

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09609

研究課題名(和文) 糖尿病でのフルクトース過剰摂取が歯周病増悪因子となる可能性を調べる研究

研究課題名(英文) A study of the possibility of an aggravating factor for periodontal disease that excessive fructose intake in diabetes mellitus.

研究代表者

田邊 奈津子 (TANABE, Natsuko)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10409097

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)：糖尿病でのフルクトース過剰摂取が歯周病増悪の因果関係および分子機構を、骨芽細胞を用いて細胞・分子生物学的に解明することを目的とした。その結果、高血糖状態におけるフルクトースのLPSによる炎症の増悪については明らかにすることはできなかった。しかしながら、高血糖状態または血中のグルコースによって生成されたAGEsは、歯周病の炎症の原因の1つであるLPSによる炎症を増悪させる可能性が示めされた。さらに関連実験により、大気圧低温窒素プラズマはこれらで増悪させた炎症を抑制する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は歯周病増悪のリスクファクターとして疫学的及び動物実験においてもその相関が示されている。しかしながら、細胞・分子生物学的には明確な相関を示した報告は少ない。本研究の成果は、骨芽細胞に歯周病の炎症が進行する原因の一つであるLPSとグルコースまたは終末糖化産物で共刺激すると炎症性サイトカインや炎症性生理活性物質が増加するというものである。これは、糖尿病による高血糖状態における歯周病による炎症の進行の1つのメカニズムを細胞生物学的に明らかにしたものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the causal relationship and molecular mechanism of the exacerbation of periodontal disease by excessive fructose intake in diabetes mellitus using osteoblasts by cell and molecular biology. As a result, fructose did not affect the progression of inflammation by fructose LPS in a hyperglycemic state. However, AGEs produced by hyperglycemia or glucose in the blood may exacerbate LPS-induced inflammation, which is one of the causes of inflammation in periodontal disease. In addition, related experiments showed that atmospheric pressure and cold nitrogen plasma could suppress the inflammation exacerbated by these AGEs.

研究分野：骨代謝学

キーワード：歯周病 糖尿病 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は歯周病増悪のリスクファクターとして疫学的及び動物実験においてもその相関が示されている。しかしながら、細胞・分子生物学的には明確な相関を示した報告は少なく、未だ完全な糖尿病と歯周病増悪の EBM の確立には至っていない。

フルクトースは単糖として多くの果実や野菜だけでなく、コーンシロップなどの添加物として様々な形で食物に含まれている。またフルクトースはグルコースに次いで多量に摂取される糖質で、近年、糖質制限によってグルコースやスクロースの摂取制限が謳われている中、フルクトースの摂取量は増加の一途をたどっている。

糖尿病の様な糖代謝異常状態で生成されるグリセルアルデヒドによって作られた終末糖化産物(AGEs)は、骨領域で炎症反応を促進すると報告されており、さらにフルクトースはグルコースと比べて約10倍 AGEs を生成するための糖化能が高いと報告されている(Suarez et al., J Bio Chem, 1989)。さらに AGEs は加齢によって生成量が増加することから老化物質と言われている。加齢という点においては、糖尿病の成人の総患者数は約760万人で20~79歳の有病者率8.8%で11人に1人が糖尿病であり(国際糖尿病連合, 2015)、また歯周病の総患者数は約332万人、20歳代で7割60歳代では約9割の有病率である(平成26年患者調査, 厚生労働省)。以上の知見より、糖尿病と歯周病は加齢に伴って増加する疾患という共通点が認められる。しかしながら、糖尿病と歯周病増悪の分子メカニズム、特にフルクトース由来の AGEs との関わりについての報告は見当たらない。

2. 研究の目的

申請者らは、新たな視点で、糖尿病つまり糖質代謝異常下でのフルクトースの過剰摂取と歯周病増悪の因果関係および分子機構を、骨芽細胞を用いて細胞・分子生物学的に解明することを目的とし、本研究を企図した。具体的には、糖尿病を罹患している患者の歯周病を想定して、歯周病原菌の内毒素であるリポ多糖(LPS)で炎症を惹起させた骨芽細胞を高濃度グルコース及びフルクトース含有培地で培養し、炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。あわせて AGEs が骨芽細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響についても検索した。

3. 研究の方法

(1) 高血糖下におけるフルクトース負荷が骨芽細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。MC3T3-E1 細胞を cell culture plate に播種し、24 時間静置後、*E. Coli* 由来の LPS を播種した骨芽細胞に刺激し、3、7 および 14 日間以下に示す条件で培養し、サンプルをそれぞれ回収した。そしてサンプル中の炎症性サイトカインの遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を ELISA 法で確認した。

(条件全てにおいて血清アルブミン 1mg/ml 添加する)

以下に示す条件で実験を行った。

無刺激

LPS(100 ng/ml) ,

22 mM グルコース + LPS (100 ng/ml) ,

22 mM グルコース + 50 nM フルクトース + LPS(100 ng/ml)

22 mM グルコース + 100 nM フルクトース + LPS(100 ng/ml)

(2) 高血糖下における骨芽細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。MC3T3-E1 細胞を cell culture plate に播種し、24 時間静置後、*E. Coli* 由来の LPS を播種した骨芽細胞に刺激し、3、7 および 14 日間以下に示す条件で培養し、サンプルをそれぞれ回収した。そしてサンプル中の炎症性サイトカインの遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を ELISA 法で確認した。

(条件全てにおいて血清アルブミン 1mg/ml 添加する)

以下に示す条件で実験を行った。

無刺激

LPS(100 ng/ml) ,

22 mM グルコース + LPS (100 ng/ml) ,

(3) AGEs が骨芽細胞での LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。MC3T3-E1 細胞を cell culture plate に播種し、24 時間静置後、*E. Coli* 由来の LPS を播種した骨芽細胞に刺激し、3、7 および 14 日間以下に示す条件で培養し、サンプルをそれぞれ回収した。そしてサンプル中のレセプター RAGEs と炎症性サイトカインの遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を ELISA 法で確認した。

以下に示す条件で実験を行った。

- 無刺激
- LPS(100 ng/ml) ,
- LPS(100 ng/ml)+AGEs (100 µg/ml)

(4) 大気圧低温窒素プラズマが骨芽細胞への抗炎症作用について調べる研究

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。MC3T3-E1 細胞を cell culture plate に播種し、24 時間静置後、細胞培養培地 20 ml に大気圧低温窒素プラズマを 120 sec 照射したものを骨芽細胞に刺激し、3, 7 および 14 日間以下に示す条件で培養し、サンプルをそれぞれ回収した。そしてサンプル中の iNOS および COX-2 の遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を western blot 法で確認した。

4. 研究成果

(1) はじめに申請者らは、高血糖下におけるフルクトース負荷が骨芽細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生におよぼす影響を調べた。具体的には、LPS 存在下における骨芽細胞へのグルコースとフルクトースの共刺激が、LPS 誘導性の炎症性サイトカイン IL-1 α 、IL-6 および RANK の遺伝子発現を調べた。その結果フルクトース負荷は骨芽細胞での LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生の影響は認められなかった。

(2) 高血糖下における骨芽細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べるために、LPS 存在下で骨芽細胞にグルコースを刺激し、上記に示した炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べた結果、LPS + グルコース刺激は、LPS 単独刺激と比較して、培養 7 日目に IL-1 α 、および培養 14 日目に IL-6 の遺伝子発現を促進させることが示唆された (図 1a および 1b)。しかしながら、LPS + グルコース刺激は、RANKL の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった

(図 1c)。さらに、LPS+グルコースは LPS 単独刺激と比較して、培養 14 日目の IL-6 のタンパク発現を促進させる一方で、RANKL のタンパク発現には影響を及ぼさなかった (図 2a および 2b)。

次に、LPS 存在下での骨芽細胞のグルコース刺激による、炎症性サイトカイン IL-1 α および IL-6 の遺伝子発現上昇のメカニズムを調べることにした。グルコーストランスポーター (GLUT) のアイソフォームは、細胞内のグルコースの取り込みを仲介する。これらのアイソフォームには、高親和性トランスポーターとして GLUT1, GLUT3 および GLUT4 が存在する。以前の報告より、骨芽細胞で GLUT4 の発現を低下させると、*in vitro* の骨芽細胞におけるインスリン刺激によるグルコース取り込みが低下し、骨芽細胞の増殖と分化が抑制される。さらに、GLUT4 は、生体内では、隣接する骨格筋と同様に、骨芽細胞、骨細胞および軟骨細胞にも発現している。そこで、本研究では、高グルコース濃度下での LPS 刺激により誘導される IL-6 および IL-1 α の発現に対する GLUT4 の効果に着目した。GLUT4 阻害剤である WZB117(1.0 µM)は、培養 7 日目および 14 日目の IL-6 および IL-1 α の遺伝子発現に対する LPS およびグルコースの刺激作用をブロックした (図 3a および 3b)。これらの結果は、グルコースが GLUT4 を介して LPS による骨芽細胞の IL-6 および IL-1 α の発現を促進することを示している。

さらに、整形外科手術後には、IL-6 とグルコースの血漿濃度が上昇するのに対し、osteocalcin (OCN)の血漿濃度は低下することが報告されている。また、2 型糖尿病患者 108 名は、非糖尿病患者と比較して、血漿中の IL-6 濃度が上昇し、血漿中の OCN 濃度が低下していた。これらの研究から、炎症が高血糖と OCN の発現に相関している可能性が明らかになった。そこで、本研究では、LPS+グルコース刺激が、LPS 存在下での骨芽細胞の OCN の遺伝子発現に及ぼす影響を調

図 1

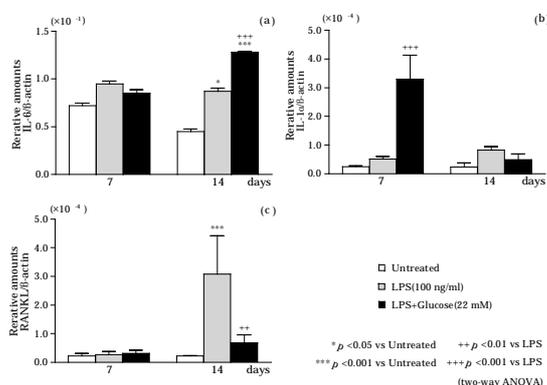
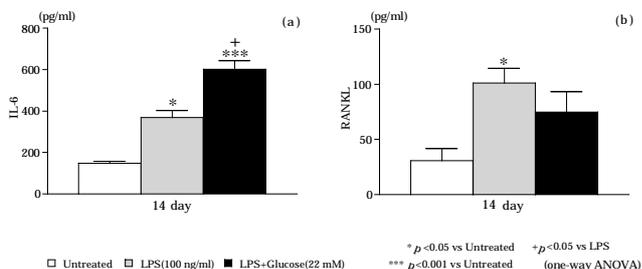
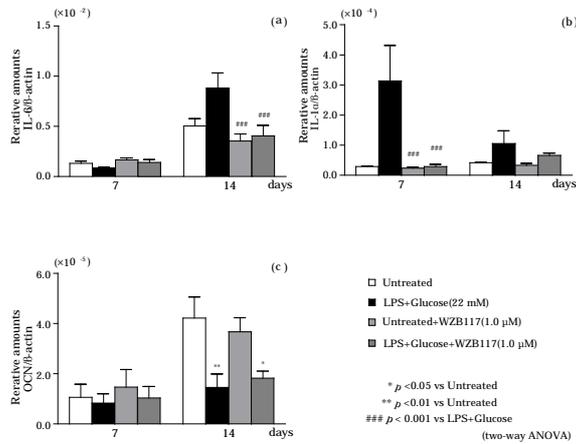


図 2



べた。LPS+グルコース刺激は LPS 単独刺激と比較して、OCN の遺伝子発現が低下することが示された。さらに、LPS+グルコースによる OCN の遺伝子発現低下の GLUT4 の関与を調べた。そ

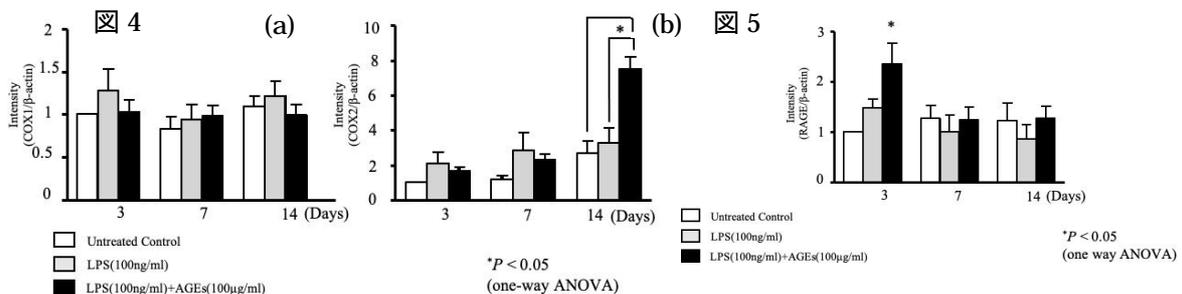
図 3



の結果、LPS + GLUT4 阻害剤は、高グルコース濃度下で LPS を刺激した骨芽細胞の OCN の遺伝子発現に影響を及ぼさなかった (図 3c)。これらの結果から LPS + グルコース刺激による OCN 発現の低下は GLUT4 を介さないことが明らかになった。

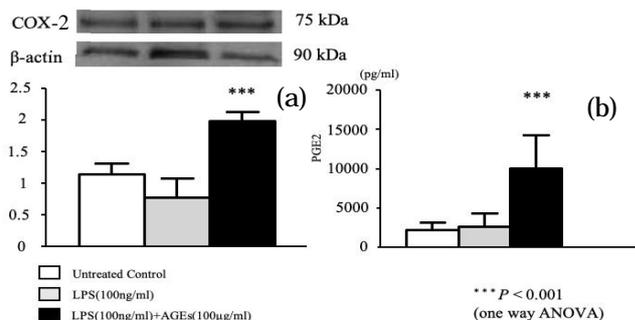
(3) 生体内で AGEs は、糖尿病などの高血糖状態で生成され、高濃度 AGEs は、糖尿病性合併症の発症に関連していることが報告されている。また、AGEs は、生体の全ての組織および体液で生成され、生体内に蓄積する。生体内での AGEs のメイラード反応は、生体外で生じるメイラード反応よりも低い温度で進む。加えて、生体内での AGEs の蓄積は、インスリン抵抗性上昇に起因する糖尿病の増加に関連していると報告されている。そこで申請者らは、(2)で得られた結果から、AGEs が骨芽細胞での LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。

その結果、AGEs は骨芽細胞の LPS 誘導性の炎症性サイトカイン IL-1α、IL-6 および RANKL の遺伝子発現に影響を示さなかった。一方で、アラキドン酸カスケードの代謝産物で、炎症性生理活性物質である PGE₂ 合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ-1(COX-1)およびシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)の遺伝子発現を調べた。COX-1 遺伝子発現はすべての条件および培養日数での発現の変化は認められなかったが、COX-2 の遺伝子発現は、LPS 単独刺激と比較して、培養 14 日目に LPS+AGEs 刺激によって上昇することが示された (図 4b)。さらに AGEs の受容体 RAGE の遺伝子発現も LPS+AGEs で LPS 単独刺激と比較して減少することが示された (図 5)。



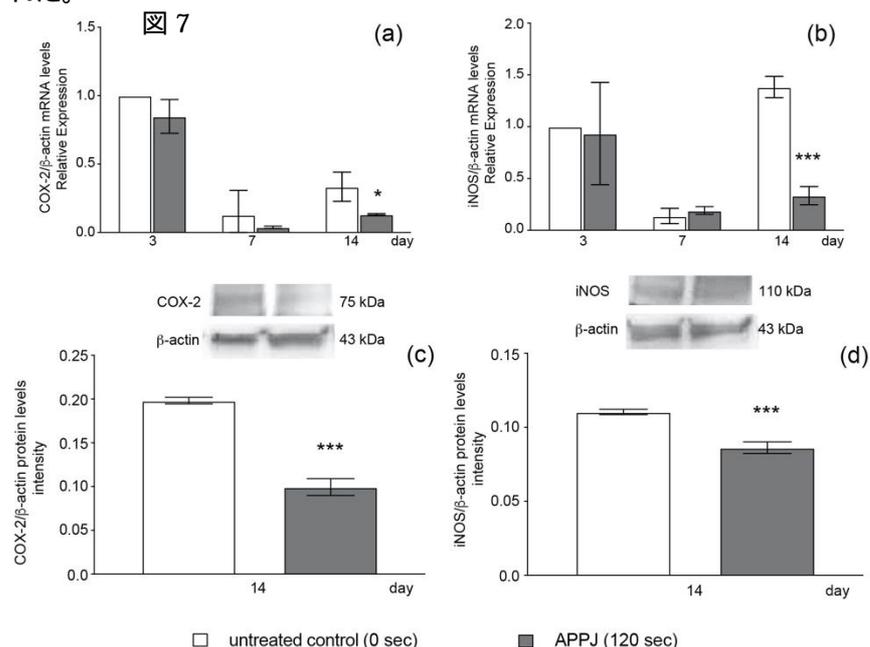
次に、COX-2 のタンパク発現および PGE₂ 産生量を調べた結果、COX-2 のタンパク発現は、培養 14 日目で LPS + AGE 刺激が LPS 単独刺激と比較して、上昇した。さらに、LPS+AGEs 刺激は、PGE₂ 産生量は培養 14 日目で LPS 単独刺激と比較して増加が認められた (図 6)。

図 6



(4) (1)-(3)の研究成果より、グルコースと AGEs は、骨芽細胞の LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生および炎症で上昇する生理活性物質 PGE₂ を促進する可能性が示唆された。すなわち、グルコースや AGEs は骨芽細胞の LPS 誘導性の炎症を促進する可能性が示された。そこで、申請者らは、大気圧低温窒素プラズマが炎症を抑えるのではないかと考え、細胞培養培地に大気圧低温窒素プラズマを 120 秒間照射したものを骨芽細胞に刺激し、iNOS と COX-2 の遺伝子およびタンパク発現を調べた。その結果、培養 14 日目で大気圧低温窒素プラズマ刺激は、無刺激と比較して、iNOS および COX-2 の遺伝子発現を減少させた。さらに、iNOS および COX-2 のタンパク発現も遺伝子発現と同様な結果が得られた (図 7)。

以上の結果より、大気圧低温窒素プラズマは、骨芽細胞へ抗炎症的に作用する可能性が示唆された。



まとめると、これらの研究結果より、高血糖状態または高血糖状態によって生成された AGEs は、歯周病の炎症の原因の 1 つである LPS による炎症を増悪させる可能性が示めされた。さらに(4)の関連実験により、大気圧低温窒素プラズマはこれらで増悪させた炎症を抑制する可能性が示された。

(2)の研究成果は、Kato S, Tanabe N, Nagao M, Sekino J, Tomita K, Sakai M, Abe K, Suzuki N, Ueda K. (2020) Glucose transporter 4 mediates LPS-induced IL-6 production in osteoblasts under high glucose conditions. *J Oral Sci*, 62(4), 423-426 に掲載されている。

(3)の研究成果は、結果をまとめ論文を作成しており、今年度中に論文投稿する予定である。

(4)の研究成果は、Sato R, Namura Y, Tanabe N, Sakai M, Utsu A, Tomita K, Suzuki N, Motoyoshi M. (2021) Atmospheric Pressure Plasma Treatment with Nitrogen Induces Osteoblast Differentiation and Reduces iNOS and COX-2 Expressions. *J Hard Tissue Biology*, 30(2), 131-136 に掲載されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Shunichiro, Tanabe Natsuko, Nagao Mayu, Sekino Jumpei, Tomita Keiko, Sakai Mayu, Abe Kimiko, Suzuki Naoto, Ueda Koichiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Glucose transporter 4 mediates LPS-induced IL-6 production in osteoblasts under high glucose conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 423 ~ 426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.20-0010	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 Sato Ryoichi, Namura Yasuhiro, Tanabe Natsuko, Sakai Mayu, Utsu Akihisa, Tomita Keiko, Suzuki Naoto, Motoyoshi Mitsuru	4. 巻 30
2. 論文標題 Atmospheric Pressure Plasma Treatment with Nitrogen Induces Osteoblast Differentiation and Reduces iNOS and COX-2 Expressions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.30.131	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shunichiro Kato, Natsuko Tanabe, Jumpei Sekino, Naoto Suzuki, Abe Kimiko, Kouichiro Ueda
2. 発表標題 Hyperglycemia affects the expression of inflammatory cytokine in osteoblasts derived by LPS.
3. 学会等名 The 97th General Session of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤駿一郎, 田邊奈津子, 昔農淳平, 酒井真悠, 阿部仁子, 鈴木直人, 植田耕一郎
2. 発表標題 糖尿病が骨芽細胞のLPS誘導性炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第70回 日本大学歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 酒井真悠, 田邊奈津子, 加藤駿一郎, 鈴木直人, 植田耕一郎
2. 発表標題 終末糖化産物AGEsが骨芽細胞の骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第71回 日本大学歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田景子, 田邊奈津子, 鈴木直人, 佐藤秀一
2. 発表標題 Advanced glycation end productsは骨芽細胞のCOX2発現を促進させる
3. 学会等名 第72回 日本大学歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Tomita, Natsuko Tanabe, Takashi Kato, Noriyuki Arai, Naoto Suzuki, Shuichi Sato
2. 発表標題 Advanced glycation end products promote the COX2 expression of osteoblasts
3. 学会等名 106th Annual Meeting, American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究分担者	鈴木 直人 (SUZUKI Naoto) (10226532)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	酒井 真悠 (SAKAI Mayu)	日本大学・歯学部 (32665)	
研究協力者	加藤 駿一郎 (KATO Shunichiro)	日本大学・歯学部 (32665)	
研究協力者	佐藤 諒一 (SATO Ryoichi)	日本大学・歯学部 (32665)	
研究協力者	富田 景子 (TOMITA Keiko)	日本大学・歯学部 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関