

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792342

研究課題名(和文)炎症性骨代謝に対する糖尿病の影響の解明

研究課題名(英文)The influence of diabetes on inflammatory bone metabolism

研究代表者

菊池 毅 (Kikuchi, Takeshi)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：40421242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の局所歯周病に与える影響に関する詳細なメカニズムについては、未だ推論の域を出ていない。今回の研究において、低濃度の終末糖化産物(AGE)は、骨芽細胞の分化を促進すること、またRANKL誘導性の破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。一方、高濃度のAGEは、破骨細胞前駆細胞に細胞毒性をもたらした。本研究の結果より、糖尿病患者において増加しているAGEは、高回転型の骨代謝を誘導している可能性が考えられる。このことは、糖尿病の歯周病局所への影響を示唆しており、両疾患の関連の機序の一端を表すものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is not yet fully understood for a detailed mechanism for the impact on the local periodontal disease from diabetes. In this study, it has been found that low concentrations of advanced glycation end products (AGE) promotes the differentiation of osteoblasts, and RANKL-induced differentiation of osteoclasts. Meanwhile, the high concentration of AGE resulted in cytotoxicity to the osteoclast precursor cells. From the results of this study, it is considered that high concentration of AGE in diabetic patients direct high rotation type of bone metabolism. This has suggested the effect on local periodontitis by diabetes, it is believed to be representative of one of the relevant mechanisms of both diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：炎症性骨代謝 糖尿病 歯周病 骨芽細胞 破骨細胞 終末糖化産物

1. 研究開始当初の背景

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、推論の域を出していない。

糖尿病においては、感染症への罹患率が高く、また組織修復能力が低下しているため、重症化しやすい。その原因として、高血糖や血流傷害などに起因する感染防御機能、すなわち免疫機能の低下が示唆される (Joshi N. et al. *N Engl J Med.* 1999)。また、糖尿病において骨代謝異常が報告されている。特に 90%以上をしめる 2 型糖尿病では、骨質の劣化による骨の脆弱性が問題とされている。このメカニズムとして考えられるのは、高血糖による骨芽細胞への影響である。高血糖環境は、骨芽細胞の分化と機能を抑制する。また、終末糖化産物 (AGE) は、その特異的な受容体 RAGE を介して細胞に直接的に作用するが、培養骨芽細胞に添加すると骨吸収関連サイトカインである IL-6 の発現が促進する (Takagi M. et al. *J Bone Miner Res.* 1997)。さらに、AGE は、骨芽細胞による基質石灰化を抑制し、骨芽細胞のアポトーシスを誘導する (Alikhani M. et al. *Bone.* 2007)。これらは、骨量を減少させる可能性を示すものであり、糖尿病性骨粗鬆症へと繋がる機序と考えられる。

2. 研究の目的

血糖コントロール不良は局所の歯周組織においても炎症反応を助長し、歯周組織破壊を進行させ、歯周病のリスクファクターとなるという仮説をたてた。本研究では、炎症性骨代謝に関与する細胞に焦点を絞り、糖尿病の歯周病に対する影響についての機序を解析することとした。具体的には、骨芽細胞や破骨細胞前駆細胞に終末糖化産物である AGE と歯周病原細菌由来 Lipopolysaccharide (LPS) や破骨細胞分化促進因子である Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) を添加し、炎症性骨代謝の機序に関して検討することを目的とする。

3. 研究の方法

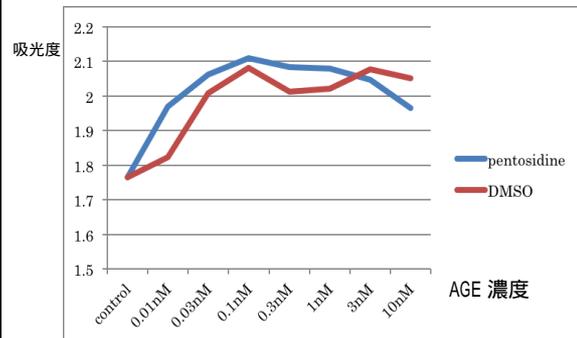
1. 実験に用いた細胞：生後 2 日齢の ddY マウスの頭頂骨より骨芽細胞を採取する。また、マウスマクロファージ細胞株である RAW 細胞を破骨細胞前駆細胞として実験に使用する。
2. 遺伝子発現の検討：骨芽細胞より total RNA をグアニジンを用いて抽出し、Real-time PCR 法を用いて骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OCN)、オステオポンチン (OPN)、骨シアロタンパク (BSP)、type コラーゲン、Runx2 の遺

伝子発現量の測定を行う。Real-time PCR 法は、ABI Prism7000 を使用する。遺伝子発現の差違は、 $C_T$ 法により計算する。

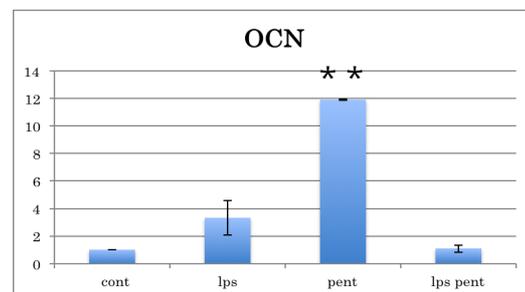
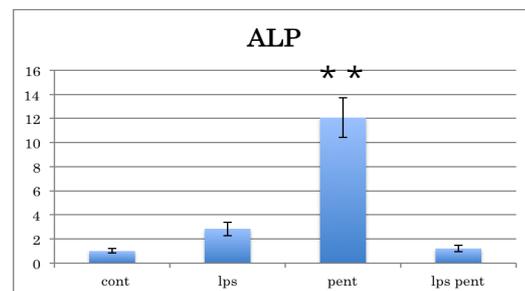
3. 細胞増殖能の判定：骨芽細胞および RAW 細胞の増殖能の変化を Cell-Counting Kit-8 を用いて測定し、比較する。
4. 破骨細胞形成能：RAW 細胞を RANKL と AGE で共培養後、TRAP 染色にて多核の破骨細胞形成数を測定する。

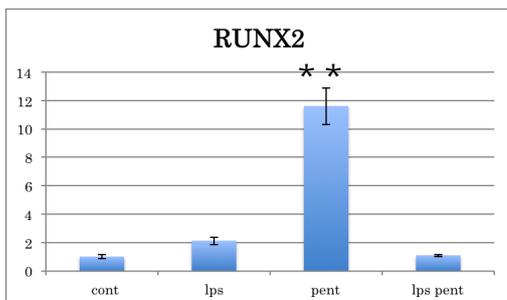
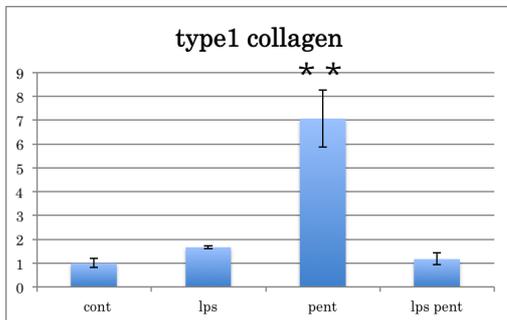
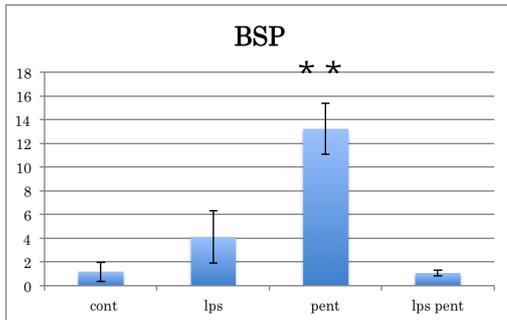
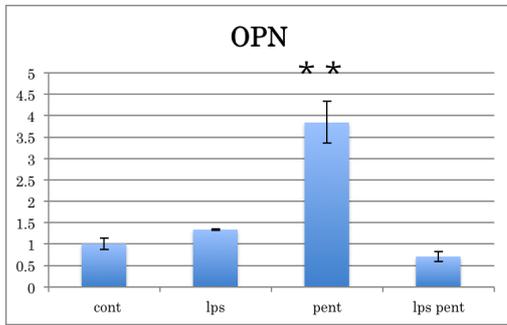
4. 研究成果

1. 骨芽細胞における細胞増殖能：低濃度の AGE は、培養 2 日後の骨芽細胞の増殖能を増加させた。一方、高濃度の AGE は、濃度依存的にその増加幅が減少した。



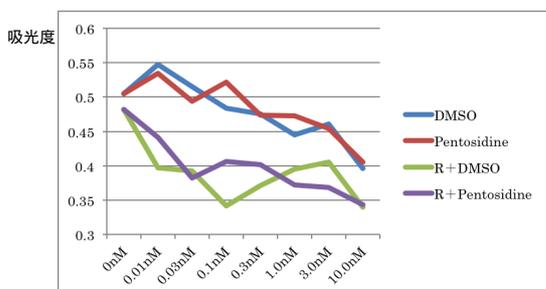
2. 骨芽細胞における遺伝子発現変動：低濃度の AGE (0.05nM) は、培養 3 日後において骨芽細胞の分化マーカーである ALP, OPN, OCN, BSP, type コラーゲン, Runx2 の発現を有意に増加させた。Aggregatibacter actinomycescomitans (A. actinomycescomitans) 由来 LPS (10ng/ml) は、これら遺伝子の発現を増加させる傾向にあったが、統計学的に有意では無かった。両者の刺激は、これら遺伝子の発現に影響を与えなかった。





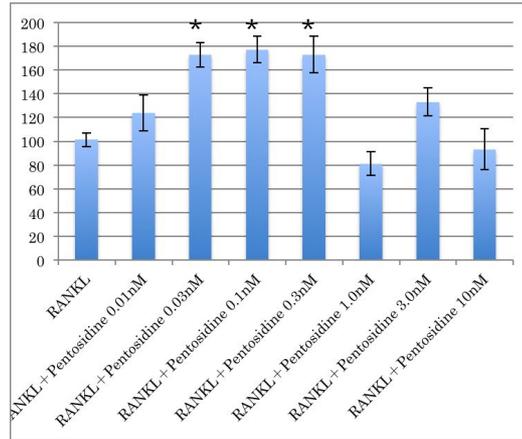
\*\* :  $p < 0.01$  vs control.

3. RAW 細胞における細胞増殖能：低濃度の AGE は、培養 2 日後の RAW 細胞の増殖能に影響を与えなかった。一方、高濃度の AGE は、RAW 細胞に対して細胞毒性をもたらした。また、各濃度の AGE と RANKL(25ng/ml)の共刺激は、AGE の濃度依存的に RAW 細胞の細胞毒性を増加した。



4. 破骨細胞形成能：低濃度の AGE と RANKL(25ng/ml)の共刺激は、RANKL 単独刺激と比較し、TRAP 陽性多核破骨細胞の有意な増加をもたらした。一方、高濃度の AGE と RANKL(25ng/ml)の共刺激は、RANKL 単独刺激とほぼ同じ細胞数であった。

破骨細胞数



\* :  $p < 0.05$  vs control.

5. まとめ：以上から、低濃度の AGE は、骨芽細胞の分化を促進すること、また RANKL 誘導性の破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。一方、高濃度の AGE は、破骨細胞前駆細胞に細胞毒性をもたらした。本研究の結果より、糖尿病患者において増加している AGE は、高回転型の骨代謝を誘導している可能性が考えられる。このことは、糖尿病の歯周病局所への影響を示唆しており、両疾患の関連の機序の一端を表すものであると考えられる。

#### 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7件)

- Miyajima S, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Nishikawa T, Adachi K, Suzuki Y, Kikuchi T, Mitani A, Mizutani M, Ohno N, Noguchi T, Matsubara T., Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation., Sci Rep, 査読有, 2014, Jun 4:5171
- Takeda H, Kikuchi T, Soboku K, Okabe I, Mizutani H, Mitani A, Ishihara Y, Noguchi T., Effect of IL-15 and Natural Killer Cells on Osteoclasts and Osteoblasts in a Mouse Coculture., Inflammation, 査読有, 2014, 37:657-669
- Soboku K, Kikuchi T, Fujita S, Takeda H, Naruse K, Matsubara T, Noguchi T.,

- Altered Gene Expression in Gingival Tissues and Enhanced Bone Loss in Diabetic Rats With Experimental Periodontitis., J Periodontol, 査読有, 2014, 85:455-464
4. Izawa A, Ishihara Y, Mizutani H, Kobayashi S, Goto H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Sugita Y, Kubo K, Kamei H, Kikuchi T, Mitani A, Hayashi J, Nishihara T, Maeda H, Noguchi T., Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in IL-1Ra knockout mice., Infect Immun, 査読有, 2014, 82:1904-1913
  5. Mizutani H, Ishihara Y, Izawa A, Fujihara Y, Kobayashi S, Gotou H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Kamei H, Kikuchi T, Yamamoto G, Mitani A, Nishihara T, Noguchi T., Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* up-regulates inflammatory cytokines, prostaglandin E2 synthesis and osteoclast formation in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice., J Periodont Res, 査読有, 2013, 48:748-756
  6. Suga T, Mitani A, Mogi M, Kikuchi T, Fujimura T, Takeda H, Hishikawa T, Yamamoto G, Hayashi J, Ishihara Y, Noguchi T., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulated epithelial cells produce interleukin-15 that regulates T cell activation., Arch Oral Biol, 査読有, 2013, 58:1541-1548
  7. Nishikawa T, Naruse K, Kobayashi Y, Miyajima S, Mizutani M, Kikuchi T, Soboku K, Nakamura N, Sokabe A, Tosaki T, Hata M, Ohno N, Noguchi T, Matsubara T., Involvement of nitrosative stress in experimental periodontitis in diabetic rats, J Clin Periodontol, 査読有, 2012, 39:342-349
- [学会発表](計21件)
1. 宮島真一、成瀬桂子、中村信久、西川 徹、足立 圭、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、野口俊英、大野紀和、松原達昭、三谷章雄、歯周炎によって活性化された単核球が大動脈の炎症を惹起する機序の検討、第57回日本歯周病学会秋季学術大会、2014年10月19日、神戸
  2. 鈴木佑基、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川 徹、宮島真一、足立 圭、水谷 誠、菊池 毅、宮澤健、月山克史、山田祐一郎、後藤滋巳、大野紀和、三谷章雄、松原達昭、GIPは歯周炎を抑制する、第57回日本糖尿病合併症学会、2014年10月3日、東京
  3. 足立 圭、成瀬圭子、中村信久、西川 徹、宮島真一、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、野口俊英、大野紀和、松原達昭、三谷章雄、糖尿病ラット歯周炎に対するpoly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の効果、2014年6月8日、名古屋
  4. 足立 圭、成瀬圭子、小林泰子、中村信久、西川 徹、宮島真一、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、大野紀和、松原達昭、野口俊英、糖尿病ラット歯周炎に対するpoly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の効果、第57回日本歯周病学会春季学術大会、2014年5月23日、大阪
  5. 鈴木佑基、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川 徹、宮島真一、足立 圭、水谷 誠、菊池 毅、宮澤健、月山克史、山田祐一郎、後藤滋巳、大野紀和、三谷章雄、松原達昭、GIPは歯周炎を抑制する、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、2014年5月22日、大阪
  6. 稲垣幸司、菊池 毅、惣ト響子、武田紘明、石原裕一、野口俊英、成瀬桂子、松原達昭、糖尿病合併症の実態把握とその治療に関するデータベース構築による大規模前向き研究(JDCP study)の現状、第81回愛知学院大学歯学会、2013年12月1日、名古屋
  7. 足立 圭、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川 徹、宮島真一、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、大野紀和、松原達昭、野口俊英、糖尿病ラット歯周炎に対するpoly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の効果、第8回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会、2013年10月6日、塩尻
  8. 宮島真一、成瀬桂子、中村信久、水谷 誠、菊池 毅、野口俊英、松原達昭、歯周炎は動脈硬化初期病変を惹起する、第61回日本心臓病学会学術集会、2013年9月22日、熊本
  9. 足立 圭、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川 徹、宮島真一、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、大野紀和、野口俊英、松原達昭、糖尿病ラット歯周炎に対するpoly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の効果 -第2報-、第28回日本糖尿病合併症学会、2013年9月14日、札幌
  10. Miyajima S, Naruse K, Nakamura N, Mizutani M, Kikuchi T, Noguchi T, Matsubara T, Periodontitis Increases Monocyte Adhesion to Aortic Endothelial Cells : Possible Involvement of Tumor Necrosis Factor-Alpha-Mediated Inflammation,

- The 45th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society, 2013.7.18, 東京
11. 鈴木佑基、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川 徹、宮島真一、足立 圭、菊池 毅、水谷 誠、大野紀和、野口俊英、松原達昭、糖尿病合併歯周炎に対するインスリン治療効果と作用機序の検討、第34回日本炎症・再生医学会、2013年7月3日、京都
  12. Adachi K, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Nishikawa T, Miyajima S, Suzuki Y, Mizutani M, Kikuchi T, Ohno N, Noguchi T, Matsubara T, Impact of the activation of poly (ADP-ribose) polymerase on the periodontitis in diabetic rats, The 73rd Scientific Sessions, American Diabetes Association, 2013.6.23, Chicago
  13. 宮島真一、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川 徹、足立 圭、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、大野紀和、野口俊英、松原達昭、歯周炎は大動脈における接着分子の発現を誘導し単球接着を増加させる、第141回日本循環器学会東海地方会、2013年6月22日、名古屋
  14. 宮島真一、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川徹、足立 圭、鈴木佑基、水谷誠、菊池 毅、大野紀和、松原達昭、野口俊英、ラット実験の歯周炎は TNF- $\alpha$  が誘導する炎症反応を活性化し大動脈における単球接着を増加させる、第55回春季日本歯周病学会、2013年5月31日、東京
  15. Miyajima S, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Mizutani M, Kikuchi T, Ohno N, Noguchi T, Matsubara T, Periodontitis Activates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Mediated Inflammatory Responses and Increases Monocyte Adhesion to Aortic Endothelial Cells., The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation, 2013.3.17, Yokohama
  16. 足立 圭、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川徹、宮島真一、鈴木佑基、水谷誠、菊池 毅、大野紀和、野口俊英、松原達昭、糖尿病ラット歯周炎に対する Poly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の効果、第27回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2013年2月23日、東京
  17. 宮島真一、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川 徹、足立 圭、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、大野紀和、野口俊英、松原達昭、歯周炎は動脈硬化初期病変を誘発する、日本循環器学会 第140回東海・第125回北陸合同地方会、2012年10月20日、名古屋
  18. Kikuchi T, Takeda H, Soboku K, Fujita

- S, Kato D, Ishihara Y, Murakami H, Noguchi T., The effect of interleukin-15 on inflammatory bone metabolism., EA0 20th Anniversary Meeting, 2012.10.12, Copenhagen
19. Mitani A, Takeda H, Kikuchi T, Soboku K, Fujita S, Ishihara Y, Noguchi T, The effect of interleukin-15 on inflammatory bone metabolism., EUROPEAN CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 2012.9.29, Glasgow
  20. 藤村岳樹、福田光男、三谷章雄、永原絢子、山本浩充、大澤数洋、佐藤聡太、高橋伸行、岩村侑樹、須賀貴行、渡辺智久、佐々公太、林潤一郎、菊池 毅、別所優、野口俊英、半導体レーザーとインドシアニングリーン封入ナノ粒子による抗菌光線療法の上皮細胞への影響、第55回秋季日本歯周病学会、2012年9月23日、筑波
  21. 武田紘明、菊池 毅、惣ト響子、藤田幸子、三谷章雄、相野 誠、野口俊英、IL-15の炎症性骨代謝に対する影響、第80回愛院大歯学会、2012年6月3日、名古屋

〔図書〕(計2件)

1. 菊池 毅(分担) 医歯薬出版株式会社、慢性疾患としての歯周病へのアプローチ、2014、p24-27、47、152-155
2. Noguchi T, Kikuchi T, Inagaki K, Quintessence Publishing Co Inc, At the forefront: illustrated topics in dental research and clinical practice, 1st ed., 2013, p43-46

〔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：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 毅 (KIKUCHI TAKESHI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：40421242

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし