

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号： 16101
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22592314
 研究課題名（和文） 糖尿病関連歯周炎の病態指標としての歯肉溝滲出液中オステオポンチンの意義と有用性
 研究課題名（英文） Significance of osteopontin in gingival crevicular fluid of diabetes-associated periodontitis patients.
 研究代表者
 堀部 ますみ（HORIBE MASUMI）
 徳島大学・病院・助教
 研究者番号：50346615

研究成果の概要（和文）：糖尿病ラットに実験的歯周炎を惹起させることにより、骨代謝や炎症に深く関連するオステオポンチンが糖尿病における歯周炎の重症化に深く関与している可能性が示されるとともに、歯肉溝滲出液分析では、オステオポンチンは定量できなかったが、1型コラーゲンペプチドが重度歯周炎患者から検出された。一方、糖尿病関連マーカーであるレジスチンが病態の進行に関連していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the experiments of rat diabetic periodontitis model, histochemical investigation revealed that osteopontin was greatly localized in the portion of periodontal inflammatory sites, suggesting that osteopontin might be involved in the progression of severe periodontitis. The assay of gingival crevicular fluid from periodontitis patients revealed that osteopontin was not clearly detected but type-1 collagen peptide (ICTP) was detected in patients with severe periodontitis.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2012年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・歯周治療系歯学

キーワード：糖尿病・歯周炎・歯肉溝滲出液・骨代謝マーカー

1. 研究の背景

糖尿病関連歯周炎は重篤な症状を示し、治療も難しい場合が多い。もし、糖尿病関連歯周炎に特定のバイオマーカーが存在し、その指標値をもとに糖尿病患者や糖尿病予備群の人々に早期の積極的な歯周治療を実践することができれば、患者への説得力をもった対応と治療が可能となる。

またオステオポンチン（OPN: osteopontin）は、骨代謝を調節する重要な骨基質蛋白であるが、とくに最近、炎症疾患や代謝疾患で OPN

の産生が亢進し、免疫反応や創傷治癒に関与することが注目されている。大腸炎や糖尿病患者をはじめ心不全における炎症反応を反映し、病態の進行と並行して発現していることなど多数の報告がされている。

2. 研究の目的

本研究は、生活習慣病の進行や骨代謝に深く関与している OPN に焦点をあて、糖尿病関連歯周炎における OPN の意義と病態指標としての可能性を追求する研究である。本実験結

果から、一般の歯周炎と糖尿病関連歯周炎との相違を示すことによって、糖尿病関連歯周炎における OPN の位置づけと有効性を見出すことが到達目標である。

3. 研究の方法

- (1) 2型糖尿病ラットの実験的歯周炎における歯周病の病態および OPN の動態を調べる。
- (2) 糖尿病関連歯周炎患者の歯肉溝滲出液中 OPN の測定および局所・全身指標との関連を調べる。

4. 研究成果

(1) 2型糖尿病ラットの実験的歯周炎における歯周病の病態および OPN の動態

① 実験動物

大塚製薬(株)徳島研究所から提供を受けた糖尿病自然発症ラットに、臼歯部結紮法により実験的歯周炎を惹起させた。

血液生化学的検査(絶食時の血糖値等)および体重測定を行い、糖尿病の発症を確認した。また、非糖尿病ラットにも同様に実験的歯周炎を惹起させた。

・糖尿病群 (N=15): 30週齢 2型糖尿病自然発症ラット (OLETF ラット)

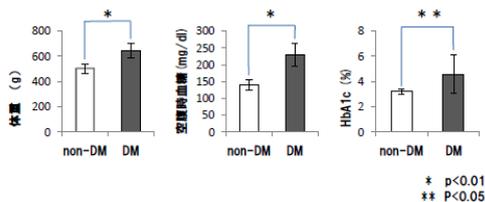
・非糖尿病群 (N=9): 30週齢 正常対照ラット (LETO ラット)

糖尿病群では非糖尿病群に比べて、体重、空腹時血糖値および HbA1c 値が有意に高かった。



左:非糖尿病ラット
右:2型糖尿病自然発症ラット

体重・空腹時血糖値・HbA1c値の比較

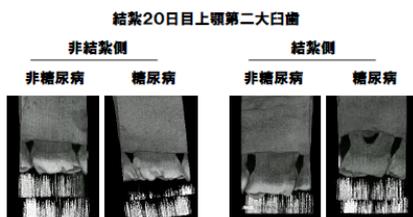


② 実験的歯周炎

上顎第2大臼歯を結紮し、実験的歯周炎を惹起させた。結紮3日、7日、20日後にラットを麻酔下で安楽死させた。

両群ともに結紮側で著明な歯槽骨吸収が認められ、糖尿病群では非糖尿病群に比べて

マイクロCT画像



より高度な吸収像が認められた。

③ マイクロCT分析

マイクロCT装置を用いて上顎第2大臼歯の歯槽骨吸収量の骨形態計測を行い測定した。

歯周炎の進行(結紮日数)とともに、両群ともに歯槽骨の吸収率が増加し、20日目の糖尿病群では非糖尿病群に比べて吸収率に著明な差が認められた。

マイクロCT画像の解析結果

結紮側の骨吸収量(μm)
非結紮側の骨吸収量(μm)

骨吸収量はCEJから歯槽骨頂までの距離を示す

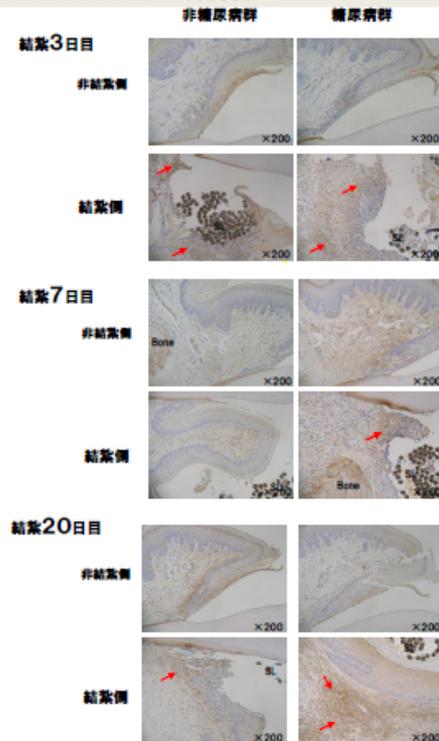
| 種類 | 3日目 | 7日目 | 20日目 |
|-------------|------|------|------|
| 糖尿病群(各N=5) | 155% | 119% | 345% |
| 非糖尿病群(各N=3) | 115% | 130% | 248% |
| 口蓋側 | | | |
| 糖尿病群(各N=5) | 113% | 107% | 133% |
| 非糖尿病群(各N=3) | 113% | 122% | 118% |

④ 組織分析

上顎骨(第2大臼歯付近)の組織切片を製作して、OPN抗体による免疫染色を行った。

組織分析では、両群ともに結紮3日後から歯周組織の破壊が始まり、日数経過とともに進行したが、その程度は糖尿病群で著しかった。OPNは両群の歯周組織破壊部位に局在しており、3、7、20日目のすべてに認められた。7日目および20日目の糖尿病群でOPNの著明な局在が認められた。

オステオポンチン(OPN)免疫染色



結果のまとめ

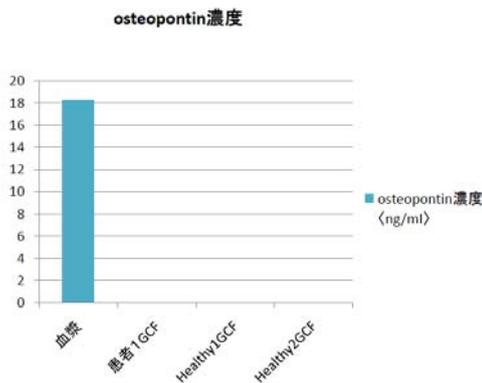
糖尿病ラットの実験的歯周炎部位では、著しい歯槽骨吸収が認められ、歯周組織の高度な破壊と OPN の強い局在が認められた。

以上の結果から、糖尿病における歯周炎の重症化に OPN が何らかの役割を果たしている可能性が示された。

(2) 糖尿病関連歯周炎患者の歯肉溝滲出液中 OPN の測定および局所・全身指標との関連

糖尿病歯周炎患者と非糖尿病患者の GCF 中の OPN の測定および、他の炎症の指標、また血液による全身指標検査(一般検査や HbA1c 値等)を比較し、両者の関連性について検討していくためにまず GCF 中の OPN の測定を行った。

測定方法として、歯肉溝よりペリオペーパーを用いて GCF を採取し、GCF 量をペリオトロン値で測定した。引き続き、ペリオペーパーを Buffer に浸し遠心操作によって GCF 中の成分を溶出させ、Human osteopontin Elisa kit を用いて溶出液中の OPN を定量した。



その結果、上記グラフに示すように、患者の GCF から OPN の定量はできなかった。その後、サンプルの濃縮や希釈、Buffer の調整、実験器具の確認等を行い、数回 OPN の検出を試みたが、測定できず、糖尿病歯周炎患者と非糖尿病患者の歯肉溝滲出液中の OPN の濃度の比較にいたらなかった。

そこで、同様の骨吸収マーカーとして用いられている I 型コラーゲン-C-テロペプチド (pyridinoline crosslinked carboxyterminal telopeptide of type I collagen : ICTP) の定量を試みた。ICTP は、破骨細胞による骨吸収の際に、骨組織中の I 型コラーゲンが分解されて血中へ放出されるペプチドであり、骨吸収マーカーとして用いられており乳癌、肺

癌、前立腺癌等の骨転移の有無判定に用いられている。

ICTP は I 型コラーゲンの分解の際に C 末端部分から Pyr または Dpyr によって架橋されたまま放出されるペプチドのことで、血中の骨組織の骨吸収量を反映する指標である。OPN 同様に Kit を用いて、GCF 中の ICTP 蛋白の定量を試みた。

ICTP測定

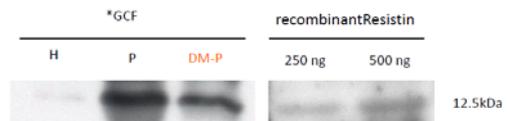
| Standard | O.D. | Sample | O.D. |
|------------|-------|-----------|-------|
| 40ng/ml | 0.191 | 患者①GCF 1 | 0.075 |
| 20ng/ml | 0.135 | 患者①GCF 2 | 0.073 |
| 10ng/ml | 0.099 | 患者②GCF 1 | 0.092 |
| 5ng/ml | 0.094 | 患者②GCF 2 | 0.081 |
| 2.5ng/ml | 0.087 | 患者③GCF | 0.073 |
| 1.25ng/ml | 0.074 | Healthy ① | 0.076 |
| 0.625ng/ml | 0.075 | Healthy ② | 0.070 |
| 0ng/ml | 0.074 | 血漿 | 0.107 |



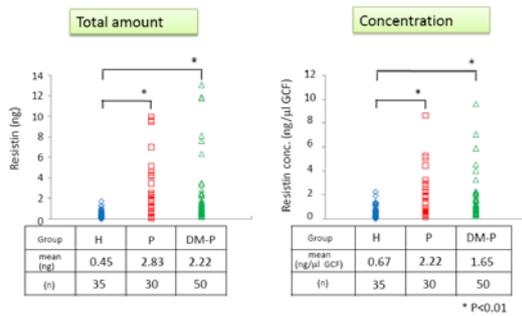
患者①はすでに抗生物質が出されており、歯周ポケットはかなり深いものの消炎されていたためか、GCF 量もさほど多くはなかった。患者②は、炎症が強い時に採取、患者③は SRP 後に採取を行った。その結果、炎症が強い部位では蛋白が検出される可能性が見られた。

今後、炎症強い部位の GCF を集め、測定を行っていく必要があると思われる。

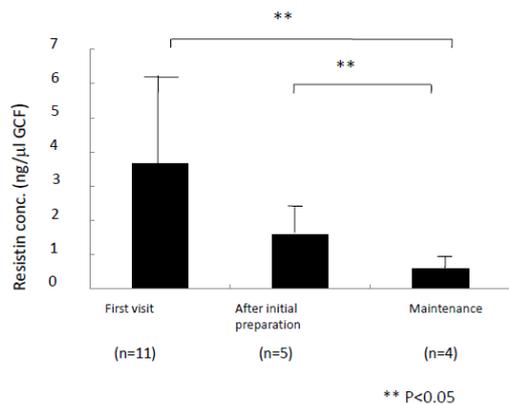
次に、糖尿病に関連する分子マーカーであるレジスチンの検索を行ったところ、非糖尿病歯周炎患者および糖尿病関連歯周炎患者の GCF 中にレジスチンがウェスタンブロット分析から確認された。



さらに、GCF 中のレジスチンを ELISA 法で定量したところ、健常者に比べて非糖尿病歯周炎患者および糖尿病関連歯周炎患者のレジスチン量が有意に高かった。非糖尿病歯周炎患者と糖尿病関連歯周炎患者を比較すると GCF 中のレジスチン量は糖尿病関連歯周炎患者で増加している傾向が認められた。



また、歯周病の治療によってGCF中のレジスチン量が有意に減少することも確認された。



以上より、オステオポンチンに加えて、レジスチンが糖尿病関連歯周炎の病態マーカーとして有意義である可能性が示唆された。しかしながら、2つのマーカーが確定的な診断指標であると言うためには、さらなる追加研究の蓄積が必要であることも示された。

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 1 件)

- ① 堀部ますみ
- ② 「糖尿病ラットの実験的歯周炎における歯周組織破壊とオステオポンチンの局在」
- ③ 第137回日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会
- ④ 平成24年11月23日 (金)
- ⑤ 広島国際会議場 (広島県)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀部 ますみ (HORIBE MASUMI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50346615

(2) 研究分担者

永田 俊彦 (NAGATA TOSHIHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：10127847

稲垣 裕司 (INAGAKI YUUJI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50380019