

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861812

研究課題名(和文) 歯周組織構成細胞を介した高血糖・高飽和脂肪酸による炎症誘導と自然免疫の影響

研究課題名(英文) The effects of high glucose and saturated fatty acid on the inflammation and innate immunity in periodontal tissue component cells

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は罹患率の高い病気であり、歯周病のリスク因子として位置付けられ、病態の重症化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)：Diabetes is often associated with increased prevalence and advanced pathology of periodontal disease. We hypothesized that gingival epithelial cells modify periodontal disease progression, and predicted that hyperglycemia would activate an inflammatory response in human gingival epithelial cells (HGECS). We tested this in immortalized HGECS isolated from periodontal tissue. The HGECS cultured in high and normal glucose (NG) conditions. The epi 4 cells showed increased inflammatory cytokines and toll-like receptor 2 protein secretion and mRNA expression when cultured in HG compared with NG. These effects were not associated with increased cell proliferation and were not observed in a hyperosmolar control group. The increased IL-8 secretion in HG was inhibited by pretreatment with an antioxidant and protein kinase C inhibitor. These suggest a potential mechanism for how, in diabetes, hyperglycemia could provoke an excessive host inflammatory response, exacerbating periodontal disease.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 糖尿病 歯肉上皮細胞 高血糖 IL-8

## 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終末糖化産物とそのレセプターである AGE/RAGE シグナル、プロテインキナーゼ C (PKC) シグナル、酸化ストレスシグナル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、歯周病の増悪化に関す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に対する基礎的研究を目的とする。

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、

既にいくつかの cell line を樹立している。epi 4 と名付けた cell line を始め、それらの歯肉上皮細胞株は歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 菌の刺激により炎症反応が誘導されることは、当研究室の以前の研究により確認されている。本研究計画においてはこれらの 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 25mM) 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 については刺激 24、48、72 時間後、CCL2 (MCP-1)、TNF- $\alpha$ 、HMGB1 については 48 時間後で realtime PCR 法にて比較検討した。また、刺激後 72 時間後の培養上清中の IL-8 タンパク量を ELISA 法にて測定し検討した。高血糖の効果が浸透圧によるものであるかについて同濃度のマンニトールを付加することによりその影響について検討した。TLR2,4 遺伝子発現を realtime PCR 法にて、TLR2 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、酸化ストレスシグナルの関与について検討した。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。

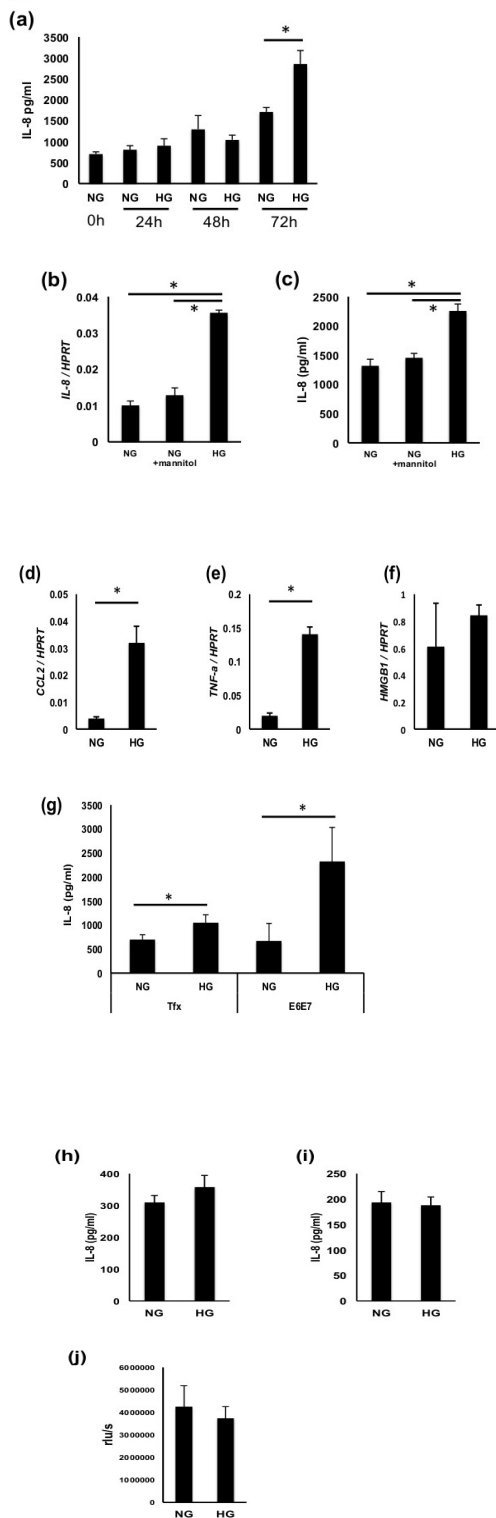
## 4. 研究成果

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、CCL2(MCP-1)、TNF- $\alpha$  について高血糖の効果により培養 48h に mRNA 発現の上昇がみられたが、HMGB1 に対しての mRNA 発現に影響はみられなかった。また、IL-8 については培養 72 時間における培養上清中のタンパク発現についても検討し、高血糖の効果により有意な発現増強が確認された。(図 1 a~f) さらに高濃度グルコース下における細胞に対する浸透圧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 48 時間の mRNA 発現、72 時間でのタンパク発現について IL-8 の発現変化にて影響が無いことを確認した。(図 1 b,c)

次に、高血糖の効果について当研究室にて樹立した他の 2 つの cell line についても検討し、培養 72 時間後の培養上清中の IL-8 タンパク産生量について検討した結果、epi 4 細胞と同様に産生の有意な増強が確認された。(図 1 g) 歯周組織を構成する歯肉線維芽細胞 (図 1 h) と歯根膜細胞 (図 1 i) についても同条件にてタンパク産生量を ELISA 法に

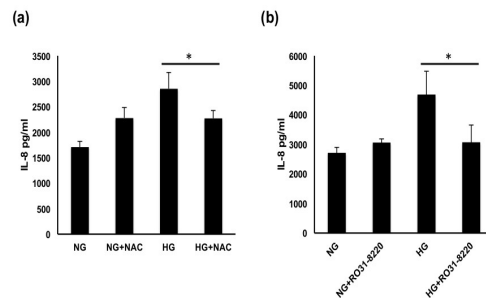
て検討したが、産生に変化はみられなかった。そして、歯肉上皮細胞における高血糖の効果により細胞の増殖能には差はみられないことを細胞増殖 ELISA, である BrdU 発色キットを用いて測定し確認した (図 1j)。

図 1



次に、高血糖の細胞内シグナル経路として PKC シグナル、酸化ストレスシグナルの関与について検討した。PKC 阻害薬 Ro31-8220 メタンサルホン酸塩 (5 μM) と酸化ストレスシグナル阻害薬 N-acetylcysteine (NAC (10 mM)) にてそれぞれ 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 発現上昇に対するそれぞれの阻害効果を認めた (図 2)。

図 2



歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 菌の認識レセプターとして知られている TLR2 と TLR4 について、高血糖条件下培養した歯肉上皮細胞において発現変化がみられるかについて検討した。

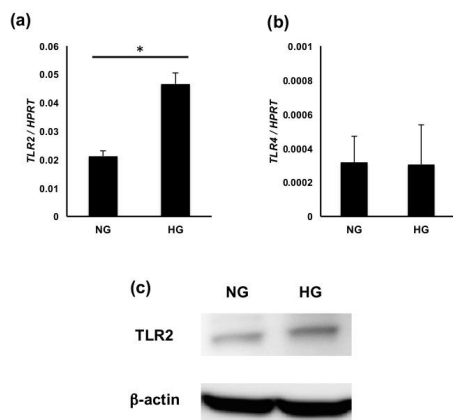
TLR2 については高血糖下培養 48 時間にて mRNA 発現が有意に上昇するのが確認された (図 3a)。そして 72 時間のセルライゼート中のタンパク量をウェスタンブロット法にて検討した結果、高血糖の効果にて発現の増強が確認された (図 3c)。TLR4 については今回実験に供した Cell line においては mRNA 発現が微量であり高血糖の効果による発現の変化は観察できなかった (図 3b)。

さらに、フローサイトメトリーにて細胞表面の TLR2 発現にて検討を行った。高血糖下培養 72 時間後の epi 4 について抗 TLR2 抗体にてフローサイトメトリーを行ったところ、高血糖の効果にて有意に発現の上昇が確認された。(図 4)

以上のことは、

「High glucose-induced oxidative stress increases IL-8 production in human gingival epithelial cells.」として Oral Diseases 誌に投稿し、2016 年 5 月 12 日にアクセプトされ in press の状態である。

図 3



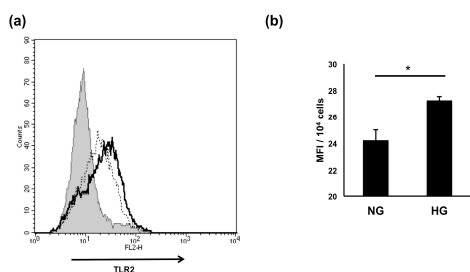
(1) 研究代表者

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

図 4



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, Takedachi M, Mori K, Kubota M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S: High glucose-induced oxidative stress increases IL-8 production in human gingival epithelial cells. Oral Dis (in press), May 12; doi: 10.1111/odi.12502, 2016 (査読あり)

6. 研究組織