

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21084

研究課題名（和文）歯肉上皮バリア機能に対する統合ストレス（ISR）の関与の解明

研究課題名（英文）Involvement of Integrated Stress (ISR) in Gingival Epithelial Barrier Function

研究代表者

生川 由貴（Narukawa, Yuki）

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員

研究者番号：40910188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：高血糖状態の歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の発現低下に伴ってROSの産生亢進を認めた。抗酸化剤であるNACは、同細胞間接着分子の発現低下に対する有意な阻害効果を認めた。さらに、高血糖状態の歯肉上皮細胞において、統合ストレス応答に属する転写因子ATF4の発現低下とERK1/2リン酸化の亢進およびNACによるERK1/2リン酸化の阻害効果が認められた。以上より、高血糖状態は歯肉上皮細胞において、ERK1/2が活性化することにより、細胞間接着分子の発現低下を引き起こし、そのメカニズムとして、酸化ストレスや統合ストレス応答の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、糖尿病の病態である高血糖が歯周病を悪化させる一因を歯肉上皮細胞の細胞間接着分子に着目し、そのメカニズムを解析したものである。高血糖状態の歯肉上皮細胞において活性酸素の産生亢進やATF4の発現低下を認め、酸化ストレスや統合ストレス応答と関連していることが示唆された。これらの研究成果は、糖尿病患者の歯周病悪化を予防する抗酸化剤などの新薬開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：The decreased expression of intercellular adhesion molecules was observed in hyperglycemic gingival epithelial cells as a result of the increase in ROS. NAC, an antioxidant, significantly inhibited the decreased expression of intercellular adhesion molecules in hyperglycemic gingival epithelial cells. Furthermore, the expression of ATF4, a transcription factor as a family of the integrated stress response, was decreased or ERK1/2 phosphorylation was increased in gingival epithelial cells under hyperglycemia, and NAC had an inhibitory effect on ERK1/2 phosphorylation. These results suggest that hyperglycemia induces a decrease in the expression of intercellular adhesion molecules by activating ERK1/2 in gingival epithelial cells and that oxidative stress and integrative stress responses are involved as the mechanism of these responses.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 糖尿病 歯肉上皮細胞 細胞間接着分子 酸化ストレス 統合ストレス

1. 研究開始当初の背景

歯周病はデンタルプラークの蓄積により歯周組織の破壊が進行する慢性炎症性疾患であり、国民の8割が罹患していると報告されている(厚生労働省 平成23年歯科疾患実態調査)。歯周病は糖尿病の第6番目の合併症として位置づけられており、糖尿病は歯周病増悪の重大なリスク因子として認知されている。糖尿病と歯周病の関係については、ピマインディアンを対象とした疫学研究以来、多くの臨床研究報告がなされており、糖尿病は歯周病のリスクを約3倍増加させること、高血糖になることで歯周病の発生率の上昇や歯槽骨欠損が進行することなどが報告されている(Emrich LJ et al., J Periodontol 1991)。歯周病の病態は歯周ポケット内に蓄積したデンタルプラークに対する宿主応答の結果として形成される。いわゆる歯周病菌と生体が直接対峙する部位は歯肉上皮である。歯周組織における歯肉上皮の役割としては、細菌等の外来異物の刺激に対してサイトカイン・ケモカインを産生することで、歯周組織の免疫反応や炎症反応に寄与する、というものと歯周病菌の侵襲に対して物理的なバリアーとなる、という2つが挙げられる。1つ目に挙げた上皮の生体応答に対する高血糖の影響に関しては、当研究室において *in vitro* の実験系にてヒト歯肉上皮細胞を高血糖状態で培養することにより、組織への好中球の遊走を促す IL-8 の産生が亢進し、代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) を認識する細胞表面レセプターである Toll like receptor (TLR) 2 発現が上昇することにより、免疫応答に異常をきたすと報告している(Kashiwagi Y et al., Oral Dis 2016)。一方、2つ目に挙げた歯肉上皮の物理的なバリア機能は、他の組織の上皮組織と同様に、上皮細胞間の接着分子により維持されている。その主な構成は、Claudin、Occludin、ZO-1 などで構成される Tight Junction と、E-cadherin により構成される Adherens Junction が知られている。近年、糖尿病の病態である高血糖状態が腸管上皮の物理的バリアに負の影響を及ぼし得るとの報告がなされ、腸管免疫にも影響を及ぼすことが注目されているが、歯肉上皮への影響についての検討は報告されておらず、申請者は高血糖により歯肉上皮細胞の細胞間接着分子の発現低下が誘導されることを *in vitro* およびマウス *in vivo* 実験系において明らかにした。一般的に細胞に取り込まれた糖は解糖系からクエン酸回路に入り、ATP の産生に利用されるが、高血糖に伴い取り込まれる糖の量が増えると、解糖系経路だけでは処理しきれなくなり、解糖系の迂回経路であるポリオール代謝の亢進(Chung SS et al., J Am Soc Nephrol 2003)や AGEs の組織内での蓄積 (Murata T et al., Diabetologia 1997) (Yang et al., Calcif Tissue Int 2016) (Vlassara H et al., Proc Natl Acad Sci U S A 1992)、プロテインキナーゼ C (PKC) シグナルの異常な活性化(Inoguchi T et al., Diabetes 2000)、細胞内に取り込まれた酸素(O₂)の代謝過程で、スーパーオキシド(O₂⁻)、ヒドロキシラジカル(OH)などのフリーラジカルや過酸化水素(H₂O₂)などの活性酸素(Reactive Oxygen Species :ROS) が異常に産生される酸化ストレスの亢進(Yao D et al., Diabetes 2010)などが報告されている。しかしながら、これらの病態生理学的機序が歯肉上皮のバリア機能に影響を及ぼし得るか否かについては明らかにされておらず、その詳細な分子機序については未だ不明である。統合的ストレス応答(integrated stress response : ISR)は主に生存促進、恒常性維持のためのプログラムであり、制御を受け活性化される遺伝子群は、ストレスに対して保護的な細胞応答を惹起するものと考えられている。一方で、強いストレスにさらされると、細胞死に向かってシグナル伝達が促進されるとの報告もあり(Karolina Pakos-Zebrucka et al., EMBO Reports 2016)、そのメカニズムについては十分に解明されていない。そこで、慢性的な高血糖による歯肉上皮細胞のバリア機能減弱に対する ISR のシグナル伝達の関与について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究は、歯周病のリスク因子として知られている糖尿病の主たる病態である高血糖が歯周組織局所に及ぼす影響を明らかにするため、高血糖状態が歯肉上皮の細胞間接着を修飾するメカニズムを明らかにすることを目的とした。その作用機序として、酸化ストレスや統合的ストレス応答に着目した。本研究により、高血糖による細胞間接着分子低下のメカニズムが解明されることで、糖尿病患者の歯周病悪化を予防できる可能性があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 高血糖状態の歯肉上皮における酸化ストレスの影響に関する解析

- ①高血糖の影響を検討するため、表皮角化細胞増殖用培地(倉敷紡績株式会社、大阪、日本)(Humedia-KG2®)のグルコース濃度を正常血糖(5.5 mM D-glucose)および高血糖(30 mM D-glucose)に調整し、歯肉上皮細胞(epi 4)を14日間培養した。OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)を使用し、測定はFLUOROSKAN ASCENT (Thermo Fisher Scientific)(励起波長 480 nm、蛍光波長 530 nm)にて、活性酸素の量を蛍光強度で検出した。
- ②抗酸化剤である 1mM N-acetyl-cysteine (SIGMA-ALDRICH Inc.)(NAC)を添加し、NGのみ、HGのみ、NGとNAC、HGとNACの4条件にてepi 4を14日間培養した。14日後、全RNAの抽出およびcDNAの作製を行い、高血糖による細胞間接着分子の発現低下に対する阻害効果について、Real time PCR法にてClaudin1のmRNA発現を検討した。

- ③ epi 4 を NG と HG で 14 日間培養後、高血糖による MAPK のリン酸化を Western Blot 法にて検討した。
- ④ epi 4 を NG のみ、HG のみ、NG と NAC、HG と NAC の 4 条件にて epi 4 を 14 日間培養後、高血糖による MAPK のリン酸化に対する NAC の影響を Western Blot 法にて検討した。

(2) 高血糖状態の歯肉上皮における ISR 経路の影響に関する解析

ISR 機構における転写因子の ATF4 は、下流遺伝子である SOD1、HO-1 などの抗酸化酵素群を発現させることで ROS の産生を抑制すると考えられる。

- ① epi 4 を NG および HG 条件で 14 日間培養後、Real time PCR 法にて ATF 4 の mRNA 発現を検討した。

4. 研究成果

- (1) ① 歯肉上皮細胞における ROS の蓄積を測定したところ、高血糖条件において有意な ROS の産生亢進を認めた(図 1)。
- ② 抗酸化剤である NAC を添加したところ、高血糖状態の歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の発現低下に対して、NAC による有意な阻害効果を認めた(図 2)。
- ③ MAPK シグナルに対する高血糖の影響を検討するため、MAPK のリン酸化を Western Blot 法にて比較解析したところ、高血糖状態では有意な ERK1/2 リン酸化の亢進が認められた(図 3)。
- ④ さらに、高血糖状態の epi 4 に NAC を添加して 14 日間培養したところ、高血糖状態の epi 4 における ERK1/2 リン酸化の亢進に対して NAC の有意な阻害効果が認められ、酸化ストレス応答が ERK1/2 を介したシグナル伝達経路に関与していることが示唆された(図 4)。これらの結果から、高血糖状態は歯肉上皮細胞の酸化ストレスを増大させ ERK1/2 が活性化することにより、細胞間接着分子の発現低下を引き起こしていることが示唆された。
- (2) ① 同上条件で培養した epi 4 における ATF4 の遺伝子発現変化について、Real time PCR 法にて検討したところ、高血糖は ATF4 の発現を低下させる傾向が認められた(図 5)。これらより、高血糖は歯肉上皮細胞の統合ストレス応答に関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、高血糖状態の歯肉上皮における細胞間接着分子の低下のメカニズムの一因として、酸化ストレスや ISR 機構が関与していることが示唆された。

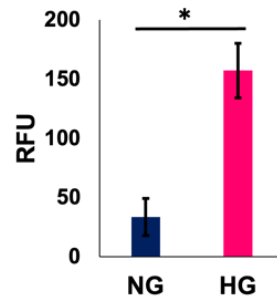


図 1. epi 4 における ROS の蓄積

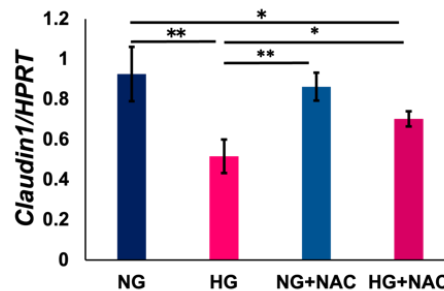


図 2. epi 4 の Claudin1 の変化に対する NAC の影響

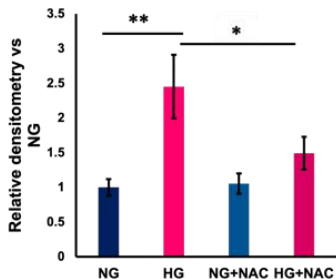
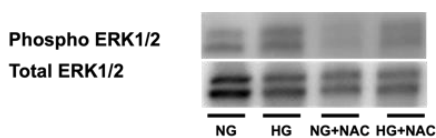


図 4. 高血糖状態の epi 4 における ERK1/2 の発現変化に対する NAC の効果

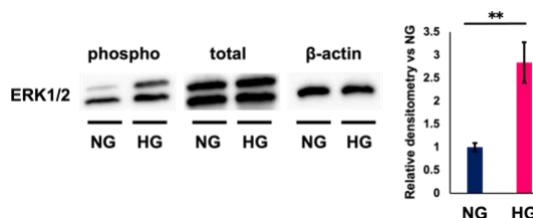


図 3. epi 4 における ERK1/2 の発現変化

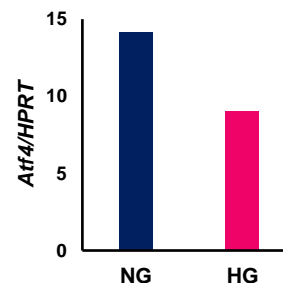


図 5. epi 4 における ATF4 の発現変化

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 1件）

1. 著者名 Yoichiro Kashiwagi, Shunsuke Aburaya, Naoyuki Sugiyama, Yuki Narukawa, Yuta Sakamoto, Masatomo Takahashi, Hayato Uemura, Rentaro Yamashita, Shotaro Tominaga, Satoko Hayashi, Takenori Nozaki, Satoru Yamada, Yoshihiro Izumi, Atsunori Kashiwagi, Takeshi Bamba, Yasushi Ishihama, and Shinya Murakami	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis induces entero-hepatic metabolic derangements with alteration of gut microbiota in a type 2 diabetes mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97868-2.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Yuki Narukawa, Naoyuki Sugiyama, Jiro Miura, Rentaro Yamashita, Shotaro Tominaga, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Yasushi Ishihama, Yoichiro Kashiwagi, Shinya Murakami	4. 巻 in press
2. 論文標題 Chronic hyperglycemia reduces the expression of intercellular adhesion molecules and increases intercellular hyperpermeability in the periodontal epithelium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.13140	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永翔太郎、生川由貴、柏木陽一郎、村上伸也
2. 発表標題 歯周病による高血糖増悪に対するFXRの関与の検討
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生川由貴、柏木陽一郎、富永翔太郎、三浦治郎、村上伸也
2. 発表標題 血糖状態の歯肉上皮における細胞間接着低下とAGEsの関与
3. 学会等名 第157回日本保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永翔太郎、生川由貴、柏木陽一郎、村上伸也
2. 発表標題 歯周病による高血糖増悪に対する腸内細菌の多様性及びFXRの関与
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------