

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462964

研究課題名(和文) インクレチン関連薬は根尖性歯周炎と辺縁性歯周炎の発症機序に影響を及ぼすか？

研究課題名(英文) Dose the incretin related-drug have an influence on the onset mechanism of apical periodontitis and marginal periodontitis?

研究代表者

作田 哲也 (SAKUTA, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：20284888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在、日本には約900万人の糖尿病患者(糖尿病が強く疑われる者、及び糖尿病の可能性を否定できない者を含む)がいると言われ(平成24年度国民健康・栄養調査報告)、糖尿病に対してお薬の治療を受けている患者さんにはインスリンの注射を受けている人と飲み薬を服用している人がいますが、飲み薬において約8割の患者さんが服用しているものがインクレチンというお薬です。このお薬には糖尿病の状態をよくするだけでなく様々な作用(腎臓を守る作用や心臓を守る作用など)があります。今回、このお薬に歯周病や歯の神経の炎症を抑える作用が期待できる実験結果を見いだしました。

研究成果の概要(英文)：It is said Japan has approximately 9 million diabetics (including the person that diabetes is strongly suspected and the person who can not deny possibility of diabetes)(The National Health and Nutrition Survey in Japan), and there is a person receiving an injection of insulin and/or treated for oral diabetic agents, but the thing which a patient of approximately 80% takes in medicine is medicine called the incretin now. The incretin medications have not only a state of diabetes better but also various action (protection of heart and/or kidney). I found the finding in vitro that the action which may improve periodontal disease and pulpitis to the medicine.

研究分野：歯科保存学

キーワード：糖尿病 歯周病 歯髄炎

1. 研究開始当初の背景

現在、歯周病と糖尿病との密接な関係が明らかになりつつある。「糖尿病治療ガイド2012-2013(日本糖尿病学会)」によると、歯周病は糖尿病の重大な合併症の一つである。糖尿病患者では歯周病が重症化する。歯周病が重症であるほど血糖コントロールは不良となる。さらには、歯周病治療によって歯周組織の慢性炎症が改善すると、インスリン抵抗性が軽減し、血糖コントロール状態も改善することが報告されていると記載されている。インクレチンは腸管由来のインスリン分泌刺激因子であり、主として glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide (GLP-1)があり、それぞれ十二指腸に存在するK細胞と下部小腸や大腸に存在するL細胞から分泌される。インクレチンは食事摂取により分泌が促進され、膵臓細胞に作用しインスリンの分泌を促進する。また、インクレチンは血中や細胞膜上の dipeptidyl peptide-4(DPP-IV, CD26)によって速やかに分解される。インクレチン関連薬は、「血糖値が上昇した時にだけインスリンの分泌を促進する」という、従来にない新しい概念を有した経口糖尿病治療薬として市場に2009年に登場した。それからわずか1年半程の間に、糖尿病治療の管理下にある約900万人の糖尿病患者のうち、約200万人にこのインクレチン関連薬が投与されている(治療94, 941, 2012)。本報告を行っている時点では、経口糖尿病治療薬による治療を受けている患者の約7割(約300万人)がこのインクレチン関連薬を投与されている(第60回日本糖尿病学会年次学術集会, 2017)。これは、インクレチン関連薬が、血糖依存的に細胞からインスリン分泌を促進する細胞における抗アポトーシス作用を有する。低血糖リスクが小さい。体重増加をきたしにくい膵臓細胞におけるグルカゴン分泌の促進が期待される。というような特徴を有しており、インスリン分泌が障害されやすい日本人の糖尿病治療において不可欠となっているためである。こ

れらの作用は、他のインスリン分泌促進薬であるスルホニル尿素薬やグリニド薬とは異なるものである。

現在、次の2種類のインクレチン関連薬が臨床に用いられている。DPP-IV阻害薬:まず、DPP-IVの選択的阻害により生体内のインクレチンの不活性化を遅らせる。これにより血中の活性型GLP-1濃度および活性型GIP濃度を高め、インスリン分泌を促進することによって血糖降下作用を発揮する。GLP-1受容体作動薬:膵臓細胞膜上のGLP-1受容体に結合しインスリン分泌を促進する。通常、生体内のGLP-1はDPP-IVにより血中半減期が1-2分と速やかに分解されるが、治療に用いられているGLP-1作動薬はDPP-IVによる分解に抵抗するように改変されているため、半減期が長いという特徴がある(図1)。

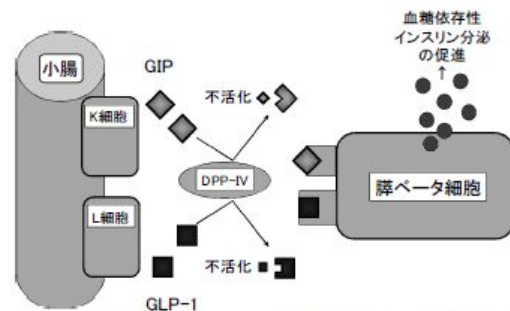


図1 糖尿病の治療薬として、GLP-1受容体作動薬とDPP-IV阻害薬が用いられている

またインクレチンには膵臓細胞に対するインスリン分泌の促進以外の作用、すなわち膵外作用を有している。中枢神経系に対する作用:食欲の減退、記憶力の改善、糖尿病性多発神経障害の改善。心血管系に対する作用:抗動脈硬化作用、最近の大規模臨床研究において、GLP-1受容体作動薬が心血管疾患(CVD: cardio-vascular disease)を有意に抑制することが示された。消化器系に対する作用:胃運動の抑制、肝臓の糖新生の抑制。骨格筋系に対する作用:インスリン感受性の向上。腎・泌尿器系に対する作用:腎保護作用。

一方、口腔疾患と経口糖尿病治療薬との関連については、培養脂肪細胞においてチアゾリジン系糖尿病治療薬であるピオグリタゾンは、

Porphyromonas gingivalis の内毒素 (lipopolysaccharide; LPS) が誘導するインターロイキン (IL)-6 を抑制すること (J Dent Res 84, 240-244, 2005)、また、ラット歯周病モデル系においてピグアナイド系糖尿病治療薬であるメトホルミンが歯槽骨の吸収を抑制すること (J Periodontol 81, 412-419, 2010) などが報告されているが、新規の糖尿病治療薬であるインクレチン関連薬においては in vitro および in vivo において報告例がなかった。

これまで私は主として歯周組織を構成する細胞における各種サイトカインの動態とマクロライド系抗生剤との関係を分子生物学的に解析する一連の研究に携わってきた。すなわちヒト歯根膜細胞において腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor) TNF- α が誘導する血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial cell Growth Factor; VEGF) の発現を、マクロライド系抗生剤であるロキシシロマイシンが転写因子 SP-1 や AP-1 を介して抑制する (J Periodontol 71, 1546-1553, 2000) ことを明らかにし、同じ系においてロキシシロマイシンが MAP キナーゼの中の JNK と ERK を介して MMP-1 の誘導抑制する (J Periodontol Res 43, 51-61, 2007) ことも報告した。また、ラット肝臓癌モデルにおいて、ロキシシロマイシンが VEGF の産生を減少させることで腫瘍性血管新生を抑制する (Anticancer Res 25, 133-138, 2005) ことを明らかにした。さらに、ヒト歯肉線維芽細胞において TNF- α が誘導する MMP (Matrix Metalloproteinase)-13 の発現をロキシシロマイシンが抑制する (J Periodontol Res 44, 283-288, 2009) ことも報告した。また同じ MMP に関連して、最近、ヒト歯髓細胞においてアナンダマイドが CB-1 受容体と TRPV-1 受容体を經由して MMP-2 を誘導する (J Endod 38, 786-790, 2012) ことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、新しい糖尿病治療薬であるインクレチン関連薬の根尖性歯周炎や辺縁性歯周炎の発症および進行に対する影響について検

討するため細胞培養系を用いた in vitro 実験を行った。すなわち、歯周組織構成細胞において炎症性因子の発現に対して同薬剤がどのような影響を及ぼすかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

矯正学的理由で抜歯したヒト小白歯由来の歯根膜細胞と歯髓細胞と、ヒト歯肉線維芽細胞を用いた。MMP-1 産生量の測定は、HGF を 24 穴プレートに 2.8×10^4 個播種した。種々の濃度の TNF- α 、LPS and/or GLP-1 受容体作動薬を含む培地で 24 時間 or 48 時間刺激し、培養上清を回収した。培養上清中の MMP-1 の濃度は ELISA (Quantikine) で、IL-6 の濃度は ELISA (BD Biosciences) を用いて測定した。3) HGF の細胞増殖能の測定: HGF を 96 穴プレートに 3.5×10^3 個播種した。種々の濃度の GLP-1 受容体作動薬 (エキセナチド) を含む培地で 96 時間培養し (48 時間で培地交換)、MTT 法により細胞の増殖能を測定した。4) 統計処理: 測定結果に対して Mann-Whitney U test を用い危険率 5% で統計処理を行なった。

4. 研究成果

まず、ヒト歯肉線維芽細胞において TNF- α が MMP-1 を誘導するかどうかについて調べた。ヒト歯肉線維芽細胞を TNF- α (0-62.5 ng/mL) で 48 時間刺激した後、培養上清を回収した。ELISA にて MMP-1 を測定すると、濃度依存的に MMP-1 の産生が認められた (図 2)。

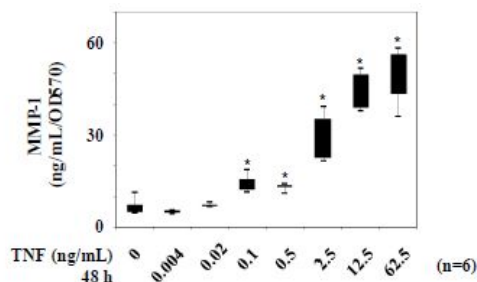


図2 ヒト歯肉線維芽細胞において TNF が誘導する MMP-1 の産生

次に、ヒト歯肉線維芽細胞において TNF- α が誘導する MMP-1 の産生に対する GLP-1 受容体作動薬 (エキセナチド) の影響を調べた。ヒト線維芽細胞を 12.5 ng/mL の TNF- α で 24 時間ある

いは 48 時間刺激した。その際、エキセナチドとの共存下あるいは含まない培地を用いて刺激を行った。培養終了後、上清を回収し、ELISA にてヒト歯肉線維芽細胞が産生した MMP-1 を測定した。TNF- α が誘導した MMP-1 の産生はエキセナチドにより抑制された (図3)。

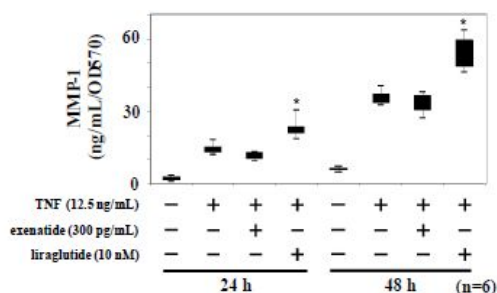


図3 ヒト歯肉線維芽細胞において TNF が誘導する MMP-1 の産生に対するエキセナチドの影響

さらに、ヒト歯肉線維芽細胞の細胞増殖能に対するエキセナチドの影響を検討した。ヒト歯肉線維芽細胞に対してエキセナチド(0-1500 pg/mL)を含む培地で 96 時間培養した。その後、MTT 法を行ったところ、エキセナチドは少なくとも 96 時間まではヒト歯肉線維芽細胞の増殖に影響を与えなかった (図4)。

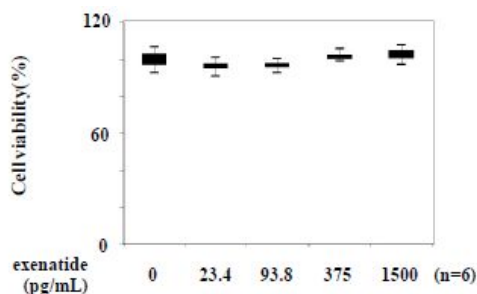


図4 ヒト歯肉線維芽細胞の増殖能に対するエキセナチドの影響

ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 の産生に対する GLP-1 受容体作動薬(リキシセナチド、デュラグルチド)の影響を検討した。ヒト歯肉線維芽細胞を、*Prevotella intermedia* 由来の LPS および TNF- α で 48 時間刺激した。培養終了後、ELISA にてヒト歯肉線維芽細胞が産生した IL-6 を測定すると、TNF- α が誘導した IL-6 の産生はデュラグルチドにより抑制され、LPS が誘導した IL-6 はリキシセナチドによって抑制された。

以上の結果より、インクレチン関連薬のうち GLP-1 受容体作動薬は、ヒト歯肉線維芽細胞に

おいて TNF- α や若年性歯周炎の原因菌の一つでもある *P. intermedia* の LPS が誘導する炎症性因子(MMP-1 や IL-6)の産生を抑制した。

MMP-1 は歯周組織の細胞外マトリックスを構成するコラーゲンを分解し、また、IL-6 は、活性化 B 細胞を抗体産生細胞への分化 好中球の遊走を促進 骨吸収の促進 等の作用を介して歯周病の成立機序に関与している。インクレチンがこれらの炎症性因子を抑制することにより、組織破壊メカニズムを抑え、正常な歯周組織のリモデリングに寄与する可能性がある。

糖尿病治療薬であるインクレチン関連薬には辺縁性歯周炎の炎症状態を改善するという新規の膵外作用を有する可能性が示唆された。

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 1 件)

徳田雅行, 河井絢矢, 作田哲也, 小山徹, 宮下桂子, 藤澤真理, 江本真規子, 森元陽子, 鳥居光男, 松下健二: ヤマブシタケ抽出物の抗菌活性 - 試験管内およびヒト口腔内における検討 - . 日歯保存誌 57 秋季特別号, 153, 2014, 査読有.

http://www.hozon.or.jp/member/publication/abstract/file/abstract_141/P41-80.pdf

〔学会発表〕(計 1 件)

作田哲也

ヒト歯肉線維芽細胞における MMP-1 産生に対する GLP-1 受容体作動薬の調節作用

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科口腔先端科学教育研究センター 歯系研究発表会プログラム・抄録集, 20, 2015, 査読有

平成27年12月5日 鹿児島県鹿児島市(鹿児島大学桜ヶ丘キャンパス鶴陵会館大ホール)

6. 研究組織

(1)研究代表者

作田 哲也 (SAKUTA, Tetsuya)

鹿児島大学病院・歯科総合診療部・助教

研究者番号: 20284888