

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17051

研究課題名(和文)低酸素環境下でLPSと最終糖化産物が糖尿病関連歯周炎の病態に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Study of effects of advanced glycation end-products and LPS under hypoxia on the pathological condition of diabetes-associated periodontitis

研究代表者

生田 貴久 (IKUTA, Takahisa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：00746563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低酸素環境下で最終糖化産物(AGEs)やLPSが糖尿病(DM)関連歯周炎の病態に及ぼす影響を検討した。低酸素環境は口腔上皮細胞のリポカリン2(LCN2)やIL-6の発現を減少させた。AGEsはLCN2やIL-6の発現を増加させ、低酸素環境はその効果を低下させたが、LPSは効果を示さなかった。シグナル伝達経路のMAPKやNF- $\kappa$ Bは低酸素環境やAGEsにより複雑な増減変化を示した。正常酸素濃度下でAGEs誘導されたLCN2は好中球のIL-6発現を低下させ、遊走性を促進させた。AGEsによる口腔上皮細胞由来LCN2は、糖尿病関連歯周炎の病態に複雑な影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は糖尿病関連歯周炎の病態研究に関して、従来から行われてきたLPSやAGEsによる炎症性サイトカイン発現への検討だけでなく、低酸素環境にある歯周ポケット内での反応性やこれまでに調べられていない炎症反応関連因子のリポカリン2(LCN2)による糖尿病関連歯周炎への関与について検討を行った。この結果、低酸素環境は、炎症関連因子や歯周組織細胞に関連する因子の発現やシグナル伝達機構に対して非常に複雑な影響を与えることが判明した。また、口腔上皮細胞由来のLCN2は、好中球の炎症反応に対して複雑な作用を示すことが分かった。今後それぞれの因子や経路に関してさらに詳細な検討が必要となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of advanced glycation end-products (AGEs) and lipopolysaccharide (LPS) on the pathological condition of diabetes-associated periodontitis under hypoxia. Hypoxia decreased the expressions of lipocalin 2 (LCN2) and IL-6 in oral epithelial cells. AGEs increased LCN2 and IL-6 expressions, however, LPS did not show any effects. The phosphorylation of MAPK and NF- $\kappa$ B in signal transduction pathway were complicatedly influenced by AGEs and a hypoxia. AGEs-induced LCN2 in epithelial cells promoted a migration of neutrophils and reduced its IL-6 expression. LCN2 is induced by AGEs in oral epithelial cells and may complicatedly influence the formation of pathological conditions of diabetes-associated periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病関連歯周炎 最終糖化産物 LPS 低酸素環境 リポカリン2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の歯周炎(糖尿病関連歯周炎)では、歯周組織炎症の重症化が見られる場合がある。糖尿病関連歯周炎の病態形成には、歯周病原細菌の LPS 等の病原因子だけではなく、糖尿病合併症の原因物質である最終糖化産物 (AGEs) の影響も考えられており、これらの因子による歯周炎症の重症化機構が研究されている。歯周炎は、嫌気性状態(低酸素環境)にある歯周ポケット内で炎症や組織破壊の様々な反応が生じる。一方、低酸素環境は低酸素誘導因子(HIF-1 $\alpha$ )を介して様々な炎症反応の誘導に関与している。これらのことから、糖尿病関連歯周炎の病態解明には低酸素環境、AGEs 及び歯周病原細菌由来 LPS などの病原因子が歯周組織や細胞にどのような影響を与えているかを解明することが重要と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病関連歯周炎の歯周ポケット内で生じる炎症反応の増悪機構を明らかにするために、低酸素環境、最終糖化産物(AGEs)及び *P.gingivalis*-LPS(P-LPS)の炎症関連反応への影響とこれらに関連するシグナル伝達経路の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞の培養及び生存率: ヒト口腔上皮細胞(TR146, Dr. Herzberg より供与)とヒト歯肉線維芽細胞(CRL-2014, ATCC より購入)を、10%ウシ胎児血清を含む Ham'2 F12 及び DMEM 培地を用いて通法に従い細胞培養した。低酸素環境は、O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 培養器を用いて酸素濃度を 1~1.8% とした。上皮細胞の生存率は、1.8%O<sub>2</sub> 下で 24~72 時間培養後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo 社)を用いて測定した。また、AGEs は、Okazaki らの方法 (Calcif Tissue Int, 2012) の改良法により BSA と DL-グリセロアルデヒドを用いて調製し、P-LPS は、リガンドタイプが TLR2 と TLR2/TLR4(InvivoGen 社)の 2 種類を用いた。AGEs と P-LPS の細胞の作用時間は 24 時間とした。

(2) DNA マイクロアレイ解析: 先の所属分野で行われた DNA マイクロアレイ分析(Human Gene 1.0 ST Array; Affymetrix)のデータから TR 細胞及びヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) の低酸素培養下(1%O<sub>2</sub>, 24 時間)での遺伝子発現への影響を解析した。結果は、各遺伝子について低酸素環境 (Hypoxia) と正常酸素濃度環境 (Normoxia) での発現の比率を評価した。

(3) 遺伝子発現分析: DNA マイクロアレイのデータ解析の結果から変動が認められた主要な遺伝子の発現については低酸素環境下で培養した口腔上皮細胞 (TR146 細胞) から通法に従い cDNA を合成し、各種プライマーを用いて定量的 PCR (Real-time PCR) を行い、遺伝子発現レベルを検討した。

(4) 蛋白発現分析: 低酸素環境で細胞中に蓄積される低酸素誘導因子(HIF-1 $\alpha$ )、AGE 受容体 (RAGE)及び TLR2 の蛋白発現は、それぞれの抗体を用いたウェスタンブロットティング(WB)法により蛋白質の発現を検討した。また、シグナル伝達経路を調べるために ERK, p-30 及び JNK の MAPK と転写因子の NF- $\kappa$ B のリン酸化への影響についても WB を行い分析した。さらに、上皮細胞から分泌された LCN2 と IL-6 についてそれぞれの ELISA キットを用いてその量を定量した。

(5) 上皮細胞の LCN2 遺伝子のノックダウンと好中球との共培養: LCN2 の好中球への作用を検討するために遺伝子導入試薬により siLCN2 を上皮細胞に導入し、LCN2 遺伝子をノックダウンさせた。LCN2 ノックダウンさせた上皮細胞を AGEs で刺激後、DMSO にて好中球様細胞に分化させた HL-60 と Transwell システムを用いて共培養する。共培養した好中球様細胞から RNA を分離し、定量的 PCR 法にて IL-6 発現への上皮細胞由来 LCN2 の影響を検討する。また、LCN2 による好中球の遊走への影響について共培養した好中球をクリスタルバイオレット染色し、位相差顕微鏡で観察することにより遊走した好中球数を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 低酸素環境の細胞生存率への影響: 口腔上皮細胞(TR146)を 1.8% O<sub>2</sub> 環境下で 72 時間まで培養した。細胞生存率は、培養 24 時間までは低酸素環境と通常酸素濃度環境で有意差は認められなかったが、48 時間以降 72 時間まで低酸素環境により細胞生存率の有意な低下が生じた(図 1)。

(2) 低酸素環境の遺伝子発現に及ぼす影響: 口腔上皮細胞と歯肉線維芽細胞を 24 時間低酸素培養し、遺伝子発現について低酸素培養群と正常酸素培養群との比率を解析した(図 2 と 3)。その結果、低酸素環境などに関連する ADM や VEGF の遺伝子は低酸素環境により両細胞ともに発

現が増加し、HIF-1 $\alpha$ は減少した。上皮細胞では炎症に関連する因子でも変化が分かれ、IL-6 と LCN2 は低酸素環境により発現が低下し、IL-8 と TNF- $\alpha$ では増加した。

図1 低酸素環境が及ぼす細胞生存率への影響 (口腔上皮細胞)

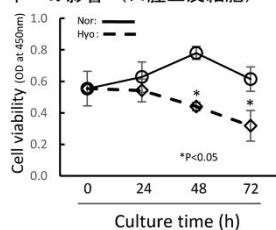


図2. 低酸素環境が口腔上皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

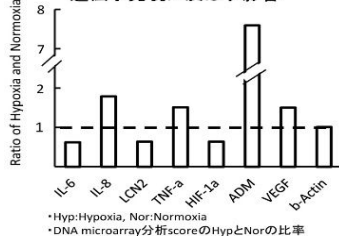
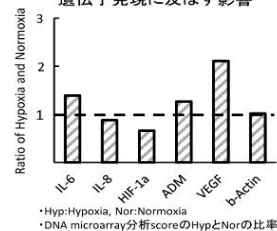


図3. 低酸素環境が歯肉線維芽細胞の遺伝子発現に及ぼす影響



(3) HIF-1 $\alpha$ , RAGE 及び TLR2 の発現に及ぼす低酸素環境, P-LPS 及び AGEs の影響: 上皮細胞を低酸素環境下で培養した場合, 正常酸素濃度下で培養した場合と比較して HIF-1 $\alpha$ の蓄積増加が認められた(図4)。使用した上皮細胞は RAGE を発現していたが, そのレベルは低酸素環境と正常酸素濃度下で差は無く, AGEs や P-LPS によっても変化は認められなかった(図4)。さらに, TLR2 についても発現は認められたが, 低酸素環境下で変化は無く, 正常酸素濃度下で AGEs + P-LPS 群で軽度の増加傾向が認められた(図4)。

図4. 低酸素環境下でのHIF-1 $\alpha$ 発現とLPSとAGEのRAGEとTLR2発現に及ぼす影響

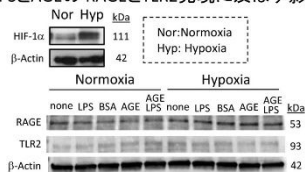


表1. 遺伝子発現へのLPSとAGEの影響 (Normoxia)

Gene	None	LPS	BSA	AGE	AGE+LPS
IL-6	1	1.06	1.41	3.07	3.07
TNF- $\alpha$	1	0.78	0.91	1.21	1.26
LCN2	1	1.04	1.31	2.23	2.02
CLDN1	1	1.32	1.53	1.91	2.16

表2. 遺伝子発現へのLPSとAGEの影響 (Hypoxia)

Gene	None	LPS	BSA	AGE	AGE+LPS
IL-6	0.47	0.44	0.62	1.04	1.78
TNF- $\alpha$	1.02	0.7	0.87	1.03	1.44
LCN2	0.78	0.59	0.76	0.99	1.28
CLDN1	0.70	0.66	0.71	1.03	1.60

(4) 口腔上皮細胞における低酸素環境, P-LPS 及び AGE による遺伝子発現への影響: DNA マイクロアレイ解析の結果に基づき, 口腔上皮細胞における低酸素環境下での遺伝子発現への P-LPS と AGE の影響を Real-time PCR 法で検討した結果, 低酸素環境により炎症に関連する IL-6 と LCN2, 及び細胞間タイト結合蛋白の CLDN1 等の発現低下が認められた(表1と2)。TNF- $\alpha$ は有意な変化は認められなかった。炎症に関連する IL-6 と LCN2 については正常酸素濃度下では, AGE により発現増加が認められたが, P-LPS による変動は見られなかった。また, AGE による IL-6 と LCN2 の発現増加のレベルは, 正常酸素濃度時と比較して低酸素環境では低下した(表1と2)。

(5) 口腔上皮細胞における低酸素環境, P-LPS 及び AGE による LCN2 と IL-6 の発現への影響: 歯周病学分野でこれまで報告がなかった LCN2 について蛋白質レベルで, 低酸素環境, P-LPS 及び AGE による発現への影響を ELISA 法により検討したところ, 遺伝子発現と類似した結果を得た。すなわち, 正常酸素濃度下では, AGE により LCN2 発現が増加したが, P-LPS では影響は認められず, AGE+P-LPS についても AGE 単独の増加と有意な差は無かった(図5)。低酸素環境下では, AGE により LCN2 の増加傾向は認められるが, 正常酸素濃度下と比較して増加レベルは弱いものであった(図5)。この AGE による LCN2 発現への影響は, IL-6 発現においても同様の影響が認められた(図6)。

図5 低酸素環境下でのLCN2発現に及ぼすP-LPSとAGEの影響

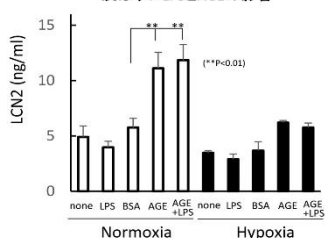
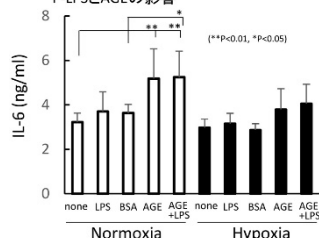


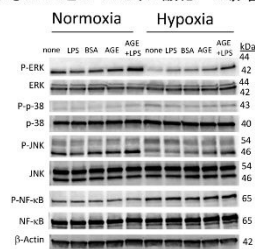
図6 低酸素環境下でのIL-6発現に及ぼすP-LPSとAGEの影響



(6) 低酸素環境下での P-LPS 及び AGE による MAPK と NF- $\kappa$ B のリン酸化への影響: 低酸素環境, P-LPS 及び AGE のシグナル伝達のクロストークについて検討を行った。MAPK の ERK のリン酸化 (P-ERK) は, 正常酸素濃度下では AGE により軽度の, AGE+P-LPS により明らかな ERK のリン酸化亢進が見られた。しかしながら P-LPS 単独による変化は認められなかった。一方, 低酸素環境ではどの群についても正常酸素濃度下と比較して ERK リン酸化の低下が認められ, また, AGE と AGE+P-LPS による増加以外に P-LPS 単独によるリン酸化の増加も認められた(図7)。p-38 のリン酸化については, ERK と異なり, 正常酸素濃度下と比較して低酸素環境下でリン酸化が亢進した。正常酸素濃度下では AGE や AGE+P-LPS によりリン酸化の軽度の増加が認められたが, 低酸素環境下では, 全体レベルの増加により AGE によるリン酸化亢進はマスクされてしまった(図7)。また, JNK については正常酸素濃度下ではどの群も p46 SAPK/JNK のリン酸化が強く, 低酸素環

境下ではこのリン酸化蛋白のレベルが正常酸素濃度群と比較して低い、AGE や AGE+P-LPS によりリン酸化の亢進が見られた(図7)。転写因子 NF- $\kappa$ B についてはどの群についても、低酸素環境では正常酸素濃度下よりリン酸化レベルの増加が見られ、低酸素環境下の AGE+P-LPS 群での軽度の増加を除いて、正常酸素濃度下と低酸素濃度下のどの群間にも NF- $\kappa$ B のリン酸化の変化は認められなかった(図7)。これらの結果から、低酸素環境、P-LPS 及び AGE による MAPK や NF- $\kappa$ B を介したシグナル伝達経路については、一定の傾向は判断しにくく、非常に複雑な反応を示すことが分かった。

図7 低酸素環境下でのP-LPSとAGEによるMAPKとNF- $\kappa$ Bのリン酸化への影響



(7) 口腔上皮細胞由来 LCN2 による好中球への影響: LCN2 は炎症や糖尿病との関連性が報告されているが、歯周病や糖尿病関連性歯周炎との関連性については殆ど知られていない。また、上記の本研究結果から AGE により上皮細胞における LCN2 の発現が増加することが判明し、その傾向は低酸素環境下でも認められたが、正常酸素濃度下でより明確であった。そこで、先ず、正常酸素濃度下での上皮細胞由来 LCN2 の歯周炎に関連する影響について検討を行った。上皮細胞と好中球様細胞(分化 HL-60)の共培養実験において、siLCN2 導入により LCN2 をノックダウンさせた上皮細胞と分化 HL-60 細胞を共培養させた場合、好中球様細胞の IL-6 発現は増加した(図8, J Periodontal Res 2020)。この結果から、上皮細胞由来 LCN2 は、好中球での IL-6 発現をネガティブに制御していることが示唆された。また、両細胞の共培養系から好中球様細胞の遊走性を調べた結果、口腔上皮細胞の AGE 刺激により好中球の遊走性は亢進したが、LCN2 をノックダウンさせた上皮細胞と共培養した場合は、好中球の遊走性は有意に減少し、上皮細胞由来の LCN2 が好中球の遊走性に影響を及ぼしていることが示唆された(図9, J Periodontal Res 2020)。これらの結果から、口腔上皮細胞由来 LCN2 は、糖尿病合併症の原因物質である AGEs により発現が増加され、上皮細胞から分泌された LCN2 は、歯周病を伴う歯周組織中の好中球の遊走性を亢進する一方、IL-6 発現を抑制することにより糖尿病関連歯周炎の病態形成に複雑な影響を及ぼしている可能性が示唆された。

図8 LCN2の好中球IL-6発現への影響

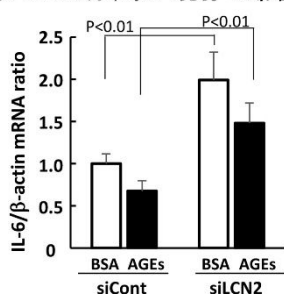
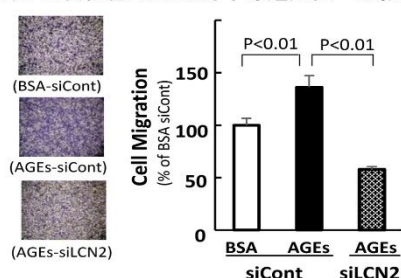


図9 上皮細胞LCN2の好中球遊走性への影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kido Rie, Hiroshima Yuka, Kido Jun ichi, Ikuta Takahisa, Sakamoto Eijiro, Inagaki Yuji, Naruishi Koji, Yumoto Hiromichi	4. 巻 55
2. 論文標題 Advanced glycation end products increase lipocalin 2 expression in human oral epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 539 ~ 550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12741	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木戸 理恵, 廣島 佑香, 生田 貴久, 稲垣 裕司, 板東 美香, 成石 浩司, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 最終糖化産物による口腔上皮細胞の Lipocalin2 発現誘導は好中球の遊走性とサイトカイン発現を調節する
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸理恵, 廣島佑香, 生田貴久, 吉田賀弥, 稲垣裕司, 成石浩司, 尾崎和美, 木戸淳一, 湯本浩通
2. 発表標題 最終糖化産物はヒト口腔上皮細胞のリポカリン2発現を増加する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------