

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862043

研究課題名(和文) インスリン抵抗性が歯周炎の進行へ及ぼす影響とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) The effect of insulin resistance on gingival inflammation

研究代表者

水谷 幸嗣 (Mizutani, Koji)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60451910

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)：肥満によるインスリン抵抗性モデル動物のZucker Fatty (ZF) ラットと対照動物の下顎臼歯部の辺縁歯肉を解析したところ、ZF群でプロテインキナーゼCの活性と、炎症性マーカー、酸化ストレスマーカーの発現が有意に高かった。さらにインスリンシグナリング阻害の評価として歯肉へのインスリン刺激を行ったところAkt、eNOSのリン酸化が対照群に比べて有意に低かったが、PKC阻害薬、抗酸化剤によりAkt、eNOSのリン酸化が一部回復をした。本研究により、肥満状態での歯肉におけるインスリンシグナルの阻害は血管内皮も含めて生じており、その阻害にはPKC活性化、酸化ストレスの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gingival samples were collected from fatty (ZF) and lean (ZL, control) Zucker rats. Activities of protein kinase C (PKC) were significantly increased in the gingiva from ZF rats compared with those from ZL rats. Expression of oxidative stress markers was significantly increased in ZF rats. Analysis of the gingiva showed that insulin-induced phosphorylation of IRS-1, Akt, and eNOS was significantly decreased in ZF rats, but Erk1/2 activation was not affected. General PKC inhibitor and an anti-oxidant normalized the action of insulin on Akt and eNOS activation in the gingiva from ZF rats. This provided the first documentation of obesity-induced insulin resistance in the gingiva. Analysis of our data suggested that PKC activation and oxidative stress may selectively inhibit insulin-induced Akt and eNOS activation, causing endothelial dysfunction and inflammation.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 肥満 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

歯周病と糖尿病が相互に影響を及ぼすことは、疫学的調査や介入研究により広く認識されている。近年では、肥満も、歯周病のリスクファクターとしてもなりうる多くの疫学的調査により示され始めており、そのうちのいくつかの研究により、慢性的な高血糖状態とは独立して、肥満が歯周炎と関連していることが示されている。これは、肥満により生じる全身レベルでの慢性炎症、酸化ストレスやインスリン抵抗性が関与していることが示唆されている。

インスリン抵抗性は、主要な糖尿病慢性合併症の発現に強く関わっていることが知られている。特に網膜症や腎症などの細小血管症、さらに動脈硬化性病変である大血管症においても、その発症と悪化の重要な要因となっていると認識されており、血管内皮細胞におけるインスリン抵抗性の発現について数多くの研究がなされ (Mima, Mizutani et al. Diabetes 2012)、分子生物学的な背景が明らかにされつつある。

一方、糖尿病や肥満状態にあるラットに実験的歯周炎を惹起した場合に、健康なラットよりも著しく骨吸収が生じることが、いくつかの報告により示されているものの、その機序はほとんど明らかにされていない。しかしその現象の説明として、他の糖尿病合併症を発症する臓器と同じく、歯周組織も血管を比較的豊富に有するため、インスリン抵抗性の発現を介した血管内皮機能不全が、肥満や糖尿病の状態と、歯周組織破壊の進行を結び付けると考えられる。

2. 研究の目的

前述の背景と、これまでの研究成果をもとに、本研究計画では歯周組織におけるインスリン抵抗性と、歯周炎進行に対するその影響の検索を目的とし、以下の事項を明らかにする。

(1) インスリン抵抗モデルとして肥満および糖尿モデル動物の歯肉における eNOS の発現の定量と、血流量の測定を行い、両モデルが歯肉の血管内皮細胞の機能障害を引き起こしているかを評価をする。これまでに、インスリン抵抗モデル動物における脂肪の微小血管や大動脈の内皮細胞では eNOS の発現および活性化の低下が報告されており (Naruse et al. Diabetes 2006)、歯肉においても同様にインスリン抵抗性が血管内皮機能に影響を与えているか明らかにする。

(2) 肥満および糖尿モデル動物の歯肉に対してインスリン刺激を行い、歯肉のインスリン経路のどの段階に障害が生じ、2つのインスリン経路 (PI3Kinase-Akt-eNOS 経路と MAPK 経路) にどの程度の障害が生じるか評価をする。糖尿病合併症として血管障害がみら

れる臓器では、前者のみが阻害されることが報告されているため、歯周炎が糖尿合併症と同様の病態を示すかを明らかにする。

(3) 歯肉におけるインスリン抵抗性の発現に PKC のどのアイソフォームがもっとも関与しているかを明らかにする。現在、糖尿病性網膜症では PKC- β (Gerald et al. Nature Med 2009)、糖尿病性腎症では PKC- δ が関与していること (Mima et al. Kidney International 2011) が示されており、臓器特異的な PKC 活性とインスリン抵抗性発現の関連を検索する。

(4) 肥満モデルおよび糖尿モデルのいずれも酸化ストレスの亢進が腎臓や網膜では生じていることが知られており、歯周組織への影響、および歯周炎の進行への関与を酸化ストレスマーカーの発現によって明らかにする。

3. 研究の方法

肥満モデルラットの歯肉にインスリン刺激を *ex vivo* にて行い、インスリンシグナル経路上のタンパクの発現や活性化についてそれぞれの対照群と比較を行う。

肥満モデルとして Zucker Fatty および Lean ラット、12 週齢オス、各 6 頭を用い、以下を行った。

血液検査：血清中の血糖、インスリン、遊離脂肪酸、IL-6、TNF- α などを測定

歯肉片採取：安楽死後、下顎臼歯部より辺縁歯肉を切除

インスリン刺激：採取した歯肉を 0.1%DMEM 培養液中にて飢餓状態としたのち、30 分間の 100nM インスリン刺激を行う。タンパクのリン酸化の解析：

インスリン刺激により 2つのインスリン経路 (PI3Kinase-Akt-eNOS 経路と MAPK 経路) にどの程度の障害が歯肉に生じているか解析するために、刺激後の歯肉をホモジナイズ、融解し、Akt, eNOS と MAPK のひとつである Erk のリン酸化をウェスタンブロッティングにて評価する。さらにインスリンレセプターのどの部位から障害が生じているかを解析するため、同サンプルを免疫沈降法にて IR 1、IRS1、IRS2 のチロシンリン酸化を評価する。

4. 研究成果

ZF 群は有意に高い体重、および血中のインスリン濃度、遊離脂肪酸、CRP を示したが、両群とも歯槽骨吸収量に差は見られなかった。歯肉を解析したところ、ZF 群で PKC の活性が有意に高く、また酸化ストレスマーカーの発現も有意に高いレベルであった。さらに歯肉へのインスリン刺激を行ったところ Akt および eNOS のリン酸化が対照群に比べて有意に低かった。しかしながら、PKC 阻害薬、抗酸

化剤の存在下では Akt、eNOS のリン酸化が一部回復をした。

本研究により、初めて歯肉におけるインスリン抵抗性が定量的に分析され、肥満状態での歯肉におけるインスリンシグナルの阻害は血管内皮も含めて生じていることが判明した。そして、その阻害には PKC 活性化および酸化ストレスが関与していることが示唆された。

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 3 件)

(1) Obesity-associated Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance. Mizutani K, Park K, Mima A, Katagiri S, King GL. *J Dent Res*. 93(6):596-601. 2014. (査読あり)

(2) Serine phosphorylation sites on IRS2 activated by angiotensin II and protein kinase C to induce selective insulin resistance in endothelial cells. Park K, Li Q, Rask-Madsen C, Mima A, Mizutani K, Winnay J, Maeda Y, D'Aquino K, White MF, Feener EP, King GL. *Mol Cell Biol*. 33(16):3227-3241. 2013 (査読あり)

(3) Induction of vascular insulin resistance and endothelin-1 expression and acceleration of atherosclerosis by the overexpression of protein kinase C- β isoform in the endothelium. Li Q, Park K, Li C, Rask-Madsen C, Mima A, Qi W, Mizutani K, Huang P, King GL. *Circ Res*. 113(4):418-427. 2013 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 長谷川真夕, 水谷幸嗣, 南原弘美, 小林

宏明, 和泉雄一 高血糖が歯肉上皮細胞の創傷治癒におよぼす影響 第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会(神戸国際会議場、兵庫県神戸市)2014 年 10 月 19 日

(2) Hasegawa M, Mizutani K, Nanbara H, Kobayashi H, Izumi Y. Insulin Resistance Impairs Gingival Wound Healing Via PKC Activation. 2015 IADR General Session & Exhibition 2015.3.14. Boston, MA, USA

〔図書〕(計 1 件)

Diabetes – Impact of diabetes mellitus on oral cavity and effects of dental care in patients with diabetes mellitus. Izumi Y, Mizutani K, Aoyama N. *The current evidence of dental care and oral health for achieving healthy longevity in an aging society 2015*. p.72-81. Japan Dental Association. Tokyo, Japan. March 13, 2015

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 幸嗣 (MIZUTANI, Koji)
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研
究科 助教
研究者番号: 60451910

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: