

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09874

研究課題名（和文）スクレロスチンを新規標的マーカーとした糖尿病関連歯周炎の非侵襲的診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a non-invasive diagnostic method for diabetes-related periodontitis using sclerostin as a novel target bio-marker

研究代表者

稲垣 裕司（INAGAKI, Yuji）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：50380019

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）：本研究は、患者から非侵襲的に採取できる歯肉溝滲出液中のバイオマーカーとしてスクレロスチン（SOST）に着目し、歯周炎や糖尿病の臨床的重症度との関連性を調べた。それに加えてAGEs量や歯周病原細菌量との相関関係も解析した。その結果、糖尿病関連歯周炎患者、非糖尿病歯周炎患者および対照健康者の3群間でSOST量に有意な差は得られなかった。またAGEsとSOSTの間、SOSTとPISAの間に相関関係は得られなかった。

以上のことから、SOSTのみを用いて糖尿病関連歯周炎を診断するのは困難と判断された。SOST量と年齢に相関関係があったことから、糖尿病や歯周炎以外の因子の影響を受けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は糖尿病関連歯周炎の新規バイオマーカーとしてSOSTに着目し、患者の歯肉溝滲出液のSOST量を測定した。そして糖尿病合併症の原因の1つである最終糖化産物やP. gingivalis等の歯周病原細菌を測定して、SOSTとこれらの数値、SOSTと歯周病や糖尿病の重症度との関連性を解析した。本研究では、糖尿病関連歯周炎の重症度のクラス分けや進行予測を行う際に、歯周炎局所のSOSTのみを用いて糖尿病関連歯周炎を診断するのは困難と判断された。症例数をさらに増やして解析することが求められるとともに、糖尿病関連歯周炎患者のバイオマーカーとしてSOST以外の別の物質を探索する必要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This research focused on sclerostin (SOST) as a biomarker in gingival crevicular fluid that can be collected non-invasively from patients, and investigated its association with the clinical severities of periodontitis and diabetes. In addition, the correlations between levels of SOST and of AGEs, and between levels of SOST and of periodontal pathogenic bacteria were also analyzed. As a result, no significant differences in SOST levels were found among the three groups of patients with diabetes-related periodontitis, patients with non-diabetic periodontitis, and healthy controls. Furthermore, no correlation was found between levels of AGEs and of SOST, or between levels of SOST and PISA. These results show that it is difficult to diagnose diabetes-related periodontitis using SOST alone. The correlation between level of SOST and age suggests that the level of SOST in GCF is influenced by factors other than severities of diabetes and periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病関連歯周炎 スクレロスチン 歯肉溝滲出液 AGEs

## 1. 研究開始当初の背景

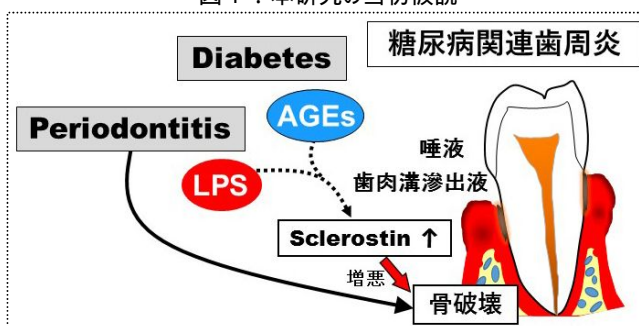
歯周病は糖尿病の第6の合併症と言われている。実際、糖尿病患者の歯周病発症率は高く、その病態も重篤である。糖尿病では慢性的な高血糖状態から、グルコースなどの還元糖と蛋白質との間の非酵素的糖化反応の後期段階で生成する**最終糖化産物(AGEs)**が生体内に蓄積することが明らかになっており、糖尿病の3大合併症である網膜症、腎症、神経障害の原因の一つとして注目されている。一方、糖尿病患者の骨質はコラーゲン架橋にAGEsが介在することで脆弱になることが知られており、糖尿病関連歯周炎では重篤な歯槽骨吸収が頻繁に認められる。しかし糖尿病関連歯周炎の病態については未だ不明な点が多く、特にAGEsが歯周炎局所の骨代謝に与える影響について詳細に調べた研究は少ない。

**スクレロスチン(Sclerostin: SOST)**は骨細胞(Osteocyte)から特異的に産生され骨形成を抑制する分泌タンパク質で、加齢や糖尿病によって血中SOST濃度が有意に上昇し、骨の脆弱化に関与する。近年、「糖尿病モデルラットに歯周炎を惹起させるとSOST陽性骨細胞が増加し維持される」ことが報告された(J Periodontol. 2015;86, 1005-1011.)。一方、臨床的には「慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液中のSOST濃度が健常者と比較して有意に高い」ことが報告されている(J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2018;44, 289-292.)。SOSTは糖尿病で発現が著明に増加する骨代謝マーカーとして知られているにもかかわらず、糖尿病を併発した歯周病患者(=糖尿病関連歯周炎患者)の歯肉溝滲出液(GCF)や唾液中のSOSTを定量し、健常者との比較を行った報告は存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究は、「**糖尿病関連歯周炎患者の新たなリスクバイオマーカーを探索し、診断基準値を設定すること**」を目的として、**糖尿病関連歯周炎患者の早期発見と重症化予防につなげる臨床研究を行うことである**。従来、臨床現場における糖尿病関連歯周炎患者の診断は「血糖値、HbA1cなどの血液中の糖尿病検査項目」と「歯周組織検査や歯槽骨レベル」を組み合わせ総的に診断していた。また、研究レベルにおいても「糖尿病由来のバイオマーカー(RAGEなど)」と「炎症性バイオマーカー(炎症性サイトカインなど)」を組み合わせ評価していた。すなわち糖尿病と歯周炎に共通するリスク因子の報告はなく、現在、糖尿病関連歯周炎を診断するには複数の項目を調べる必要がある。従って、一般の歯科医院で糖尿病関連歯周炎を評価するには費用面で困難かつ時間的労力も費やす。本研究は糖尿病関連歯周炎患者から非侵襲的に採取できる唾液やGCF中のバイオマーカーとして**SOSTに着目し、歯周炎・糖尿病の臨床的重症度との相関を調べ、それに加えてAGEs量との相関も解析する(図1)**。そして糖尿病関連歯周炎の診断マーカーにSOSTを用いることが、本研究の目的である。

図1. 本研究の当初仮説



## 3. 研究の方法

### (1) 被験者のエントリーと群分け

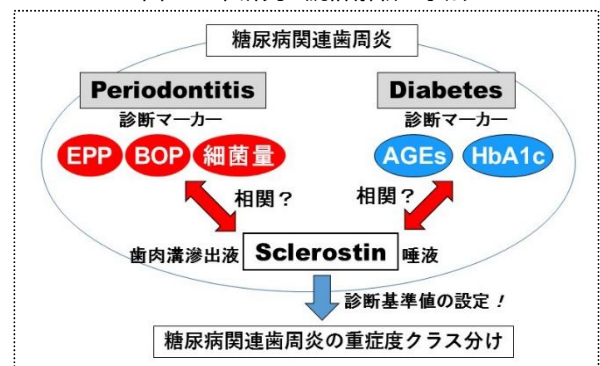
本研究を実施するに際し、被験者の口腔内からサンプル(GCF)を採取してバイオマーカーを測定するために当大学の臨床研究倫理審査委員会に申請を行い、その承認を得た。また糖尿病の診査に必要な機器(AGEsセンサーや簡易型の血糖値/HbA1c測定器)を準備した。

徳島大学病院歯科・歯周病科に来院する糖尿病関連歯周炎患者、非糖尿病歯周炎患者（重度および中等度歯周炎）および対照健常者（軽度歯周炎および健常者）を被験者とし、HbA1cとPISAを基に群分けした。なお残存歯が10歯未満の患者、糖尿病の状態が不明である患者、重度の全身疾患を有する患者、研究責任者または研究者が不適と判断した患者は除外した。同意書を取得した44名の被験者から現病歴、既往歴（糖尿病歴）を聴取した後、チェアサイドでAGEs センサ（エア・ウォーター・バイオデザイン RQ-1201J-SET）を用いて皮膚蓄積 AGEs の測定を行った。

## （２）口腔内からの試料採取とバイオマーカーの測定

歯周組織検査にて被験者の歯周ポケット深さ（PPD）、歯肉出血（BOP）および歯肉炎指数（GI）などの歯周病の臨床指標を調べた後、GCFをペーパーストリップ法にて非侵襲的に採取した。そして採取したGCF中のバイオマーカーを氷冷下通法に従い抽出し、ELISA法により測定した。また最深の歯周ポケットにペーパーポイントを挿入して口腔内細菌を採取し、*P. gingivalis*を簡易PCR法にて定量した。歯周病の重症度は歯周組織検査から算出したPISAの値を基準として分類した。ELISA法によるSOSTの解析にはR&D社とAbcam社の2種類の分析試薬（キット）を用いた。また炎症のマーカーとしてカルプロテクチン（CPT）を、Hycult社製のELISAキットを用いて測定した。

図2．本研究の統計解析の手法



## （３）スクロスチン量と歯周病・糖尿病の相関関係について統計解析

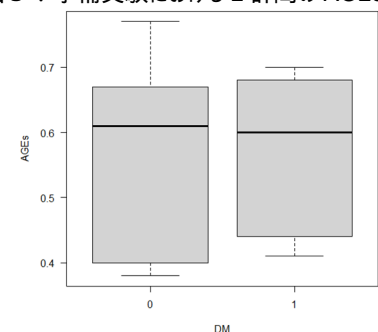
SOSTの測定値と、歯周病や糖尿病との相関係数を統計学的手法により算出した（図2）。検定は各群の正規性と分散を調べた後、ノンパラメトリック検定にて行った。

## 4．研究成果

### （１）SOST ELISA キットと皮膚蓄積 AGEs の信頼性の検証

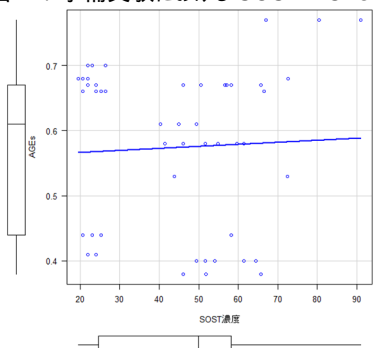
GCF中のSOSTの測定には、R&D社とAbcam社の2種類のELISAキットを用いたが、R&D社のキットでは検出できなかったためAbcam社のキットを用いることとした。先ず予備実験としてチェアサイドで最終糖化産物を測定するAGEsセンサ（エア・ウォーター・バイオデザインRQ-1201J-SET）の信頼性、すなわち皮膚蓄積AGEs量の信頼性を検証した。糖尿病罹患者4名、糖尿病非罹患者5名から合計54カ所のGCFの採取と皮膚蓄積AGEsの測定を行った。そしてGCFに含まれるSOST濃度をAbcam社のキットにより測定した。その結果、糖尿病罹患者(0)と糖尿病非罹患者(1)との間にAGEsの数値に有意な差は得られなかった（図3； $P=0.314$ ）。

図3．予備実験における2群間のAGEsの比較



また皮膚蓄積AGEsとSOSTの間に相関関係は得られなかった（図4；Spearmanの順位相関係数0.0375， $P=0.788$ ）。そのため最終糖化産物の測定を市販のELISAキット（Cell Biolabs INC.）を用いて行うこととした。

図4．予備実験におけるSOST-AGEs相関関係



## (2) 糖尿病と AGEs、SOST および CPT の関連性

本実験には、予備実験 9 名を除く糖尿病関連歯周炎患者 8 名、非糖尿病歯周炎患者 16 名および対照健常者 11 名の 35 名 (35 部位) の GCF の採取、および HbA1c の測定と歯周病の診査に基づいた群分けを行った。そして GCF に含まれる AGEs、SOST および CPT 濃度をそれぞれ ELISA 法により測定した。

その結果、糖尿病罹患患者(0)と糖尿病非罹患患者(1)の 2 群間に HbA1c に有意な差が認められたが (図 5 ;  $P < 0.01$ )、2 群間で AGEs、SOST および CPT の濃度はともに有意な差は得られなかった (図 6 ~ 8 ;  $P = 0.658$ 、 $P = 0.67$  および  $P = 0.363$ )。

図 5 . 2 群間の HbA1c の比較

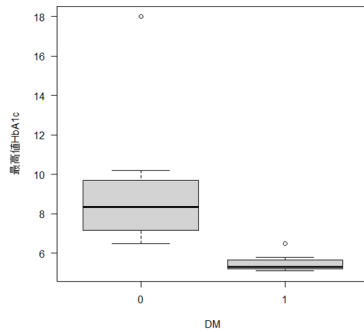


図 6 . 2 群間の AGEs の比較

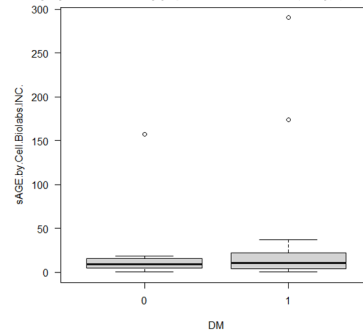


図 7 . 2 群間の SOST の比較

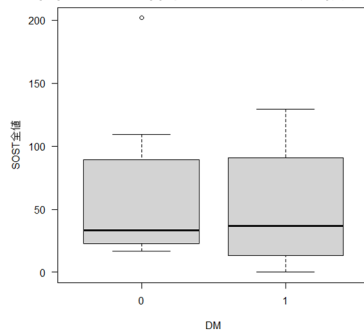
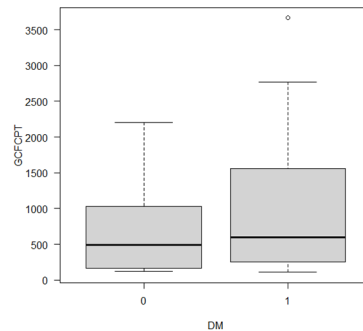


図 8 . 2 群間の CPT の比較



## (3) 糖尿病関連歯周炎と AGEs と SOST、CPT の関連性

次に糖尿病関連歯周炎患者(0)、非糖尿病歯周炎患者(1)および対照健常者(2)の 3 群間における AGEs、SOST および CPT の関係性を調べた。その結果、3 群間で HbA1c に有意な差が認められたが (図 9 ;  $P < 0.01$ )、AGEs、SOST および CPT の濃度はともに有意な差は得られなかった (図 10 ~ 12 ;  $P = 0.569$ 、 $P = 0.781$  および  $P = 0.586$ )。

図 9 . 3 群間の HbA1c の比較

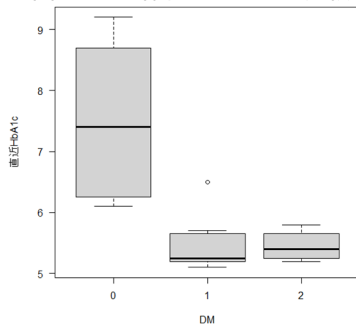


図 10 . 3 群間の AGEs の比較

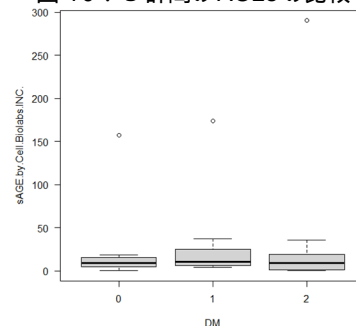
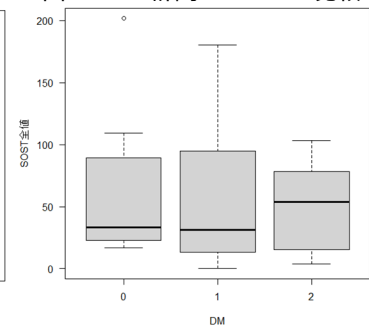


図 11 . 3 群間の SOST の比較



また本実験においてもAGEsとSOSTの間に相関関係は得られなかった（図 1 3 ; Spearmanの順位相関係数0.00855,  $P=0.961$ ）。さらにSOSTとPISA（歯周病の重症度）、およびSOSTと歯周ポケット深さの間にも相関関係は得られなかった（図 1 4 ; Spearmanの順位相関係数-0.0524,  $P=0.761$ 、図 1 5 ; Spearmanの順位相関係数-0.143,  $P=0.428$ ）。

図 12 . 3 群間の CPT の比較

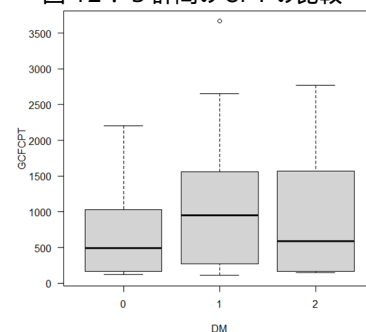


図 13 . SOST-AGEs 相関関係

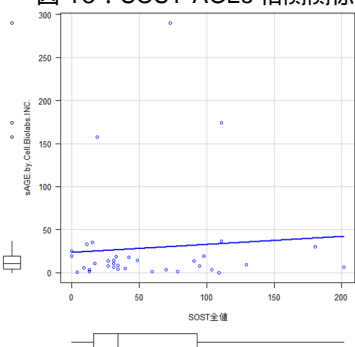


図 14 . SOST-PISA 相関関係

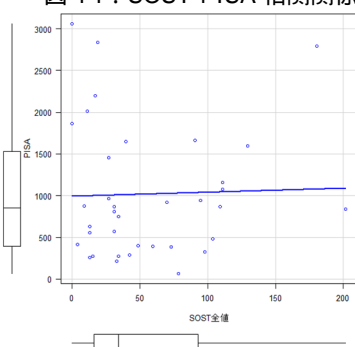
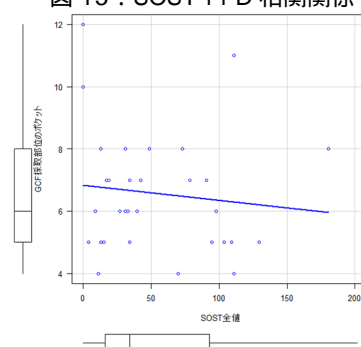


図 15 . SOST-PPD 相関関係



さらに SOST と CPT、および AGEs と CPT の間にも相関関係は得られなかった（図 1 6 ; Spearman の順位相関係数-0.171,  $P=0.325$ 、図 1 7 ; Spearman の順位相関係数 0.112,  $P=0.52$ ）。

図 16 . SOST-CPT 相関関係

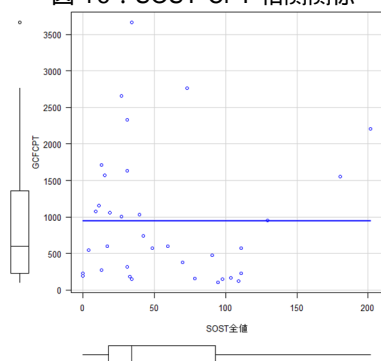
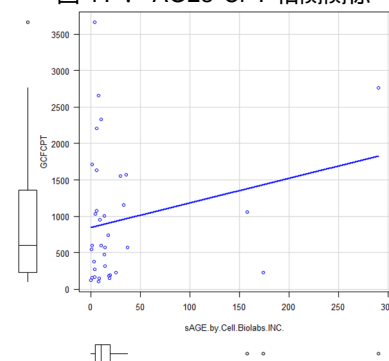


図 17 . AGEs-CPT 相関関係



#### （ 4 ）細菌（*P.g* 菌）と SOST の相関関係

歯周ポケット内の *P.g* 菌量と SOST の間に相関関係は得られなかった（Spearman の順位相関係数-0.028,  $P=0.873$ ）。同様に総細菌数と SOST の間にも有意な差は得られなかった（ $P=0.2184$ ）

#### （ 5 ）SOST を用いた糖尿病関連歯周炎の診断について本研究の結論

今回の研究ではHbA1cとPISAを基に群分けした糖尿病関連歯周炎患者、非糖尿病歯周炎患者および対照健常者の3群間でSOSTに有意な差は得られず（図 1 1 ）、またAGEsとSOSTの間（図 1 3 ）、SOSTとPISAの間（図 1 4 ）にも相関関係は得られなかったことから、SOSTのみを用いて糖尿病関連歯周炎を診断するのは困難と判断された。同様にCPTのみを用いて糖尿病関連歯周炎を診断するのも困難と判断された。SOSTの量に性差はなかったが（ $P=0.726$ ）、年齢と相関関係があったことから（Spearmanの順位相関係数0.352,  $P=0.0381$ ）、糖尿病や歯周炎の重症度以外の因子の影響を受けることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 枘富健二, 板東 美香, 稲垣 裕司, 木戸 理恵, 植村 勇太, 畑田祐佳里, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 歯周病高齢患者のオーラルフレイルと口腔内バイオマーカーとの関連
3. 学会等名 第66回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 板東 美香, 枘富健二, 稲垣 裕司, 木戸 理恵, 植村 勇太, 畑田祐佳里, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 糖尿病関連歯周炎高齢者患者のオーラルフレイルリスクバイオマーカーの探索
3. 学会等名 四国歯学会第62回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 枘富 健二, 板東 美香, 稲垣 裕司, 木戸 理恵, 植村 勇太, 畑田 祐佳里, 木戸 淳一, 湯本 浩通
2. 発表標題 糖尿病関連歯周炎高齢患者のオーラルフレイルリスクバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	木戸 淳一  (KIDO Jun-ichi)  (10195315)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授   (16101)	削除: 2023年3月24日

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	板東 美香  (BANDO Mika)  (10510000)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教    (16101)	
研究分担者	生田 貴久  (IKUTA Takahisa)  (00746563)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教    (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関