

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17352

研究課題名(和文) 糖尿病病態の歯周組織におけるS100A8の役割と作用機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism of S100A8 in diabetes-associated periodontitis

研究代表者

廣島 佑香 (HIROSHIMA, Yuka)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：60545143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病関連歯周炎では歯周組織における最終糖化産物(AGE)の蓄積により炎症や組織破壊が促進し、病態が重症化する場合がある。しかしその詳細なメカニズムは解明されていない。本研究は、ヒト歯肉上皮細胞に着目し、S100A8が糖尿病病態の歯周組織においてどのような影響を及ぼすか検討を行った。ヒト歯肉上皮細胞においてAGEで発現が誘導されたS100A8はIL-6、CCL2およびSAA2など炎症関連因子を抑制した。また、S100A8は細胞内ROS産生量には変化を及ぼさなかった。結果から、S100A8の抗炎症作用が糖尿病病態の歯周組織における炎症増悪を抑制し、生体恒常性を維持している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病病態において歯周組織における最終糖化産物(AGE)の蓄積は歯周炎の増悪に深く関与している。S100A8は歯肉上皮細胞で恒常的に発現し、炎症マーカーとして知られている。歯肉上皮細胞においてS100A8はAGEで発現が誘導され、AGEとの共存下では炎症性サイトカインを抑制した。糖尿病病態の歯周組織におけるS100A8の抗炎症作用は生体恒常性の維持に関与し、生理的役割の解明に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end-products (AGEs) in gingival tissues of diabetes patients aggravate periodontal disease, but the mechanisms are unknown. In this study, we focused on human gingival epithelial cells and examined the effects of S100A8 on periodontal tissue in diabetic conditions. S100A8, which was induced by AGE in human gingival epithelial cells, suppressed inflammatory factors such as IL-6, CCL2 and SAA2. S100A8 did not change the intracellular ROS production. These results suggest that the anti-inflammatory effect of S100A8 may suppress the exacerbation of inflammation in periodontal tissue in diabetic conditions and maintain biological homeostasis.

研究分野：歯周病学

キーワード：最終糖化産物 歯周病 S100A8

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト S100A8 は 2 つの EF-hand モチーフを持つ低分子カルシウム結合性 S100 タンパク質に属しており、恒常的に顆粒白血球や歯肉上皮細胞に存在している。また、生体内では S100A9 とヘテロ二量体 (S100A8/S100A9, 別名カルプロテクチン) を形成し、その発現は歯周病を含む様々な炎症性疾患において亢進することが知られている。

近年、S100A8 は Toll-like receptor 4 (TLR4) や最終糖化産物 (Advanced glycation end-products: AGEs) の受容体 RAGE の内因性リガンドとして働き、炎症性サイトカインを誘導し、局所の炎症増悪・慢性化への関与が報告されている。一方で、申請者はこれまでに S100A8 に抗炎症作用があることを報告しており、他にも抗酸化作用や皮膚の創傷治癒を促進することなどが報告されている。

歯周病は糖尿病の合併症の一つであり、糖尿病患者では歯周病の罹患率が高く、その病態が悪化しやすいことが知られている (糖尿病関連歯周炎)。糖尿病関連歯周炎の病態においては、歯周組織への最終糖化産物 (Advanced glycation end-products: AGEs) の蓄積により炎症や組織破壊が促進し、歯周炎の病態が重症化することなどがこれまでに報告されている。加えて、歯周病原細菌のリポ多糖 (LPS) が TLR を介して炎症性反応を誘導することで、炎症の持続や組織修復の傷害が生じ、重篤化をもたらしている。歯肉上皮は歯周病原性細菌と宿主が最初に接する部位でありながら歯肉上皮に着目して糖尿病関連歯周炎の病態について調べた報告はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究では、歯肉上皮細胞に着目し、S100A8 が糖尿病病態の歯周組織においてどのような影響を及ぼすか検討を行った。歯肉上皮における S100A8 の影響を検討することにより、糖尿病関連歯周炎の病態について新たな見解を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養:

不死化したヒト歯肉上皮細胞株 (OBA-9 細胞) を bovine pituitary extract (BPE) と epidermal growth factor (EGF) を含んだ keratinocyte-SFM 培地を用い、5%CO₂ 存在下、37 °C にて培養した。サブコンフルエントに達した後、*AGE (500 µg/ml) と **PgLPS (1 µg/ml) あるいは S100A8 (1 µg/ml) を細胞に添加し、実験に供した。なお、添加前には BPE と EGF を含まない培地で 2 時間培養した。

*AGE は BSA と glyceraldehyde の混合による Takeuchi らの方法 (Mol Med, 2000) により作製

**PgLPS は *Porphyromonas gingivalis* 由来の Lipopolysaccharide

(2) 遺伝子発現分析:

DNA マイクロアレイ解析

OBA-9 細胞に AGE (500 µg/ml) と PgLPS (1 µg/ml) を添加し 24 時間培養した。培養後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA をマイクロアレイ分析 (Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array) を用いて、炎症性サイトカイン、自然免疫関連因子、抗菌ペプチドなどの遺伝子を中心にその発現について網羅的に対照群と比較検討を行った。

real-time PCR 法

OBA-9 細胞に AGE (500 µg/ml) と PgLPS (1 µg/ml) あるいは S100A8 (1 µg/ml) を添加し 6 および 24 時間培養した。抽出した RNA から通常に従い cDNA を作製した後、各遺伝子のプライマーを用いて real-time PCR 法にて遺伝子発現レベルを解析した。

(3) 細胞免疫染色:

OBA-9 細胞に AGE (500 µg/ml) と PgLPS (1 µg/ml) を添加し、24 時間培養を行った。その後、細胞を固定し、抗 S100A8 抗体および抗 S100A9 抗体を用いて免疫染色を行った。

(4) ELISA 法:

OBA-9 細胞に AGE (500 µg/ml) と S100A8 (1 µg/ml) を添加し 24 時間培養した。培養上清中の IL-6、CCL2 および血清アミロイド A2 (SAA2) の蛋白量を各 ELSIA キットにて測定した。

(5) 活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) 産生量の測定:

OBA-9 細胞に AGE (500 µg/ml) と S100A8 (1 µg/ml) を添加し 6 および 24 時間培養した。培養後、OxiSelect Intracellular ROS Assay Kit を用いて ROS 産生量の測定を行った。

4. 研究成果

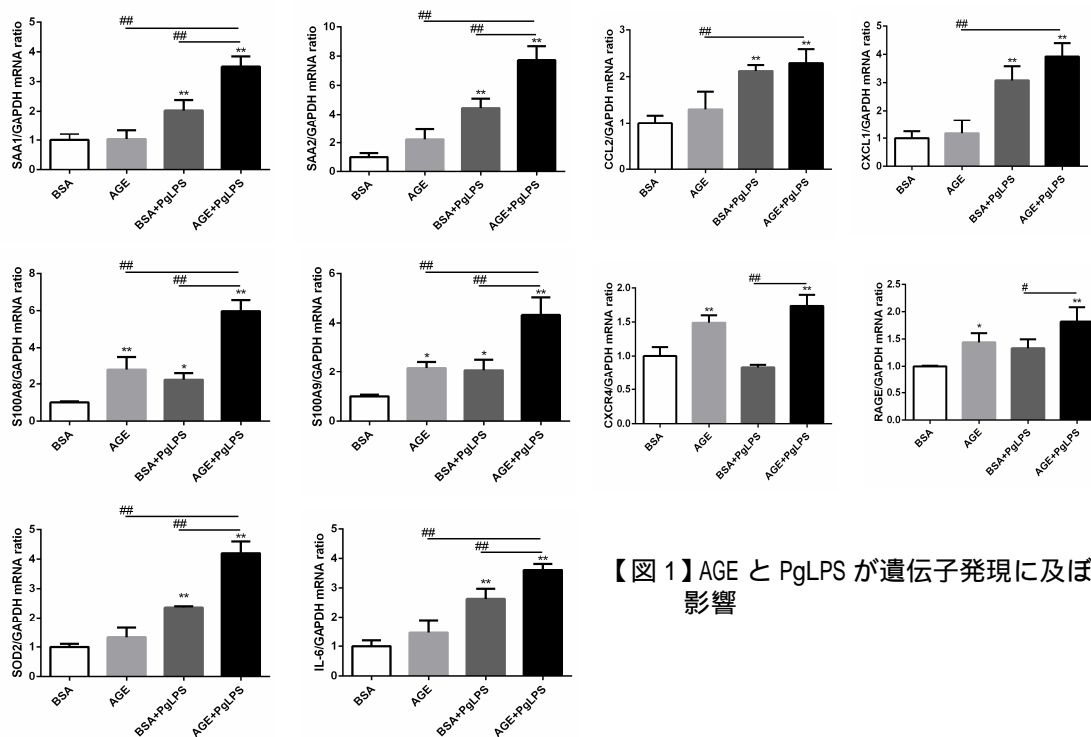
(1) ヒト歯肉上皮細胞における AGE および PgLPS による遺伝子発現変化

DNA マイクロアレイ解析の結果、BSA と比較して AGE により 1.6 倍以上発現が増加した遺伝子は 5 遺伝子で、S100A8、CXCR4、SAA2 など炎症関連因子の増加が認められた。一方、1.6 倍以上減少したものは 29 遺伝子であった。

AGE と PgLPS の共存下では、IL-6、CCL2、SAA1、SAA2、S100A8、S100A9 などの遺伝子におい

て2倍以上の増加が認められた。1.6倍以上発現が増加した遺伝子は上記遺伝子も含めて28遺伝子であった。一方、1.6倍以上減少したものは6遺伝子であった。多くの遺伝子において、AGEとPgLPSの共存下ではAGEおよびPgLPS単独よりも遺伝子の発現がさらに増強していることが明らかとなった。

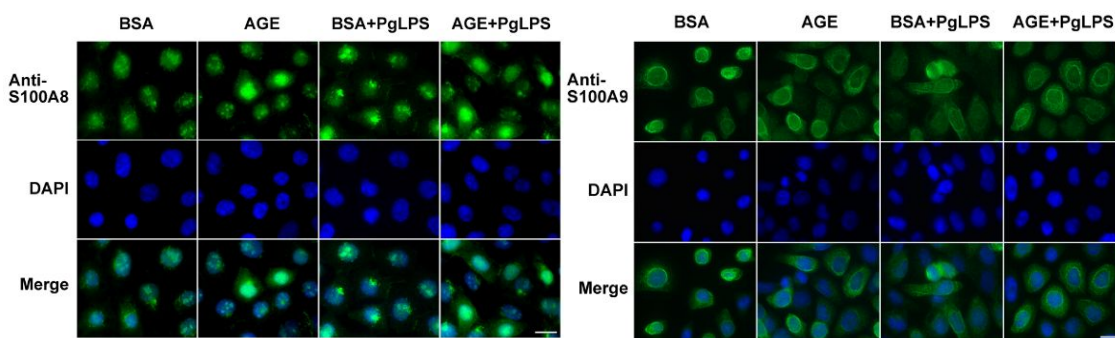
マイクロアレイ解析で変動のあった炎症関連因子についてreal-time PCR法で確認した結果、ほぼ同じ変動を示した。とくに血清アミロイドタンパク(SAA1とSAA2)やS100カルシウム結合タンパク(S100A8とS100A9)はAGEとPgLPSの共存下で、それぞれ単独より遺伝子の発現が増強していることが確認された。IL-6、CCL2およびCXCL1遺伝子発現については、AGEとPgLPSの共存下の変動はPgLPSによる変動とほとんど変化がなかった。CXCR4およびAGEのレセプターRAGEはAGEでのみ変化を示した(図1)。



【図1】AGEとPgLPSが遺伝子発現に及ぼす影響

(2) ヒト歯肉上皮細胞におけるS100A8およびS100A9タンパクの局在

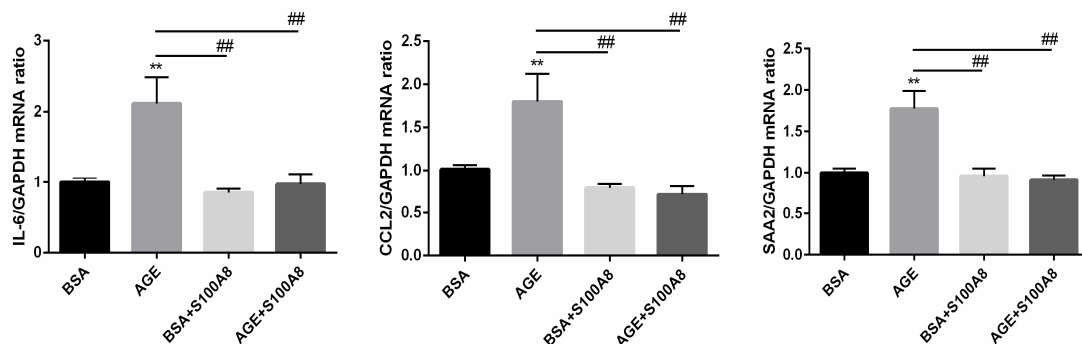
OBA-9細胞においてBSA添加時、S100A8は細胞核に局在しており、AGEおよびPgLPSの共存下では細胞核と細胞質にも局在することが観察された。一方、S100A9は細胞質に局在しており、AGEおよびPgLPSの添加による局在の変化は観察されなかった(図2)。



【図2】ヒト歯肉上皮細胞におけるS100A8およびS100A9タンパクの局在

(3) ヒト歯肉上皮細胞におけるAGEおよびS100A8による遺伝子発現変化

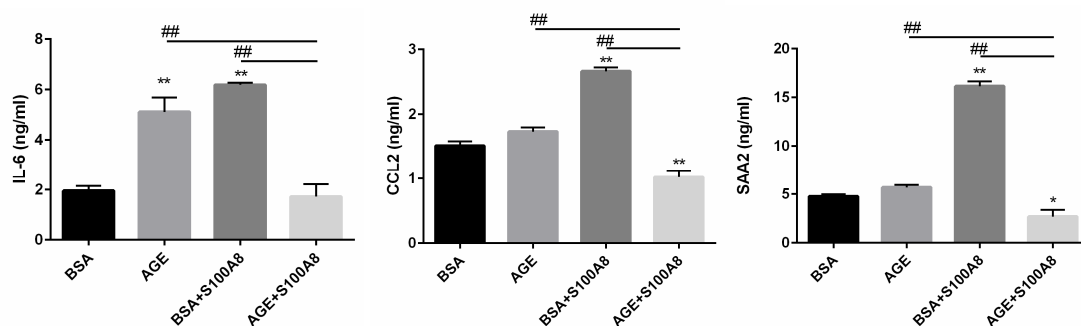
ヒト歯肉上皮細胞にAGEおよびS100A8を添加6時間後のIL-6、CCL-2およびSAA2など炎症関連因子の遺伝子発現をreal-time PCR法で調べた結果、AGEでコントロールと比較して約2倍発現増加した上記因子が、AGEとS100A8の共存下ではコントロールと同レベルまで発現が減少することが認められた(図3)。



【図3】AGE と S100A8 が遺伝子発現に及ぼす影響

(4) ヒト歯肉上皮細胞における AGE および S100A8 によるタンパク発現変化

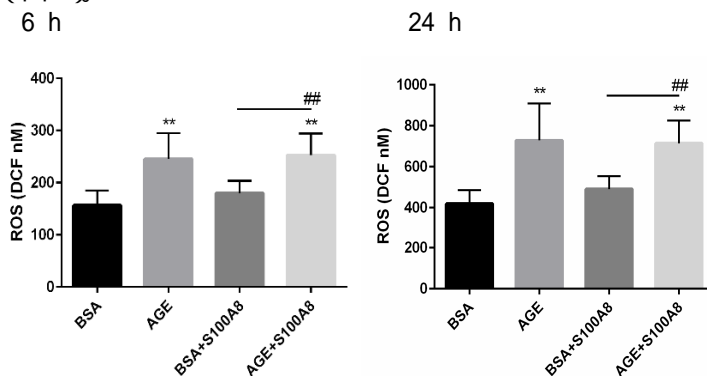
ヒト歯肉上皮細胞に AGE および S100A8 を添加 24 時間後の細胞上清中における IL-6、CCL-2 および SAA2 のタンパク発現を ELISA 法で調べた結果、遺伝子発現と同様に AGE と S100A8 の共存下で AGE 単独よりも減少することが認められた。しかしながら、24 時間培養では S100A8 単独添加が AGE 添加以上に IL-6、CCL-2 および SAA2 のタンパク量を上昇させた (図 4)。



【図4】AGE と S100A8 がタンパク発現に及ぼす影響

(5) ヒト歯肉上皮細胞における AGE および S100A8 による ROS 産生量の変化

ヒト歯肉上皮細胞に AGE および S100A8 を添加 6 および 24 時間後、細胞内の ROS 産生量を測定した結果、AGE 添加群ではコントロールと比較して ROS レベルは増加した。一方で、AGE と S100A8 の共存下における ROS 産生量は AGE と比較して変化がないことから、ヒト歯肉上皮細胞において、S100A8 は細胞内 ROS レベルを抑制せず、抗酸化作用を示さないことが明らかとなった (図 5)。



【図5】AGE と S100A8 が ROS 産生に及ぼす影響

< 結論と考察 >

本研究から、AGE や PgLPS はヒト歯肉上皮細胞において炎症関連因子や S100A8 を含む自然免疫関連因子を誘導し、糖尿病関連歯周炎の病態や生体防御反応に影響を与える可能性が示唆された。また AGE で発現が誘導された S100A8 は IL-6、CCL2 および SAA2 など炎症関連因子を抑制することから、S100A8 の持つ抗炎症作用が歯周組織における炎症の増悪を抑制し、生体恒常性を維持している可能性が考えられる。さらにヒト歯肉上皮細胞における S100A8 の詳細な役割を解明することにより、糖尿病関連歯周炎に対する歯周治療における新たなターゲット因子になるとと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hiroshima Yuka, Sakamoto Eijiro, Yoshida Kaya, Abe Kaori, Naruishi Koji, Yamamoto Takenori, Shinohara Yasuo, Kido Jun-ichi, Geczy Carolyn L.	4. 巻 119
2. 論文標題 Advanced glycation end-products and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide increase calprotectin expression in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1591-1603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.26319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hiroshima Yuka, Yamamoto Takenori, Watanabe Masahiro, Baba Yoshinobu, Shinohara Yasuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism Reports	6. 最初と最後の頁 36～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgmr.2018.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takagi Ryosuke, Sakamoto Eijiro, Kido Jun-ichi, Inagaki Yuji, Hiroshima Yuka, Naruishi Koji, Yumoto Hiromichi	4. 巻 2020
2. 論文標題 S100A9 Increases IL-6 and RANKL Expressions through MAPKs and STAT3 Signaling Pathways in Osteocyte-Like Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1～12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/7149408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kido Rie, Hiroshima Yuka, Kido Jun-ichi, Ikuta Takahisa, Sakamoto Eijiro, Inagaki Yuji, Naruishi Koji, Yumoto Hiromichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Advanced glycation end products increase lipocalin 2 expression in human oral epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣島 佑香, 山本 武範, 篠原 康雄
2. 発表標題 最終糖化産物とPorphyromonas gingivalis由来LPSが誘導するヒト歯肉上皮細胞の遺伝子発現の解析
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木 亮輔, 坂本 英次郎, 稲垣 裕司, 廣島 佑香, 成石 浩司, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 カルプロテクチンはマウス骨細胞の炎症および骨代謝関連因子の発現を制御する
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣島 佑香
2. 発表標題 生体抗菌ペプチドの動態と歯周病予防への応用の可能性
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木戸 理恵, 廣島 佑香, 生田 貴久, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 尾崎 和美, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 最終糖化産物はヒト口腔上皮細胞のリポカカン2発現を増加する
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣島 佑香, 木戸 淳一, 木戸 理恵, 吉田 賀弥, 稲垣 裕司, 成石 浩司, 湯本 浩通
2. 発表標題 オーラルケアへの応用を目指した抗菌ペプチド合成とリボソーム封入
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----