

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792325

研究課題名(和文) 高血糖・高飽和脂肪酸により誘導される歯肉上皮細胞の病態変化の解明

研究課題名(英文) Investigation of pathological changes induced by hyperglycemia or highly saturated fatty acid

研究代表者

柏木 陽一郎 (Kashiwagi, Yoichiro)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20598396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疾患である歯周病と糖尿病は相互的にリスク因子として位置付けられ、病態の複雑化、治療の困難性に影響を及ぼしているといわれている。しかし、歯周病は感染症であり糖尿病は代謝異常の疾患であることから、両疾患を結び付ける病態メカニズムの詳細は十分には解明されていない。本研究では、歯肉上皮細胞を高グルコース条件下で培養することにより炎症性サイトカインやToll like receptorの発現が亢進し、酸化ストレスシグナルが関与していることを明らかにした。これらのことは基礎疾患として糖尿病を有する歯周病患者の病態分子メカニズムを明らかにする可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Both diabetes and periodontal disease are chronic disease and as risk factors mutually that have an influence on pathologic complexity, the difficulty of the treatment. However, the details of the mechanism of the relation of these diseases are not well known enough because periodontal disease is an infectious disease, and diabetes is a metabolism abnormal disease. In this study, we investigated the effect of diabetic condition on human gingival epithelial cells. The result of research revealed that high glucose condition induced the expression of inflammatory cytokine (IL-8 etc.) and Toll like receptor 2 elevating in vitro. In addition, we found that oxidative stress was involved in these high glucose effects. These findings may reveal the molecular mechanism of diabetic patients having periodontal disease.

研究分野：歯周治療系歯学

科研費の分科・細目：歯周免疫機能学

キーワード：歯周病 糖尿病 高血糖 歯肉上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病の原因は歯周病原性細菌により形成されるデンタルプラークであるが、喫煙、肥満、糖尿病等が歯周病の発症、進行に影響を及ぼすリスクファクターとなることが知られている。申請者はこれまでに「喫煙と歯周病」をテーマとして、タバコ成分ニコチンの歯肉上皮細胞に対する影響を、ニコチンレセプターを介する細胞内への Ca^{2+} の流入に着目して検討を行い、ニコチンが歯肉上皮細胞の炎症反応を亢進する分子メカニズムの一端を明らかにした。このことを踏まえ、歯周組織の最前線の防御機構としての歯肉上皮細胞は歯周病に対するリスクを評価する指標細胞として最適であると考え、本研究計画においても同細胞を対象として用い、歯周病に対する糖尿病の影響を検討することとした。

糖尿病は、高血糖状態による免疫機能異常と微小循環障害がおこり、様々な病態を引き起こすと考えられている。その細胞内シグナル活性化経路としては AGE/RAGE シグナル、PKC シグナル、酸化ストレスなどが報告されている。しかし、高血糖状態が口腔内の細胞に及ぼす影響については報告がなく、歯周病増悪化の細胞生物学的メカニズムも未だ明らかになっていない。細胞表面に存在する Toll like receptor (TLR) はヒト細胞表面には存在しない病原体成分のリポタンパク質や LPS などと結合することで病原体を認識すること知られている。高血糖状態が TLR2, 4 の発現を上昇させることが白血球の単球においては報告されてきたが、歯周組織における詳細な検討はなされていない。さらに口腔上皮組織は細菌に対して暴露する組織であり TLRs の発現変化を引き起こすなら歯周病に対する疾患感受性に重大な影響をあたえることが予想される。

2. 研究の目的

糖尿病の基礎病態（高血糖、高遊離脂肪酸血症）による歯肉上皮細胞の炎症反応の亢進を明らかにし、歯周病の増悪化に係る糖尿病の基礎病態の分子メカニズムを解明し、その是正や予防に向けた治療戦略を明らかにする基礎研究を研究の目的とする。

in vitro にて高血糖状態下で培養した歯肉上皮細胞における炎症誘導性について、炎症性サイトカインと TLRs mRNA とタンパクの発現パターンの変化を検討する。高血糖による炎症誘導作用および TLRs 発現上昇が明らかに見られる場合には、細胞内シグナルの異常を同定し、同シグナル経路に対する阻害薬を用いた抗炎症効果を検討する。

3. 研究の方法

1) 申請者らのグループはヒト歯肉上皮より歯肉上皮細胞 (HGEC) を単離し、不死化し、既にいくつもの cell line を樹立している。歯肉上皮細胞株 epi 4 は歯周病原性細菌

Porphyromonas gingivalis 菌の刺激により炎症反応が誘導された。それらの cell line を用いて in vitro で正常培養時 (glucose 6 mM) と比較し、高血糖培養時 (glucose 25 mM) にて培養した歯肉上皮細胞の炎症性サイトカインの遺伝子発現を IL-8、MCP-1、IL-18、TNF- α について realtime PCR 法にて、培養上清中の IL-8 タンパク量を ELISA 法にて測定し、TLR2,4 遺伝子発現を realtime PCR 法にてタンパク発現変化についてはフローサイトメトリー、Western blot 法により測定した。

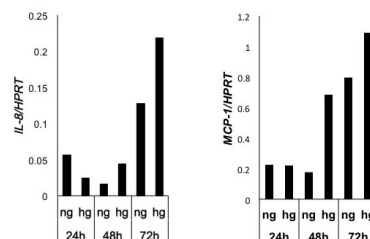
2) 高血糖の細胞内シグナル経路として PKC シグナル、酸化ストレスなどがいわれているが PKC シグナル阻害薬でスタウロsporin の構造類似体である Ro31-8220 メタンスルホン酸塩を用い、酸化ストレスシグナル阻害薬として N-acetylcysteine (NAC) を用いてそれぞれ高血糖の IL-8 産生に対する阻害効果の検討を行った。

3) TLR2 のリガンドである歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 菌の刺激により高血糖条件下培養した歯肉上皮細胞において上昇した炎症反応がさらに増悪するか IL-8 の発現変化について検討した。

4. 研究成果

歯肉上皮細胞株 epi 4 において正常培養時 (glucose 6 mM : NG) に対して、高血糖状態 (glucose 25 mM : HG) にて培養した。培養後 24h、48h、72h 後の mRNA を回収、精製し、realtime PCR 法にて遺伝子発現変化について検討した。その結果、IL-8、MCP-1、IL-18、TNF- α 、TLR2 について高血糖の効果により培養 72h に発現の上昇がみられた。一方、TLR4 については今回実験に供した Cell line においては mRNA 発現が微量であり高血糖の効果による発現の変化は観察できなかった。(Fig. 1)

さらに高血糖状態による細胞への浸透圧による刺激の影響を評価するために glucose 6 mM + mannitol 19 mM を添加し、上記で差のみられた培養 72 時間において IL-8、IL-18 の mRNA 発現について検討した。(Fig. 2)



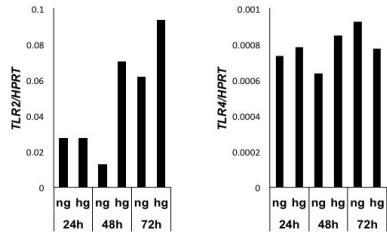


Fig.1 歯肉上皮細胞における高血糖効果の経時的変化

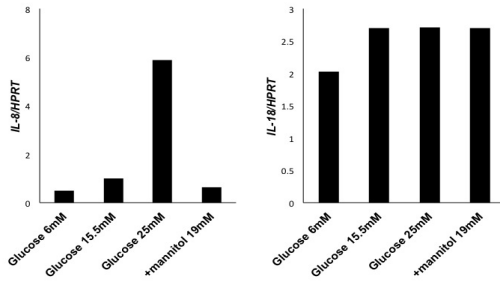


Fig.2 歯肉上皮細胞における高血糖効果と浸透圧による影響の検討

培養上清への IL-8 のタンパク産生について ELISA 法により測定した結果 mRNA 発現変化と同様で高血糖効果により発現の上昇が確認された。(Fig. 3)

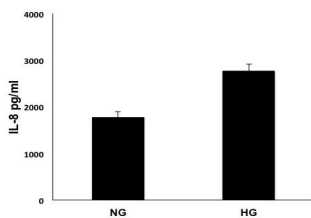


Fig.3 歯肉上皮細胞の培養上清中でのIL-8産生に及ぼす高血糖効果の影響の検討

TLR2 の発現についてフローサイトメトリー、Western blot 法により測定した結果、mRNA 発現変化と同様で高血糖効果により発現の上昇が確認された。(Fig. 4)

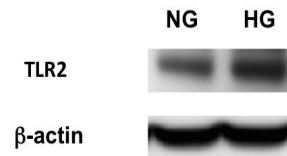
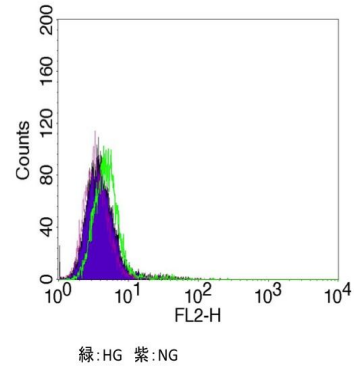


Fig.4 歯肉上皮細胞におけるTLR2発現に対する高血糖効果検討

PKC 阻害薬 Ro31-8220 メタンサルホン酸塩と酸化ストレスシグナル阻害薬 N-acetylcysteine (NAC) にて 1h プレインキュベートし、その上で高血糖状態にて培養を行った。72h 後の培養上清への発現 IL-8 タンパク産生について検討を行った結果、高血糖効果による IL-8 発現上昇に対する阻害効果を認めた。NAC 10 mM による阻害効果の結果のみ示す。(Fig. 5)

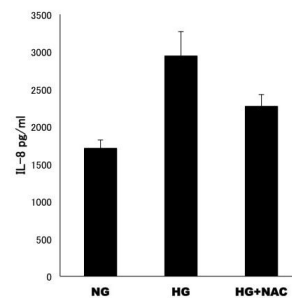


Fig.5 歯肉上皮細胞における培養上清中へのIL-8産生に対する高血糖効果とNAC 10mMによる影響の検討

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 1 件)

1. Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y, Murakami S
: Nicotine upregulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1 β or *porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor signaling.
: Arch Oral Biol. 2012 May; 57(5): 483-90.
(査読あり)

[学会発表](計 3 件)それぞれ筆頭発表者

1. 柏木陽一郎、山田聡、北村正博、村上伸也 「高血糖状態が歯周組織構成細胞の IL-8 産生に及ぼす影響」 第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会: 2012 年 9 月 23 日
2. 柏木陽一郎、柳田学、山田聡、北村正博、村上伸也 「ニコチンと高血糖の歯肉上皮細胞における自然免疫応答に及ぼす影響」第 54 回秋季日本歯周病学会学術大会: 2011 年 9 月 24 日
3. 柏木陽一郎 ほか、高血糖とニコチンが歯肉上皮細胞の自然免疫応答に及ぼす影響第 25 回糖尿病合併症学会: 2010 年 10 月 22 日 :

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏木 陽一郎 (KASHIWAGI YOICHIRO)

大阪大学歯学部附属病院 医員

研究者番号: 20598396