

機関番号：33902

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792135

研究課題名(和文) 高血糖状態での歯周病原細菌菌体成分に対する樹状細胞の反応性について

研究課題名(英文) The responsiveness of dendritic cells against periodontitis-associated bacterial components at high glucose condition.

研究代表者

藤田 幸子 (FUJITA SACHIKO)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70532993

研究成果の概要 (和文)：

マウス脾臓より分離した樹状細胞を通常血糖量及び高血糖量で培養したところ、CD80、CD86の細胞表面発現量、IL-12p35、IL-12/IL-23p40、IFN-gamma の遺伝子発現量、IL-12/IL-23p40の産生量は高血糖量で培養した方が高い発現量を示した。また、*A. actinomycetemcomitans* 由来 LPS 刺激によりその発現差が顕著になった。一方、IL-4、IL-10 の遺伝子発現量は、培養中血糖量の違いで差を認めなかった。以上から、高血糖状態は、樹状細胞を刺激しており、歯周病原細菌菌体成分に対する反応性を増強している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

High levels of CD80 and CD86 expressions, IL-12p35, IL-12/IL-23p40, IFN-gamma gene expressions and IL-12/IL-23p40 production were confirmed in dendritic cells isolated from mouse spleen cultured with high glucose. On one hand, there were no differences of IL-4 and IL-10 gene expressions between high glucose and low glucose condition. These results showed that high glucose condition stimulates dendritic cells and leads to increase the responsiveness against periodontitis-associated bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2010年度	1,400,000円	420,000円	1,840,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000円	960,000円	4,180,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、糖尿病、樹状細胞、Periodontal Medicine

1. 研究開始当初の背景

(1) 2015年には4人に1人が65歳以上になると推計されている超高齢化社会の到来が間近に迫った我が国において、国民のQOLのためには生活習慣病群の病因解明、治療法の確立が急務である。その中でも、生活習慣病と考えられているⅡ型が90%以上をしめる糖尿病は、現在患者数が激増している。日

本において糖尿病が強く疑われる人は820万人、糖尿病の可能性を否定出来ない人は1,050万人で合わせると実に1,870万人にのぼる(H18年国民健康・栄養調査概要)。これは成人の約4人に1人が糖尿病かその予備軍となる計算である。また、糖尿病が強く疑われる人のうち、治療を受けているのはその約半数に過ぎない。糖尿病に罹患しても、自

覚症状はほとんどないが、放置することで、3大合併症と呼ばれる神経障害、網膜症、腎症を発症する。また、動脈硬化を促進させ、脳梗塞や心筋梗塞が起こりやすくなる。これらの発症は著しく Activity of Daily Living(ADL)を阻害し、国民医療費高騰の原因となっている。また、同じく生活習慣病である歯周疾患は、40歳以上の国民の80%以上が、歯肉に何らかの病的所見のあることが歯科疾患実態調査により明らかとなっている。細菌感染により歯肉に生じた炎症は、歯槽骨を吸収させ、歯が喪失するに至る。成人以後の抜歯原因のほとんどが、歯周病によるものであり、糖尿病同様、著しく ADL を阻害している。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) 以前に、我々は、自然発症 type2 糖尿病モデルである Zucker Diabetic Fatty Rat(ZDF)ラットに実験的歯周炎を惹起させたところ、歯槽骨吸収が顕著であった。また、マイクロアレイによる同ラット歯肉における網羅的遺伝子解析を行い、その生物学的メカニズムの候補となる因子(Lipopolysaccharide Binding Protein 等)を同定した。さらに、同ラット歯肉では、Th1タイプのサイトカイン遺伝子発現が優位であった(Soboku K. *et al.*, submitted)。血糖コントロール不良は、終末糖化物質(AGE)の産生を介して、全身のおよび局所的な炎症反応を助長する。また、コラーゲンの合成阻害や白血球機能の低下を介して創傷治癒を遅延させる。これらは歯周組織の破壊を進行させる可能性が考えられる。しかし、血糖コントロール不良による歯肉、歯槽骨への影響を、炎症、免疫学的な見地から考察した研究は少ない。そこで、我々は高血糖状態では歯周組織における免疫応答がより増強し、歯周組織の破壊を促進するという仮説をたてた。

2. 研究の目的

(1) 我々は、歯周組織における免疫応答で重要な役割を担っている樹状細胞に着目した。樹状細胞は有能な抗原提示細胞であり、ナイーブ T 細胞を活性化する唯一の細胞である。さらに Th1 や Th2 タイプへの分化を誘導する。樹状細胞は、刺激を受けると一般的にリンパ節に遊走するが、歯周病局所のような慢性炎症を起こしている部位では、その場で成熟し局所リンパ球を刺激する。

(2) 今回、我々は *in vitro* のモデルを使用して、歯周組織の免疫応答に重要な役割を担う樹状細胞を歯周病原細菌由来 Lipopolysaccharide(LPS)と高血糖状態で培養することにより、樹状細胞からのサイトカインの産生状況や樹状細胞の成熟度並びに T 細胞に対する分化誘導能や T 細胞、NK 細胞からのサイトカイン産生誘導能を検討する。本研究の結果より、糖尿病の歯周病への影響が、歯周組織局所での炎症、免疫応答の増強によるものであることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：8週齢の雌 C57BL/6 マウスを実験に供する。

(2) 樹状細胞：8週齢の雌 C57BL/6 マウスの脾臓中の樹状細胞を CD11c マイクロビーズで磁気標識し、自動磁気分離装置 (Auto MACS®) を使用し樹状細胞を分離する。

(3) 高血糖状態での樹状細胞培養：分離した樹状細胞は培養条件を二群に分ける。すなわち高血糖量 (4500 mg/L{以下 High Glucose}) と通常血糖量 (1100mg/L{以下 Normal Glucose}) を含んだ細胞培養液でそれぞれ培養する。

(4) 歯周病原細菌菌体成分での樹状細胞刺激：以下の実験において樹状細胞は、歯周病原細菌 (*A.actinomycetemcomitans*{以下 A.a}) 由来 LPS (100ng/mL) にて刺激を行い、反応性を検討する。

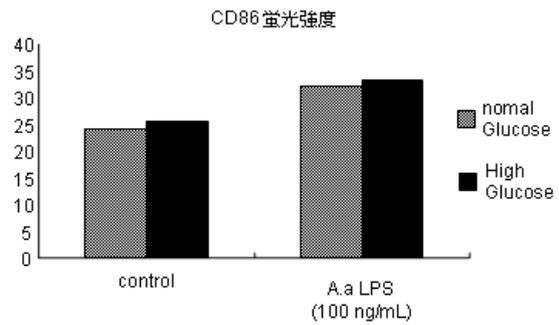
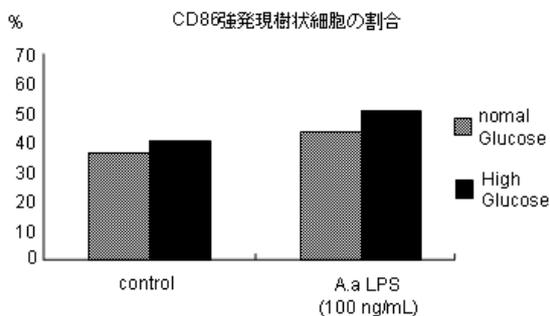
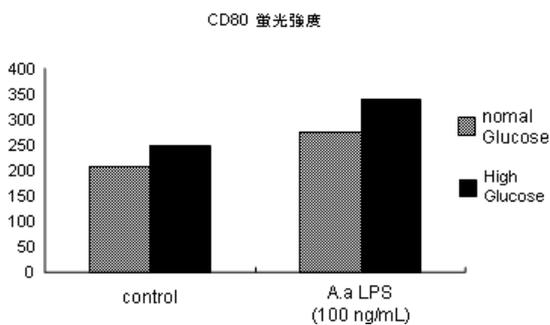
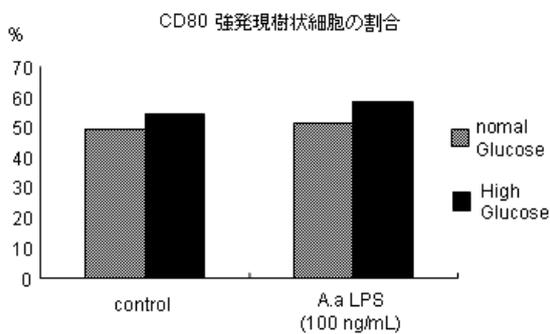
① 表面抗原の発現測定 (Flow cytometry)：樹状細胞を 1.0×10^6 cells に調整後、A.a 由来の LPS (100ng/mL) を添加し、5%CO₂ 存在下にて 2 時間培養した樹状細胞を、PE 標識抗 MHC CLASS II 抗体、FITC 標識抗 CD11c 抗体、PE 標識抗 CD80 抗体、PerCP 標識抗 CD80 抗体で染色し、FACScan を用いて測定、CELL Quest にて解析する。

② 遺伝子発現の検討 (Real-time PCR)：樹状細胞を 1.0×10^6 cells に調整後、A.a 由来の LPS (100ng/mL) を添加し、5%CO₂ 存在下にて 2 時間培養した樹状細胞より、totalRNA を NucleoSpin®RNA II を用いて抽出し、Real-time PCR 法を用いてマウス IL-2、IL-4、IL-10、IL-12p35、IL-12p40 TNF- α 、IFN- γ 遺伝子発現量の測定を行う。Real-time PCR 方は、ABI Peism7000 を使用する。遺伝子発現の差違は、 $\Delta \Delta C_T$ 法により計算する。

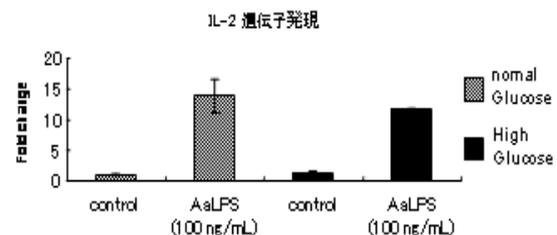
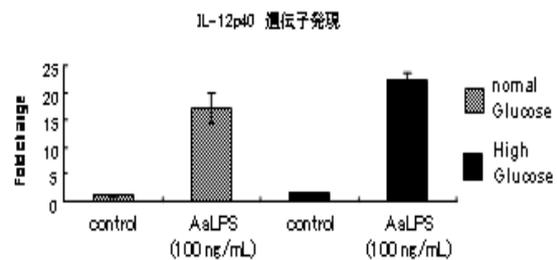
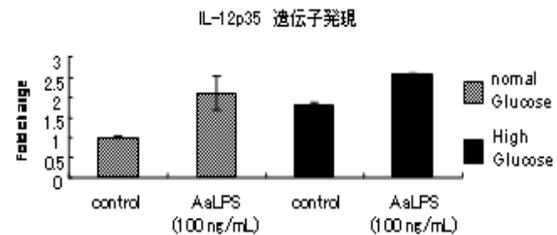
③ タンパク量の測定 (EAISA) : 樹状細胞を 1.0×10^6 cells に調整後、A.a 由来の LPS (100ng/mL) を添加し、5%CO₂ 存在下にて 24 時間樹状細胞を培養する。同培養上清中のサイトカイン濃度は、マウス IL-10、IL-12/IL-23p40、IFN- γ ELISA キットを用いて測定する。

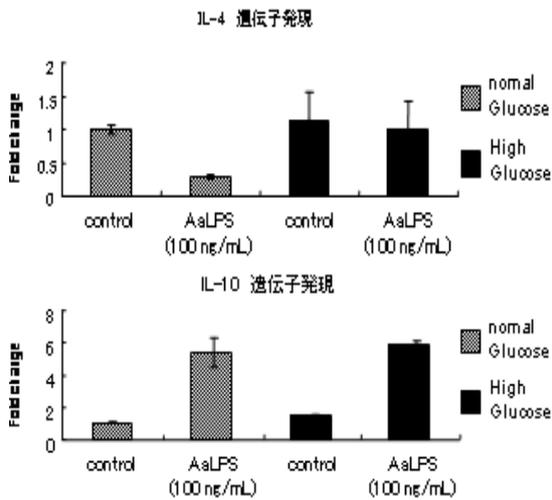
4. 研究成果

(1) 表面抗原の発現測定 (Flow cytometry) : コントロール群の High Glucose 群と Normal Glucose 群で比較すると、High Glucose 群の方が樹状細胞の活性化マーカーである CD80 と CD86 の発現が高かった。さらに、A.a-LPS (100 ng/mL) の刺激によりその発現差が顕著になる傾向を示した。

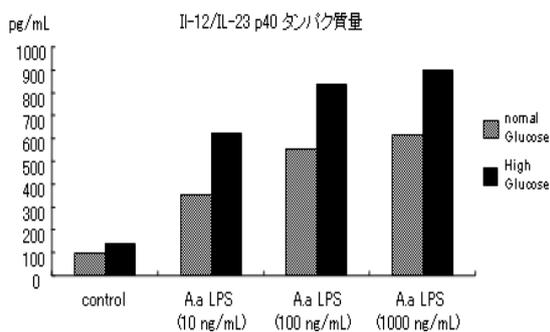


(2) 遺伝子発現の検討 (Real-time PCR) 遺伝子発現 : IL-12p35 の遺伝子発現は A.a のコントロール群と比較すると High Glucose 群が Normal Glucose 群に比べ高い値を示した。また、A.a-LPS (100 ng/mL) 刺激による遺伝子発現がそれぞれ増加した。IL-12p40 の遺伝子発現では LPS の刺激のない状態では Normal Glucose 群と High Glucose 群で差は見られなかったが、LPS 刺激による遺伝子発現の増加量は High Glucose 群が Normal Glucose 群に比べ多かった。IL-2、IL-4、IL-10 については差が見られなかった。





(3) タンパク量の測定：IL-12/IL-23p40 のタンパク量は High Glucose 群が Normal Glucose 群に比べ、高かった。また、LPS (10・100・1000 ng/mL) 濃度依存的に High Glucose 群、Normal Glucose 群ともに高くなった。*A. a*-LPS 刺激によりその産生量の差が顕著になった。IL-10、IFN- γ は検出限界以下であった。



(4) 以上から、高血糖状態は、樹状細胞を刺激しており、歯周病原細菌菌体成分に対する反応性を増強している可能性が示唆された。本研究の結果より、歯周病への糖尿病の影響が、歯周局所での炎症、免疫応答の増強によるものであることが示唆された。本研究のように、糖尿病の歯周組織への影響を炎症・免疫応答の面から考察した研究は少なく、糖尿病と局所の歯周病との相互の関連を明らかにする新たな研究分野の展開にもつながると考えられ、本研究を行うことは独創的かつ有意義である。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 幸子 (FUJITA SACHIKO)

研究者番号：70532993

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：