

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301  
研究種目：若手研究  
研究期間：2022～2023  
課題番号：22K17063  
研究課題名（和文）NLRP3インフラマソームを介する歯周病と糖尿病の相互作用に関する分子疫学的研究

研究課題名（英文）Molecular epidemiological study of NLRP3 inflammasome-mediated interaction between periodontal disease and diabetes mellitus

研究代表者  
樋口 賀奈子（Higuchi, Kanako）  
長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：40892394  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病と糖尿病は互いの病状に悪影響を及ぼすことが知られているが、その因果関係の理解には、両疾患に共通の増悪因子を解明することは必須である。

本研究では、長崎大学病院歯科保存治療室に来院したStage II以上の初診の歯周病患者を対象とし、末梢血単核球のNLRP3インフラマソームプライミング状態を比較したところ、歯周基本治療後にNLRP3インフラマソームプライミング状態は低下し、歯周組織における炎症が末梢血のNLRP3インフラマソームプライミングを介して糖尿病に影響していることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病と2型糖尿病との双方向的関連についてはよく知られているが、歯周病がどのようにして2型糖尿病に影響を与えているかについては不明な点が多い。本研究では、歯周組織による炎症が末梢血白血球のNLRP3インフラマソームをプライミングし、プライミングされた末梢血白血球が血流を介して2型糖尿病に影響を与えていることが示唆された。これらは、歯周病と糖尿病の関連についての理解を深めるとともに、これらの疾患の病態の新たな指標となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Periodontal disease and diabetes mellitus are known to affect each other, and elucidating common exacerbating factors for both diseases is essential for understanding their causal relationship.

In this study, we compared the NLRP3 inflammasome priming status of peripheral blood mononuclear cells in patients with Stage II or higher periodontal disease who visited Nagasaki University Hospital. We found that the NLRP3 inflammasome priming status decreased after basic periodontal treatment, suggesting that inflammation in periodontal tissue may affect diabetes via NLRP3 inflammasome priming in the peripheral blood.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 糖尿病 インフラマソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病と糖尿病は互いの病状に悪影響を及ぼすことが知られているが、その因果関係の理解には、両疾患に共通の増悪因子を解明することは必須である。歯周病も糖尿病もその発症と進行に、炎症性サイトカイン IL-1 とその産生を制御する NLRP3 インフラマソームという自然炎症経路が関与していることが知られている。しかし、NLRP3 インフラマソームが両疾患の病態に共通の増悪因子として関与しているかどうかは明らかにされていない。歯周病患者の治療前後の歯周組織の炎症状態とインフラマソームプライミング状態、糖尿病の指標(HbA1c)の関連性を解析し、両疾患への NLRP3 インフラマソームの関与について検討することが必要と思われた。

NLRP3 インフラマソームが活性化すると、IL-1 前駆体を成熟体へと転換することができる。成熟型 IL-1 などの炎症性サイトカインは全身に作用して、2型糖尿病患者のインスリン抵抗性を悪化させる。これを裏付ける報告として、糖尿病患者に IL-1 のアンタゴニストである IL-1ra を投与すると、インスリン抵抗性が改善する。しかしながら、インフラマソームは、IL-1 前駆体を成熟型へ転換できても、IL-1 前駆体を合成することはできない。これらの前駆体合成のためには、病原体による Toll-like receptor (TLR) の刺激などで、NF- $\kappa$ B を始めとする炎症性転写因子が活性化されている必要があり、これをプライミングと呼ぶ。しかるに、本来無菌的であるはずの生体内において、糖尿病患者ではどのようにしてプライミングが起きているのかは明らかでない。歯周組織における炎症が末梢血白血球の NLRP3 インフラマソームをプライミングして、糖尿病にも影響を与えている可能性があり、この点を明らかにすることは、両疾患の因果関係を理解する上で、非常に重要と考えられた。

### 2. 研究の目的

2型糖尿病患者では歯周炎が重症化しやすく、逆に歯周病患者では2型糖尿病の罹患率も高いことから、歯周病と糖尿病は双方向性に関連していることが証明されている。その因果関係の一端を明らかにするために、歯周炎が糖尿病患者の末梢血白血球の NLRP3 インフラマソームプライミングに関与しているかどうか検証することとした。歯周病患者の歯周組織は脆弱となっており、歯周炎病変部から歯周病原細菌または LPS 等の菌体成分が血管に侵入し、末梢血白血球をプライミングする可能性がある。また、歯周組織局所で産生された TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが血中に移行し、末梢血白血球をプライミングする可能性もある。

本研究では、歯周病患者の歯周組織における炎症が、末梢血白血球の NLRP3 インフラマソームをプライミングするか明らかにするために、歯周基本治療前後の患者から採血を行い、NLRP3 インフラマソームプライミング状態を比較することとした。また、歯周病患者から採取した歯石で口腔上皮細胞を刺激し、NLRP3 インフラマソームの活性化を介してピロトーシスと呼ばれる細胞死が誘導されるか、誘導された細胞死が上皮細胞のバリア機能の低下に関与しているかについても検討することとした。上皮細胞のバリア機能の低下は、歯周組織の炎症を悪化させる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯周病患者の診査及び歯周治療

長崎大学病院歯科保存治療室に来院した Stage 以上の初診の歯周病患者に研究内容を説明して同意を取得した後、アタッチメントレベル、ポケット深さ、プロービング時の出血などの歯周組織検査を行った。口腔指導、スケーリング・ルートプレーニング (SRP) を含む歯周基本治療を行い、歯周組織検査を行なった。

#### (2) 採血および末梢血単核球のプライミング状態の解析

歯周炎患者から歯周基本治療後に末梢血 7 ml を採取し、Ficoll-Paque を用いて単核球を分離した。分離した末梢血単核球の一部をシリカ結晶で刺激し、産生される IL-1 濃度を ELISA 法で測定した。シリカ結晶による刺激は、NLRP3 インフラマソームを活性化することが知られており、プライミングされた白血球はこれらの結晶で刺激することで IL-1 を産生するが、プライミングされていない白血球からは産生されない。

また、末梢血から分離した単核球の一部から RNA を分離し、RT-PCR 法にて IL-1 やインフラマソーム構成因子である NLRP3、ASC、caspase-1 の発現量を測定した。

これらの分子の mRNA 発現量および末梢血単核球を結晶粒子で刺激後の IL-1 産生量から、末梢血単核球のプライミング状態を判定した。

#### (3) 歯石刺激後のマウスマクロファージ培養上清の破骨細胞形成への影響

野生型および NLRP3 欠損型マウス由来マクロファージを 500  $\mu$ g/ml の歯石で刺激し、培養上清を回収した。次に、歯石で刺激したマウスマクロファージ培養上清が破骨細胞分化へどのような影響を与えるかを検討するために、マウス骨髄マクロファージを RANKL で破骨細胞前駆細胞へ分化させた後、回収した培養上清を添加し、培養後に形成される 3 核以上の TRAP 陽性細胞数を破骨細胞として計測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯周基本治療による歯周組織の改善

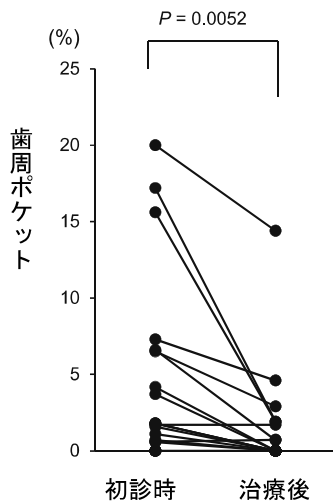


図1. 歯周基本治療前後の6 mm以上の歯周ポケットの割合の比較

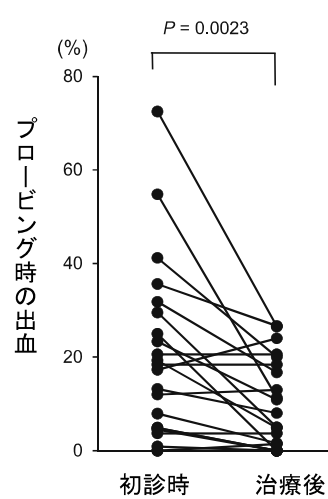


図2. 歯周基本治療前後のプロービング時の出血の割合の比較

長崎大学病院歯科保存治療室に来院した Stage 以上の歯周炎患者に歯周検査を行った後、歯周基本治療を実施し、再評価を行った。歯周基本治療前と比較して、歯周基本治療後に6 mm以上の歯周ポケットの割合は有意に低下した(図1)。また、4 mm以上の歯周ポケットの割合も減少し、プロービング時の出血の割合も有意に低下した(図2)。

##### (2) 末梢血単核球のプライミング状態の解析

歯周基本治療前後に歯周炎患者から採血を行い、末梢血単核球における IL-1 やインフラマソーム構成因子である NLRP3, ASC, caspase-1 の発現量を測定した。歯周基本治療前と比較して、歯周基本治療後に IL-1 mRNA 発現量は減少していた(図3)。また、ASC mRNA 発現量も減少していたが、NLRP3 mRNA 発現量や caspase-1 発現量に変化はみられなかった。

末梢血単核球をシリカ結晶で刺激したところ、歯周基本治療前後で IL-1 産生量に有意差はみられなかった。

##### (3) 歯石刺激による口腔上皮細胞におけるピロトーシスの誘導

HSC-2 ヒト口腔上皮細胞株を歯石で刺激すると濃度依存的、時間依存的に細胞死が誘導された(図4)。同様に生理的ヒト口腔上皮細胞を歯石で刺激した場合にも細胞死が誘導された。また、HSC-2 細胞単層培養によるバリア機能試験において、歯石刺激後の HSC-2 細胞単層培養群は未刺激群と比較して有意にバリア機能が低下した。

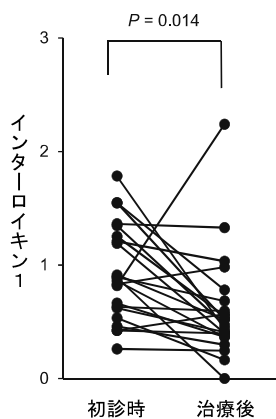


図3. 末梢血単核球の IL-1 mRNA 発現量の比較

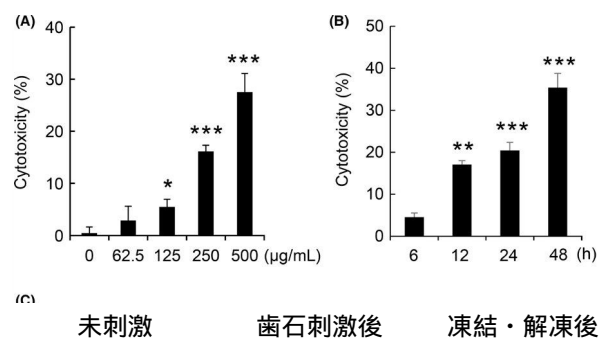


図4. 歯石刺激後の HSC-2 口腔上皮細胞のヨウ化プロピジウム染色像。右端は凍結・解凍により細胞死を誘導したポジティブコントロール。

上記(1)~(3)の結果から、歯周病患者の歯周組織においては上皮細胞のピロトーシスに伴いバリア機能が低下し、歯周組織に炎症が生じることによって末梢血白血球の NLRP3 インフラマソームがプライミングされて2型糖尿病の病態にも影響を与えていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ziauddin S.M., Alam Mohammad Ibtehad, Mae Megumi, Oohira Masayuki, Higuchi Kanako, Yamashita Yasunori, Ozaki Yukio, Yoshimura Atsutoshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Cytotoxic effects of dental calculus particles and freeze dried Aggregatibacter actinomycetemcomitans and Fusobacterium nucleatum on HSC 2 oral epithelial cells and THP 1 macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 e92-e103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.21-0196	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学歯学部ホームページ <a href="http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_perio.html">http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_perio.html</a>
--

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
---------	---------