

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10131

研究課題名(和文)糖尿病患者の歯周病重症化におけるIL-1作用と老齢性テストステロン低下の相乗効果

研究課題名(英文) Pathophysiology of periodontitis progression by IL-1 and geriatric impaired testosterone in diabetic patients

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉線維芽細胞において、テストステロンは細胞のIL-1b, IL-6および可溶性gp130の産生も誘導しなかった。興味あることに、0nMのテストステロンは細胞のMMP-1産生を亢進した。さらに、0.5, 5, 50nMのテストステロン刺激によって細胞のMMP-1産生は濃度依存的に減少する傾向にあった。さらに、この条件に加えて高グルコース条件下で培養した細胞は、より一層のMMP-1産生を誘導した。すなわち、糖尿病の高齢者においては、細菌感染がなくても、さらに歯周病が重症化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

老齢性テストステロン低下が歯周組織のMMP-1産生を誘導することは、言い換えると、高齢になると「細菌感染」がなくても歯周組織のコラーゲン線維が破壊されるという新たな老年性歯周炎の病態機序を説明し得るエビデンスとなった。さらに重要なことに、この条件に加えて高グルコース条件下で培養した細胞は、より一層のMMP-1産生を誘導したことから、糖尿病関連歯周炎は高齢者においてさらに重症化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Testosterone did not induce IL-1b, IL-6 and sgp130 in human gingival fibroblasts (HGFs). MMP-1 expression was significantly induced in HGFs treated without testosterone, and the expression was gradually suppressed in HGFs treated with dose-dependent Testosterone. Interestingly, MMP-1 expression was significantly induced in HGFs cultured with high glucose conditions treated without testosterone. These results showed that periodontitis may be more severe in elderly diabetic patients, in case of without bacterial infection.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病関連歯周炎

## 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 (2016 年厚労省)、糖尿病は「国民を悩ます」疾患として広く認知されている。また、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)、その病態機序は未だ不明である。

我々は、高グルコースが歯肉線維芽細胞の 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) の存在下において、IL-6 が血管内皮増殖因子 (VEGF) の産生を亢進することを報告した (Omori et al, J Biol Chem, 2004)。さらに、高グルコースがマクロファージの IL-1 や sIL-6R の産生を誘導し、それら分子の相互作用によって歯肉線維芽細胞の蛋白分解酵素 MMP-1 の産生が亢進し、結果的に糖尿病患者の歯周病が重症化する病態機序を示した (Lew et al, Cell Physiol Biochem, 2018)。このことは、高グルコースが誘導する歯肉線維芽細胞とマクロファージのクロストークの促進によって糖尿病関連歯周炎が重症化する可能性を示唆するが、その病態機序の全容は不明である。

我が国は超高齢社会に突入している。最近、日本人の糖尿病患者の平均年齢は、実に男性が 71.4 歳、女性が 75.1 歳に達していると報告された (2017 年、日本糖尿病学会)。したがって糖尿病関連歯周炎の病態機序を明らかにするためには、高グルコースという糖尿病関連因子に加えて 高齢・老齢因子が歯周組織細胞に与える影響を考慮する必要がある。

最近、高齢化に相応して代表的な男性ホルモンであるテストステロンの血中濃度が緩やかに減少し、この低下曲線がフレイルを基礎・背景因子とする多くの老年疾患の発症年代と合致することが知られるようになった。また、糖尿病患者においては血中のテストステロン濃度が低下することが明らかになっており、糖尿病関連歯周炎の重症化機序を探る上で、歯周炎病巣内の炎症カスケードに及ぼす “テストステロン低下” の影響は無視できない重要な要素であると考えられる。

Maggio らは高齢者を対象にした横断研究によって、血中のテストステロン値と sIL-6R レベルは逆相関することを示した (J Clin Endocrinol Metab, 2006)。一方、Daltaban らは遊離テストステロンの血中濃度の低下と歯周病の進行が統計学的に有意に関連したと報告した (横断研究) (J Periodontol, 2006)。さらに、最近、Gonçalves らは、精巣を除去してテストステロン濃度を低下させたラットに実験的歯周炎を惹起すると、歯周炎病巣中の骨吸収サイトカイン “IL-1” のレベルが上昇し、それに相応して歯槽骨吸収が促進したと報告した (J Periodontol, 2018)。これら一連の研究報告は、老齢性テストステロン低下が歯周病の重症化を誘発する可能性を示唆するが、低テストステロンが誘導する IL-1 の産生機序はもちろん、その作用を請け負う標的細胞すら明らかにされていない。すなわち、複数の状況証拠はあるものの、歯周病の重症化における老齢性テストステロン低下の細胞生物学的な作用機序の詳細は全く明らかになっていない。

我々は、歯周炎病巣における IL-1 産生に着目し、これまでに、(1) S100A9 は歯肉線維芽細胞の IL-1 産生を誘導する (Nishikawa et al, J Cell Physiol, 2017)、(2) 高グルコースは THP-1 マクロファージの IL-1 産生を誘導する (Lew et al, Cell Physiol Biochem, 2018, *in press*)、ことを報告してきた。この歯肉線維芽細胞およびマクロファージを標的とした IL-1 産生系において、高グルコースと老齢性テストステロン低下による相乗的な作用は不明であり、糖尿病関連歯周炎の重症化機序を明らかにする上で、これらの要素は重要な基礎・背景因子になると思われる。一方、我々は、横断的臨床研究において、糖尿病患者の歯肉溝滲出液中に IL-1 や sIL-6R が有意に高く検出されることを見出した (Lew et al, Cell Physiol Biochem, 2018, *in press*)。さらに IL-1 は、歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を劇的に誘導して歯周炎病巣内の IL-6 カスケードを強力に亢進するので (Sawada et al, Biomed Res, 2013)、IL-1 の直接作用とその下流に存在する IL-6 作用との相乗効果にも着目し、それら分子間ネットワークにおける低テストステロンが及ぼす細胞学的影響の探索は重要な研究課題であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、超高齢社会の到来を鑑みて、テストステロン低下を基礎・背景因子とした糖尿病関連歯周炎の細胞生物学的な重症化機序を探索し、将来の新規診断システムの確立・治療戦略の立案を目指すことである。

### 3. 研究の方法

#### 【臨床研究】

<対象> 徳島大学病院歯周病科を受診した 17 名の慢性歯周炎患者 (35 歳 ~ 89 歳) 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)。  
<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 中のテストステロンレベルとした。  
<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。

#### 【細胞研究】

<細胞> 歯肉線維芽細胞 CRL-2014 を用い、通常にしたがい、FBS を 10% の割合に含む DMEM 培地で培養した。また、培養条件は、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。  
<試薬> テストステロンは Sigma 社から購入して用いた。テストステロンの刺激濃度は 0 ~ 50nM とした。  
<炎症関連因子の産生性の検討> 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, IL-6, 可溶性 gp130, MMP-1, TIMP-1)。

### 4. 研究成果

- (1) 歯周病患者における炎症部位と健常部位の 2 群において、GCF 中のテストステロンレベルに有意差はなかった。
- (2) テストステロンは、歯肉線維芽細胞の IL-1, IL-6 および可溶性 gp130 の産生性に影響を与えなかった。
- (3) テストステロンが含まれない培地で培養した歯肉線維芽細胞では、MMP-1 産生が亢進した。
- (4) 高グルコース条件下で培養すると、テストステロンが含まれない培地で培養した歯肉線維芽細胞の MMP-1 産生がさらに亢進した。この MMP-1 産生はテストステロン濃度依存的に抑制された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>西川 泰史, 成石 浩司, 木戸 淳一, 湯本 浩通   | 4. 巻<br>63            |
| 2. 論文標題<br>高グルコース条件下における歯肉線維芽細胞のカルプロテクチン誘導性炎症関連因子の産生におけるスタチンの抑制効果  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>日本歯科保存学雑誌  | 6. 最初と最後の頁<br>503-511 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.11471/shikahozon.63.503   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Yoshioka S, Miyamoto T, Satomi J, Tada Y, Yagi K, Shimada K, Naruishi K, Shikata E, Yamaguchi I, Yamaguchi1 T, Korai M, Okayama Y, Harada M, Kitazato K, Kanematsu Y, Nagahiro S, Takagi Y | 4. 巻<br>1             |
| 2. 論文標題<br>Disequilibrium of plasma protease/anti-protease due to severe periodontal disease contributes to human subarachnoid hemorrhage  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Neurosurgery Open  | 6. 最初と最後の頁<br>-       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/neuopn/okaa007   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Koji Naruishi  | 4. 巻<br>12            |
| 2. 論文標題<br>Carotenoids and Periodontitis   | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Nutrients  | 6. 最初と最後の頁<br>-       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/nu12010269   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>成石浩司, 坂本英次郎, 生田貴久, 木戸理恵, 木戸淳一, 湯本浩通  | 4. 巻<br>63            |
| 2. 論文標題<br>講義および実習試験の評価による歯周病学教育のあり方の考察  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>日本歯科保存学雑誌  | 6. 最初と最後の頁<br>22-29   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.11471/shikahozon.63.22  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Naruishi K, Wada-Mihara C, Oishi K, Nagata T   | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Dental students' awareness after clinical training between dental treatment and systemic health: A questionnaire-based survey | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Dental Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fdmed.2021.740441  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木戸淳一, 廣島佑香, 木戸理恵, 稲垣裕司, 成石浩司, 湯本浩通 |
| 2. 発表標題<br>無細胞蛋白質合成系を用いた抗菌ペプチドの合成とリボソーム封入     |
| 3. 学会等名<br>第152回日本歯科保存学会春期学術大会                |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>秋月皆人, 二宮雅美, 植村勇太, 生田貴久, 成石浩司, 湯本浩通          |
| 2. 発表標題<br>PCRを用いたPorphyromonas gingivalis迅速検出システムの有用性 |
| 3. 学会等名<br>第153回日本歯科保存学会秋期学術大会                         |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>二宮雅美, 生田貴久, 成石浩司, 湯本浩通              |
| 2. 発表標題<br>重度慢性歯周炎を有する血液透析患者に対して包括的歯周治療を行った一症例 |
| 3. 学会等名<br>第151回日本歯科保存学会秋期学術大会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>野中康平, 板東美香, 木戸淳一, 稲垣裕司, 坂本英次郎, 成石浩司, 湯本浩通 |
| 2. 発表標題<br>ショウガオールはヒト歯肉線維芽細胞においてAGEs誘導性の酸化ストレスを抑制する  |
| 3. 学会等名<br>第62回日本歯周病学会秋期学術大会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Nishikawa Y, Naruishi K, Yumoto H.  |
| 2. 発表標題<br>Diabetic High-Glucose Condition Enhances Calprotectin-induced Inflammatory Responses in Gingival Fibroblasts. |
| 3. 学会等名<br>97th International Association for Dental Research, General Session & Exhibition (国際学会)                       |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                       | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 木戸 淳一<br><br>(KIDO Jun-ichi)<br><br>(10195315)   | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授<br><br><br>(16101) |    |
| 研究分担者 | 二宮 雅美<br><br>(NINOMIYA Masami)<br><br>(10291494) | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教<br><br><br>(16101)  |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|