

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791629

研究課題名（和文）糖尿病ラットモデルにおける歯周組織の骨吸収因子発現の検討

研究課題名（英文）The expression of bone resorption factors in gingival tissue of the experimental periodontitis using the diabetic model rats.

研究代表者

菊池 毅（KIKUCHI TAKESHI）

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：40421242

研究成果の概要（和文）：

実験的歯周炎を惹起した糖尿病モデルラットでは、骨吸収量が多く重篤な歯周炎が認められた。この機序として LBP 遺伝子発現の増加により、歯周病関連細菌菌体成分である LPS の感受性が亢進することが考えられた。また、Th2 反応の減弱により、歯周組織の防御機構が低下することが考えられた。これらのことから、糖尿病を併発している患者における歯周病の増悪に関する生物学的メカニズムの一端が示された。

研究成果の概要（英文）：

The results of the present study indicate that the role of diabetes in modulating bone destruction in periodontal disease may involve increased level of LBP and reduced levels of Th2 cytokines. A better understanding of infectious bone resorption in diabetes and the immune response could explain the relationship between periodontitis and diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学・糖尿病

1. 研究開始当初の背景

歯周病と糖尿病の関係を検討した疫学的研究は、その結果に多少のばらつきがみられるものの、両者の間に有意な相関を示しているものが多い。両者の関係は、相互に影響を及ぼすと考えられるが、両疾患の関与機序に関する詳細なメカニズムについては、推論の域をでていない。

2. 研究の目的

血糖コントロール不良は局所の歯周組織においても炎症反応を助長し、歯周組織破壊を進行させ、歯周病のリスクファクターとなるという仮説をたてた。そこで糖尿病を伴った歯周病の局所歯肉における骨吸収に関するサイトカイン等の発現を検索

し、糖尿病の歯周病への影響が、局所歯肉での炎症・免疫応答の増強並びに低回転型の骨代謝によるものであることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物および実験方法

生後 8 週齢雄, Zucker Diabetic Fatty (ZDF/Cr1-*Lepr^{fa/fa}*) ラット (ZDF) (実験群) および Lean (ZDF/Cr1-*Lepr^{fa/+}* or Wild (+/+)) ラット (Lean) (コントロール群) とともに、ジエチルエーテル全身麻酔下で、上顎右側第二臼歯 (M2) に縫合用ナイロン糸 (3-0 Surgiron®) を全周にまいて近心口蓋で結紮し、実験的歯周炎を惹起させた。また、上顎左側第二臼歯 (M2) は無処置で対照側とした。

(2) 体重測定, 血清中グルコース濃度・中性脂肪濃度測定

実験的歯周炎惹起後, ZDF, Lean とともに 8, 10, 12, 14, 16 週齢の体重を測定し, 体重増加の推移を確認した。また, 8 週齢 ZDF 及び Lean より血液採取を行い, 血清中のグルコースと中性脂肪の濃度測定は株式会社ビー・エム・エルに委託した。

(3) マイクロ CT

歯槽骨の形態学的変化を同一個体にて経時的に観察するために, 実験的歯周炎惹起後, 0, 14, 28, 42, 56 日において, *in vivo* microCT を使用し, 撮影した。近心頰側根頰側のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離 (CEJ-AB) とセメントエナメル境から近心頰側根根尖までの距離 (歯根長) とを計測し, 歯槽骨吸収率は CEJ-AB の歯根長に対する歯槽骨吸収を百分率で表した。

(4) RNA 抽出, マイクロアレイ

実験的歯周炎惹起 2, 7 日後, 上顎右側第二臼歯頰側歯肉を採取し, Total RNA をチオシアン酸グアニジン-フェノール-クロロホルム法にて抽出した。遺伝子発現解析は, Agilent Whole Rat Genome オリゴ DNA マイクロアレイを用いて 2 色法にてハイブリダイゼーションした。ZDF 群において Lean 群に比較し発現差が見られる遺伝子を検索した。

(5) 定量的 Real-time PCR 法

トータル RNA より, 通法に従い逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。TaqMan® Gene Expression Assays を使い, 通法に従い 95°C 1 分, 52°C 1 分, 72°C 30 秒, 40 サイクルの反応を, ABI Prism 7000 にて行った。データ解

析は Ct 値の差から相対定量を行う $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて行った。

マイクロアレイの結果から選択された遺伝子について, 定量的 Real-Time PCR 法により確認実験を行った。

(6) 統計学的解析

体重や血清中のグルコース濃度, 中性脂肪濃度, Real-time PCR 法を用いた遺伝子発現に関する ZDF 群と Lean 群の平均値の差の検定には, student *t*-test を用いて統計学的に検討し, 危険率は $p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$ をもって有意とした。

歯槽骨の骨吸収率は, ZDF 群と Lean 群の差を two-way ANOVA 用いて統計学的に検討し, 危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。また, 各時間での ZDF 群と Lean 群の平均値の差の検定には, student *t*-test を用いて統計学的に検討し, 危険率は $p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$ をもって有意とした。

また, 実験結果はすべて平均±標準誤差で示した。

4. 研究成果

(1) 体重, 血清中グルコース濃度, 中性脂肪濃度

両群ともに実験期間中, 動物の体重は順調に増加した。ZDF 群は Lean 群に比較し, 8, 10, 12, 14 週において有意に重い体重差 ($p < 0.05$) を認めた。

両群 8 週齢で, 血清グルコース濃度に関して, ZDF 群は Lean 群に比較し, 有意に高い値 ($p < 0.05$) を示した。血清中性脂肪濃度に関して, ZDF 群は Lean 群に比較し, 有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。

(2) 歯槽骨の形態学的変化

実験的歯周炎を惹起しマイクロ CT を用いて歯槽骨を観察した結果, 両群ともに, 経時的に骨吸収の増加が認められ, ZDF 群でより顕著な骨吸収を認めた。また, 実験的歯周炎を惹起した第二臼歯の近心頰側根の骨吸収率は, ZDF 群で Lean 群に比較し 14, 28, 42, 56 日において有意に高かった ($p < 0.01$)。

(3) 歯肉における遺伝子の網羅的解析 (実験的歯周炎惹起 2 日後)

マイクロアレイにより, ZDF 群での Lean 群に比較し 2 倍以上の発現差が認められる既知遺伝子は 18 遺伝子, 0.5 倍以下の発現差が認められる既知遺伝子は 92 遺伝子だった。対照側 (歯周炎非惹起側) において

は、2 倍以上の発現差が認められる既知遺伝子は 45 遺伝子、0.5 倍以下の発現差が認められる既知遺伝子は 23 遺伝子だった。

ZDF 群で Lean 群に比較し 1.5 倍以上の発現差を示す遺伝子群の中で、3 回の同実験のうち 2 回以上同じ傾向を示した遺伝子は Lipopolysaccharide binding protein (LBP), Spondin 1, complement component 7 (complement 7), Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4(PDK4), Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (CXCL12) であった。また、これらの候補遺伝子を定量的 Real-time PCR にて検討した結果、ZDF 群で Lean 群に比較し LBP の遺伝子発現差が有意に高かった ($p < 0.05$)。このことは炎症の初期において歯周組織構成細胞が LPS に反応し、LBP の産生を亢進したのではないかと考えられる。LBP により、LPS による初期の炎症反応は増大するとこれまでに報告されている。歯槽骨吸収の亢進と LBP の発現亢進がリンクしていることから、LPS の反応性を増加させている可能性が考えられる。他 4 遺伝子においても、ZDF 群で Lean 群に比較し遺伝子発現差が高い傾向を示した。

上記候補遺伝子に関して、対照側（歯周炎非惹起側）においても、定量的 Real-time PCR にて検討したところ有意な遺伝子発現の差を認めなかった。

(4) 歯肉における遺伝子の網羅的解析（実験的歯周炎惹起 7 日後）

マイクロアレイにより、ZDF 群で Lean 群に比較し 2 倍以上の発現差が認められる既知遺伝子は 74 遺伝子、0.5 倍以下の発現差が認められる既知遺伝子は 32 遺伝子だった。対照側（歯周炎非惹起側）においては、ZDF 群で Lean 群に比較し 2 倍以上の発現差が認められる既知遺伝子は 33 遺伝子、0.5 倍以下の発現差が認められる既知遺伝子は 37 遺伝子だった。

ZDF 群で Lean 群に比較し 0.67 倍以下の発現差を示す遺伝子群で 3 回の同実験のうち 2 回以上同じ傾向を示す遺伝子としては IL-24 が挙げられた。IL-24 のほかに、Th1/Th2 バランスに関与するサイトカインも含め、解析を定量的 Real-time PCR を用いて行った。ZDF 群で Lean 群に比較し、IL-24、IL-10 が有意に低い発現を認めた ($p < 0.05$)。一方、IL-2 の遺伝子発現は、ZDF 群で Lean 群に比較し有意に高い発現差を認め ($p < 0.05$)、IFN- γ 、IL-12 についても発現差の高い傾向を認めた。Th1 細胞は歯周組織の破壊、一方で Th2 細胞は防御的に働いているとの報告がある。今回の結

果は、糖尿病の併発が、歯周病局所における Th2 反応の低下を引き起こし、ひいては骨吸収の増加を引き起している可能性を示唆している。

さらにマイクロ CT の結果より歯槽骨吸収が著明に認められたため、骨吸収に関与する RANKL、OPG、IL-6 についても、定量的 Real-time PCR にて検討することにした。RANKL、OPG の遺伝子発現は、ZDF 群と Lean 群の間で有意な差は認められなかったが、IL-10 の低発現 ($p < 0.05$) に呼応するように、IL-6 の発現は有意な差は認めなかったものの高い傾向を示した。糖尿病の存在下で IL-10 産生の抑制が、IL-6 産生の増加ひいては骨吸収量の増加に繋がっている可能性が示唆された。対照側（歯周炎非惹起側）においては、これらの遺伝子について大きな遺伝子発現の差を認めなかった。

以上の結果から、実験的歯周炎を惹起した糖尿病モデルラットでは、コントロールと比較し、骨吸収量が多く重篤な歯周炎が認められた。この機序として LBP 遺伝子発現の増加により、歯周病関連細菌菌体成分である LPS の感受性が亢進することが考えられた。また、Th2 反応の減弱により、歯周組織の防御機構が低下することが考えられた。さらに、IL-6 の遺伝子発現が高い傾向を示し、骨吸収を促進することが考えられた。これらのことから、糖尿病を併発している患者における歯周病の増悪に関する生物学的メカニズムの一端が示された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 4 件）

- ①. 惣ト響子, 菊池 毅, 木下幸子, 野口英俊: 糖尿病疾患モデルラットにおける歯周組織の遺伝子発現の検討 第 72 回愛院大歯学会 (2008 年 6 月 1 日, 名古屋)
- ②. 惣ト響子, 菊池 毅, 木下幸子, 野口英俊: 糖尿病疾患モデルラットにおける歯周組織の遺伝子発現の検討 第 51 回日本歯周病学会秋期学術大会 (2008 年 10 月 19 日, 名古屋)
- ③. T. Noguchi, K. Soboku, S. Fujita, T. Kikuchi: Study of gene expression

in gingival tissue of the experimental periodontitis using the diabetic model rats. Europerio6 (June 5. 2009, Stockholm, Sweden)

- ④. T. Noguchi, K. Soboku, S. Fujita, T. Kikuchi: Study of gene expression in gingival tissue of the experimental periodontitis using the diabetic model rats. The 95th annual meeting of the American Academy of Periodontology (Sep 14. 2009, Boston, USA)

[図書] (計0件)

[産業財産権] なし

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 毅 (KIKUCHI TAKESHI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号: 40421242

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし