

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15701

研究課題名(和文) 老化促進物質AGE(最終糖化産物)による歯髄、歯肉、歯槽骨への細胞機能障害の解析

研究課題名(英文) Analysis of the disorder on cell function induced by advanced glycation end-product (AGE) in dental pulp, gingival and alveolar bone tissues

研究代表者

永田 俊彦(NAGATA, Toshihiko)

徳島大学・本部・理事

研究者番号：10127847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄、歯肉、骨の培養系における最終糖化産物(AGE)とリポ多糖(P-LPS)の作用及びシグナル伝達機構について調べた結果、歯髄細胞では、RAGE-MAPK経路を介しS100蛋白が上昇して歯髄石灰化が促進された。骨芽細胞では、オステオカルシンなどの骨形成指標の低下を通じP-LPSによる骨の石灰化抑制が助長され、骨細胞では、MAPK、P13K、NF- κ Bの関与が示唆された。一方、歯肉細胞では、MAPK経路の関与が同様に示唆されるとともに、AGEはIL-6やICAM1の発現を増加させた。以上の結果は、AGEが老化や糖尿病における歯髄疾患や歯周病の特徴的有害性指標になりうることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effects of advanced glycation end-product (AGE) on 3-type cultured cells; dental pulp cells, bone cells and gingival cells. In some cell cultures, additive effects of AGE with P-gingivalis-derived lipopolysaccharide (P-LPS) were studied. In dental pulp cells, AGE induced pulp calcification by the increase of S100A and A9 expression via RAGE-MAPK pathway. In osteoblastic cells, AGE and P-LPS independently reduced alkaline phosphatase activity and bone nodule formation. The addition of both AGE and LPS further decreased these markers. AGE markedly decreased the protein levels of type 1 collagen and osteocalcin, and increased IL1 and S100A8. In gingival fibroblasts, AGE increased expression of IL-6 and ICAM1, and the ICAM1 expression decreased by NF- κ B inhibitors. These results demonstrate that AGE may be a potent indicator in dental pulp and periodontal diseases of diabetic and aging patients.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 糖尿病 老化 歯髄 歯肉 骨

1. 研究開始当初の背景

AGE はファーストフードなどの高温加熱食物に多量に含まれ、体内に蓄積して皮膚や血管の老化を促進し、糖尿病や心臓脳血管障害など多疾患の発症に関与するだけでなく、AGE そのものが各種細胞に作用して毒性を示す。AGE の代表は糖化ヘモグロビン (HbA1c) であり、HbA1c は糖と蛋白の初期反応 (可逆的) で生じた化合物で、反応が進むと後期反応 (不可逆的) が起こった結果、AGE が産生される。糖尿病の悪化には AGE の蓄積と細胞への障害が深く関わっている。例えば、食事内 AGE 量を抑制すると糖尿病の発症率が減少する (Peppas *et al.*, 2003)。AGE はインスリン抵抗性を惹起する (Unoki *et al.*, 2008) などの事実が明らかにされている。さらに、AGE の作用は細胞によって異なり、骨芽細胞に対しては分化抑制的で、血管平滑筋細胞に対しては分化促進的である。AGE の作用は一般にその受容体 RAGE を介して起こるが、細胞によって伝達経路も異なっている。歯科保存学領域における AGE の意義については全く知られていない。我々は歯髄における AGE の石灰化促進作用を報告したが、歯髄や歯周組織における AGE を主役にした研究報告はきわめて少ない。

2. 研究の目的

AGE の作用は多彩であり、細胞や臓器において種々の機能障害を誘導する。歯科保存学領域での AGE 研究は進んでおらず、う蝕や歯周病の進展や口腔組織の老化の進行に AGE がどのように関わっているかは全く知られていない。本研究は、歯や歯周組織における AGE の作用の実態と存在意義を知るために、歯髄細胞、歯肉線維芽細胞、骨芽細胞の3種の培養系を用いて、種々の病態関連指標 (石灰化マーカー、炎症マーカーなど) の発現に及ぼす AGE の影響を比較検討し、各細胞での反応性の違いやシグナル伝達の違いを把握し、歯科保存学領域における「AGE

学」の基礎を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

実験は2つのカテゴリーに分けて行った。(1) 歯髄細胞、歯肉細胞、および骨細胞の石灰化指標 (アルカリフォスファターゼ活性、石灰化結節の形成など)、および炎症指標 (Interleukin1- β などのサイトカインの発現) に及ぼす AGE の影響の比較検討、および炎症惹起物質である *P. gingivalis* 由来リポ多糖 (P-LPS) が誘導する各種細胞の反応における AGE 存在下での影響、(2) 各種細胞における AGE 作用のシグナル伝達経路の解析と比較について、細胞培養法、生化学分析法、分子生物学分析法を駆使して定性的および定量的分析を行った。

材料と方法: 8週齢雄 Wistar ラットの上顎切歯から歯髄組織を取り出し、細切、トリプシン処理の後、EMEM 培地で細胞培養を行い、3代継代したものを実験に用いた (Nakajima *et al.*, 2013)。歯肉組織は株価された歯肉線維芽細胞 (CRL2014 細胞) および歯肉上皮細胞 (OBA-9) を用いた。を実験に用いた。また、骨の細胞として Wistar ラットの骨髄細胞をデキサメサゾン存在下で培養し分化した骨芽細胞 (Maniopoulos *et al.*, 1988) および株化細胞として、マウス骨細胞 (MLO-Y4-A2 細胞) も用いた。

AGE は、Takeuchi らの方法 (2009) に従って、血清アルブミン、グリセロアルデヒド等を 37°C で 7 日間加熱処理して作製した。P-LPS は市販の *P. gingivalis* 由来 LPS 標品 (Invirogen, USA) を使用した。AGE の受容体である RAGE の発現および炎症性サイトカイン遺伝子の発現は定量化 RT-PCR 法で測定した。サイトカインの発現は、ELISA 法によって蛋白レベルでも検討した。

4. 研究成果

歯髄細胞、骨細胞 (骨芽細胞、骨細胞) および歯肉細胞 (歯肉線維芽細胞、歯肉上皮

細胞) 培養系を用いて、AGE および P-LPS の作用ならびにシグナル伝達機構について調べた。

(1) 歯髄細胞

歯髄細胞のアルカリフォスファターゼや石灰化は過去に報告したように AGE によって促進された (図 1)。

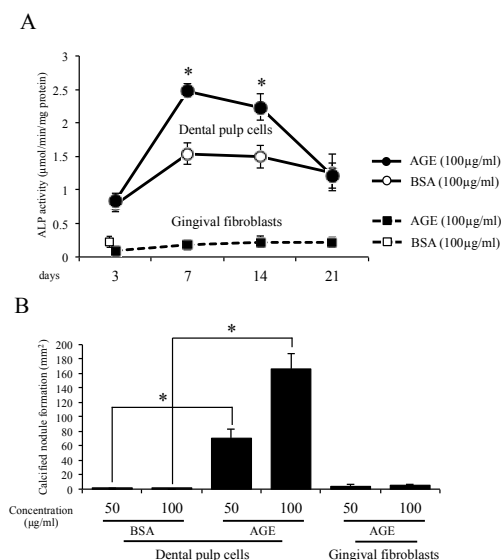


図 1 歯髄細胞のアルカリフォスファターゼ(A)および石灰化(B)に及ぼす AGE の影響

その際、炎症性分子 S100A8 蛋白、S100A9 蛋白、IL-1βのいずれも AGE によって誘導され、IL-1βは24時間後に、S100A8 および A9 蛋白は 48 時間後に著しく上昇し、石灰化が進行する一方で炎症性分子も強く発現していることが分かった (図 2)。

また、AGE の受容体である RAGE の抗体存在下では、AGE は S100A8 および A9 蛋白発現は上昇しなかった。さらに、AGE によって上昇した S100A8 および A9 蛋白は 2 種の阻害剤 (PD98059 および SB203580) によって抑えられた (図 3)。これら結果から、歯髄が高血糖状態 (AGE の作用下) で惹起される炎症分子発現機構として、RAGE-MAPK 経路の関与が考えられた。

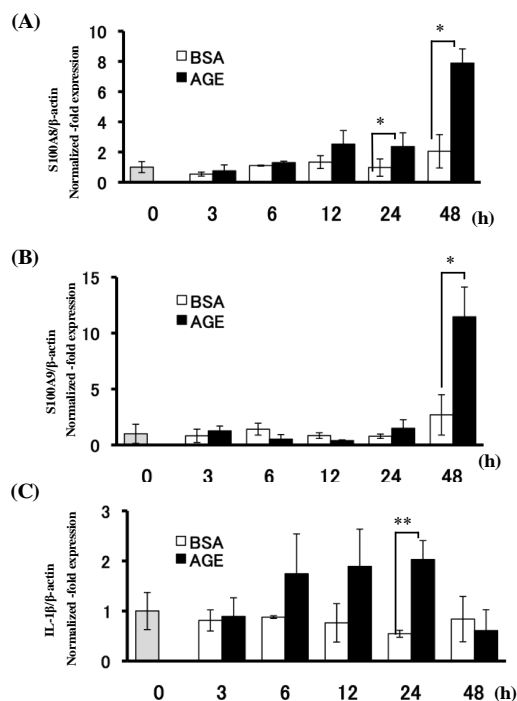


図 2 ラット歯髄細胞における AGE の S100A8 蛋白(A)、S100A9 蛋白(B)、IL-1β(C) の mRNA の発現に及ぼす影響

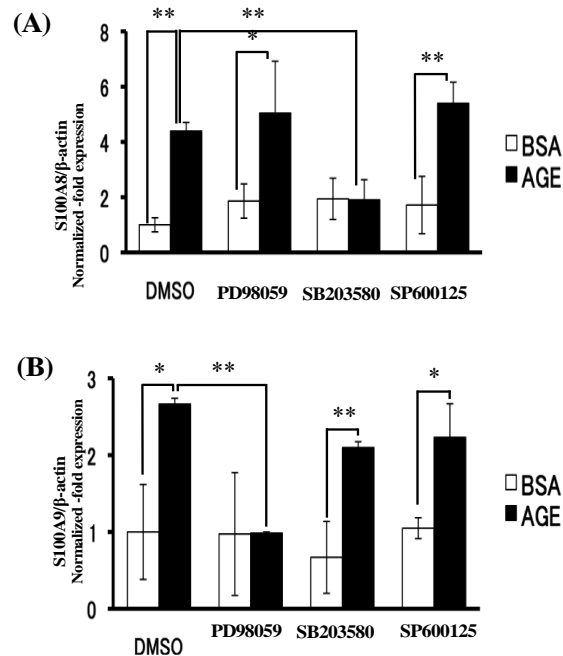


図 3 ラット歯髄細胞における AGE のシグナル伝達検索。PD98059 は MEK1-inhibitor、SB203580 は P38-inhibitor、SP600125 は JNK-inhibitor。

(2) 骨細胞 (骨芽細胞、骨細胞)

ラット骨髄細胞由来の骨芽細胞培養系における AGE と P-LPS の作用を調べた結果、AGE

と P-LPS はそれぞれにアルカリフォスファターゼおよび石灰化を抑制し、両者を同時に添加することによって抑制作用がさらに高まることが明らかになった(図4)。この状況でオステオカルシンなどの骨形成指標の mRNA や蛋白発現は著しく低下し、炎症指標である IL-1 β や S100A8 蛋白の発現は上昇し、AGE と P-LPS は、共同で骨の破壊に関与している可能性が示唆された。

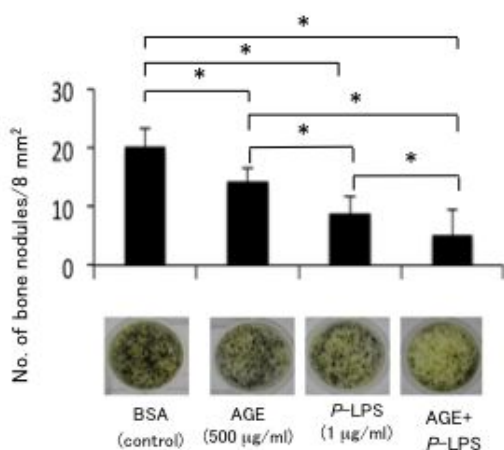


図4 ラット骨芽細胞の石灰化に及ぼす AGE と P-LPS の共同抑制作用

一方、マウス骨細胞 (MLO-Y4-A2 細胞) では、骨細胞の特異的のマーカとして知られる骨形成を抑制する分泌蛋白スクレロステインの発現が AGE と P-LPS の共同添加で増加することが観察された。

これらの結果から、骨の細胞では AGE は P-LPS とともに骨形成機能を抑える作用を有しており、高血糖の状態では、AGE が歯周組織の骨破壊に重要な役割を果たしていることが示唆された。

(3) 歯肉細胞

ヒト歯肉線維芽細胞 (CRL2014 細胞) に AGE を添加し、炎症関連遺伝子の発現を調べた結果、IL-6 や ICAM1 が mRNA および蛋白レベルで増加するのが確認された。また、IL-6 と可溶性レセプター添加により ICAM1

発現が増加し、IL-6 をノックダウンさせると AGE 誘導性の ICAM1 発現が抑制された。さらに、AGE による IL-6 発現増加は p38、ERK、NF- κ B の阻害剤で抑制された。これらの結果より、AGE は歯肉線維芽細胞で MAPK や NF- κ B 経路を介して IL-6 や ICAM1 の発現を誘導し、糖尿病関連歯周炎の病態に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、S100A8 および A9 の複合体であるカルプロテクチンは、CRL2014 細胞の TLR4 を介して IL-6 や MCP-1 などの炎症性関連因子を誘導し、TLR4 の siRNA を導入し TLR4 発現をノックダウンさせると、カルプロテクチンによる p38、MAPK、JNK、ERK のリン酸化が抑制され、IL-6 および MCP-1 の産生も有意に抑制された。

一方、ヒト歯肉上皮細胞 (OBA-9 細胞) では、AGE により S100A8 および A9 蛋白の発現が増加し、P-LPS の共存下ではさらなる増加が観察された。また、RAGE 遺伝子のノックダウン、MAPK や NF- κ B の阻害剤により AGE および P-LPS 誘導性の S100A8 および A9 蛋白の発現が抑制された。

これらの結果から、歯肉上皮細胞においても AGE は MAPK や NF- κ B 経路を介して S100A8 および A9 蛋白発現を誘導し、糖尿病関連歯周炎の病態に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(4) まとめ

今回の研究成果から、歯髄、骨、歯肉という歯科保存学領域の主要組織において AGE は組織為害性を発揮していることが明らかであり、高血糖は歯髄疾患や歯周病に対して炎症反応を介して悪影響を及ぼすことが示唆された。

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) Calprotectin induces IL-6 and MCP-1 production via Toll-like receptor 4 signaling in human gingival fibroblasts. Nishikawa Y, Kajiura Y, Lew J-H, Kido J, Nagata T, Naruishi K. J Cellular Physiology: 232: 1862-1871, 2017. (査読あり)
- (2) Inhibitory effects of advanced glycation end-products and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the expression of osteoblastic markers of rat bone marrow cells in culture. Sakamoto E, Mihara C, Ikuta T, Inagaki Y, Kido J, Nagata T. J Periodontal Research 51: 313-320, 2016. (査読あり)
- (3) Advanced glycation end-products increase expression of S100A8 and A9 via RAGE-MAPK in rat dental pulp cells. Nakajima Y, Inagaki Y, Kido J, Nagata T. Oral Diseases 21: 328-334, 2015. (査読あり)

[学会発表](計8件)

- (1) AGE and *Porphyromonas gingivalis*-LPS increase sclerostin expression in osteocytes. Sakamoto E, Inagaki Y, Kido J, Takagi R, Naruishi K, Nagata T. 95th General Session of the IADR (International Association of Dental Research) San Francisco, CA, USA, March 22-25, 2017.
- (2) Advanced glycation end-products increase calprotectin in human gingival epithelial cells. Hiroshima Y, Sakamoto E, Abe K, Yoshida K, Naruishi K, Nagata T, Shinohara Y, Geczy CL, Kido J. 95th General Session of the IADR (International Association of Dental Research) San Francisco, CA, USA, March 22-25, 2017.
- (3) 最終糖化産物はヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 および ICAM1 の発現を増加する。板東美香、梶浦由加里、野中康

- 平、坂本英次郎、成石浩司、木戸淳一、永田俊彦. 第 59 回秋季日本歯周病学会、朱鷺メッセ、新潟県新潟市、2016 年 10 月 7-8 日.
- (4) 最終糖化産物はヒト歯肉上皮細胞における S100A8 および S100A9 発現を上昇する。廣島佑香、木戸淳一、坂本英次郎、阿部佳織、吉田賀弥、永田俊彦、篠原康雄. 第 59 回秋季日本歯周病学会、朱鷺メッセ、新潟県新潟市、2016 年 10 月 7-8 日.
- (5) High glucose enhances IL-6-induced protease productions in gingival fibroblasts. Lew JH, Naruishi k, Kajiura Y, Nishikawa Y, Kido J, Nagata T. 94th General Session of the IADR (International Association of Dental Research) Seoul, Korea, June 22-25, 2016.
- (6) カルプロテクチンはヒト歯肉線維芽細胞の TLR4 を介して炎症性関連因子の発現を亢進する。西川泰史、成石浩司、梶浦由加里、Lew Jung Hwan、永田俊彦. 第 144 回春季日本歯科保存学会、栃木県総合文化センター、栃木県宇都宮市、2016 年 6 月 9-10 日.
- (7) 骨細胞培養系における AGE と LPS 刺激によるスクレロスティンの発現上昇。稲垣裕司、坂本英次郎、木戸淳一、梶浦由加里、Lew Jung Hwan、永田俊彦. 第 59 回春季日本歯周病学会、かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市、2016 年 5 月 20-21 日.
- (8) 最終糖化産物は口腔上皮細胞の遺伝子発現を調節する。坂本英次郎、木戸淳一、梶浦由加里、板東美香、稲垣裕司、成石浩司、生田貴久、永田俊彦 第 58 回秋

季日本歯周病学会、アクトシティ浜松、
静岡県浜松市、2015年9月12-13日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 俊彦 (NAGATA, Toshihiko)
徳島大学・本部・理事
研究者番号：10127847

(2) 研究分担者

中島 由紀子 (NAKAJIMA, Yukiko)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：70709526