、そのうちのいくつかの研究により、慢性的な高血糖状態とは独立して、肥満が歯周炎と関連していることが示されている。これは、肥満により生じる全身レベルでの慢性炎症、酸化ストレスやインスリン抵抗性が関与していることが示唆されている。

インスリン抵抗性は、主要な糖尿病慢性合併症の発現に強く関わっていることが知られている。特に網膜症や腎症などの細小血管症、さらに動脈硬化性病変である大血管症においても、その発症と悪化の重要な要因となっていると認識されており、血管内皮細胞におけるインスリン抵抗性の発現について数多くの研究がなされ (Mima, Mizutani et al. Diabetes 2012)、分子生物学的な背景が明らかにされつつある。

一方、糖尿病や肥満状態にあるラットに実験的歯周炎を惹起した場合に、健康なラットよりも著しく骨吸収が生じることが、いくつかの報告により示されているものの、その機序はほとんど明らかにされていない。しかしその現象の説明として、他の糖尿病合併症を発症する臓器と同じく、歯周組織も血管を比較的豊富に有するため、インスリン抵抗性の発現を介した血管内皮機能不全が、肥満や糖尿病の状態と、歯周組織破壊の進行を結び付けうると考えられる。

2. 研究の目的

前述の背景と、これまでの研究成果をもとに、本研究計画では歯周組織におけるインスリン抵抗性と、歯周炎進行に対するその影響の検索を目的とし、以下の事項を明らかにする。

(1) 糖尿病モデルラットへの歯周組織再生療法の効果についての分析

2 型糖尿病に罹患した状態での歯周組織再生療法の効果の分析のために、糖尿病モデルラットと対照ラットの外科的骨欠損にエムドゲイン®ゲルを応用し、欠損部の治癒をマイクロ CT および組織切片にて形態学的に観察する。また治癒過程にある組織の mRNA から、インスリンシグナルに関連する血管新生関連マーカー、骨代謝マーカーの発現レベルを計測し、高血糖状態による歯周組織再生の影響を分析する。

(2) 糖尿病モデルラットの歯周組織におけるインスリンシグナルの解析

2 型糖尿病モデル動物の歯肉に対してインスリン刺激を行い、2 つのインスリン経路 (PI3Kinase-Akt 経路と MAPK 経路) のどの段階に、どの程度の阻害が生じているか評価をする。糖尿合併症として血管障害がみられる臓器では、前者の経路のみが阻害されることが報告されているため、歯周炎が糖尿合併症と同様の病態を示すかを明らかにする。

(3) 糖尿病患者の歯肉線維芽細胞を用いたエムドゲインの効果の検討

糖尿病患者の歯周組織がインスリン抵抗性を有するかを、糖尿病患者の歯肉の線維芽細胞を用いて研究する。上記(2)と同様に Akt、Erk 活性化にて評価し、歯周組織再生に関与しうる細胞の増殖能、遊走能を評価する。このいずれも Akt、Erk の活性の影響を受けるものであり、高血糖によるインスリンシグナルの阻害がヒトの歯周組織の細胞にも生じうるかを検証する。さらに、この培養歯肉線維芽細胞にエムドゲインによる刺激を加え、高血糖状態での増殖能、遊走能の変化を観察し、低下しているようであれば、その改善効果に PKC 阻害剤などが有効か検討する。

3. 研究の方法

1) 実験動物

ストレプトゾトシン (STZ) の腹腔内注射で作製した糖尿病モデルラット

2) インスリン抵抗性と全身状態の評価

血清中の血糖、インスリンの測定と、腹腔内耐糖能テストにより耐糖能を評価。また血清中の CRP、遊離脂肪酸、IL-6、TNF- α 、マロンジアルデヒド (MDA) を測定することで全身的な慢性炎症や酸化ストレスレベルを評価する。

3) 外科的歯周炎モデル:

全身麻酔下で両側上顎第一臼歯近心に骨欠損(2×2×1mm)を作製し、露出根面のセメント質も除去。片側にはエナメルマトリックスデリバティブ(エムドゲイン®ゲル)を塗布、片側は何も入れずに縫合閉鎖。

4) 歯周組織再生の観察と血管新生・骨代謝マーカーの定量

3 週間の観察期間中、マイクロ CT により欠損部の治癒状態を 3 次元画像にて観察する。

また、1、2 週目に各群 5 頭安楽死を行い、治癒過程にある欠損部組織での eNOS、血管内皮成長因子 (VEGF) などの血管新生関連マーカー、TGF- β 、PDGF などの成長因子や、 α 型コラーゲン、Runx2、OCN、Osx などの骨代謝マーカーの mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR にて計測する。

3週目に安楽死を行った個体では、連続組織切片によるセメント質の再生量の計測を行い、また新生血管や新生骨に関して上記のマーカーにより免疫染色を行う。

4. 研究成果

欠損部の組織再生のパラメーターは、糖尿病群、健常群ともにエムドゲイン非塗布側よりもエムドゲイン塗布側で有意に高かったが、糖尿病群の組織再生は対照群で有意に低かった。新生骨および新生セメント質は、健常群のエムドゲイン非塗布側よりも糖尿病群のエムドゲイン塗布部位で有意に増加した。Vegf はエムドゲイン塗布側で上昇した。in vitro 実験において、インスリンまたはエムドゲインによって誘導された Akt のリン酸化は、高グルコース培地で培養した細胞で有意に低かった。エムドゲインによる Vegf の上昇は高グルコース培地では有意に低く、Akt 阻害剤である Wortmannin によって抑制された。結論として、エムドゲインは、糖尿病状態においても、Akt/VEGF シグナル経路を介し歯周組織再生を促進する可能性があることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Buranasin Prima, Mizutani Koji, Iwasaki Kengo, Pawaputanon Na Mahasarakham Chantida, Kido Daisuke, Takeda Kohei, Izumi Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0201855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Kohei, Mizutani Koji, Matsuura Takanori, Kido Daisuke, Mikami Risako, Noda Masahiro, Buranasin Prima, Sasaki Yoshiyuki, Izumi Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Periodontal regenerative effect of enamel matrix derivative in diabetes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0207201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kido Daisuke, Mizutani Koji, Takeda Kohei, Mikami Risako, Matsuura Takanori, Iwasaki Kengo, Izumi Yuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Impact of diabetes on gingival wound healing via oxidative stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0189601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0189601	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 武田浩平, 水谷幸嗣, 松浦孝典, 野田昌宏, 城戸大輔, 三上理沙子, 和泉雄一
2. 発表標題 糖尿病ラットにおけるエナメルマトリックスタンパク質の再生効果への影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2017年度秋季学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Kido, Koji Mizutani, Kohei Takeda, Takanori Matsuura, Yuichi Izumi
2. 発表標題 Insulin resistance causes impaired gingival wound healing in diabetic rats
3. 学会等名 2017 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考