

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463222

研究課題名(和文) 高血糖は歯周病菌由来 lipopolysaccharide の動脈硬化作用を増強するか

研究課題名(英文) Augmentative effect of high glucose on atherosclerosis due to periodontal bacteria-derived lipopolysaccharide

研究代表者

園木 一男 (Sonoki, Kazuo)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：50316155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000 円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化に対する糖尿病と歯周病の相乗効果を検討するため、高濃度 glucose (10mM、20mM) 下で lipopolysaccharide (LPS) 0.1 µg/ml を培養血管内皮細胞に投与した所、動脈硬化促進因子である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の mRNA 発現が、glucose 濃度 5.5mM 時より有意に増強した。培養液中の MCP-1 蛋白も有意に増加した。これに対しビタミン C 100 µM は MCP-1 mRNA 発現の増強を抑制した。以上より、高濃度 glucose は LPS の MCP-1 発現を酸化ストレスを介して増強することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the synergetic effect of diabetes mellitus and periodontal disease on atherosclerosis, vascular endothelial cells were incubated with high glucose and lipopolysaccharide (LPS). The atherogenic factor, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression was enhanced with high glucose and LPS than with normal glucose and LPS. In addition, when vitamin C was preincubated before administration of high glucose and LPS, it suppressed the enhancement of MCP-1 expression due to high glucose and LPS. Therefore, it was suggested that high glucose enhanced the MCP-1 expression by LPS through the oxidative stress.

研究分野：糖尿病

キーワード：動脈硬化 糖尿病 歯周病 lipopolysaccharide MCP-1

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、心筋梗塞などの心血管疾患の原因は動脈硬化である。高血圧、糖尿病、高脂血症、喫煙などにより内皮細胞傷害が起きると内皮下に単球由来マクロファージが侵入し、酸化 LDL などの各種変性脂質を貪食して泡沫化し、動脈硬化の初期病変である fatty streak が形成される。従って動脈硬化の発症過程においては、引き金として内皮細胞傷害が重要であるが、最近、歯周病も歯周病患者の内皮細胞障害を引き起こしていることが報告されている (Higashi Y, et al., Hypertension, 2008)。内皮細胞障害によって産生される単球走化性因子 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) は、単球の内皮細胞への接着、内皮下への侵入、集簇を促進することにより、マクロファージの泡沫化を促進して動脈硬化を発症・進展させる。糖尿病による高血糖は MCP-1 の発現を増強するため、動脈硬化が促進することが知られている (Piemonti L, et al., Diabetes Care, 2003)。一方、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来の lipopolysaccharide (LPS) も MCP-1 を発現させることが報告されている (Kocgozlu L, et al., J Dent Res, 2009)。しかしながら、高血糖が LPS による MCP-1 発現に影響するのかは検討されていない。

2. 研究の目的

培養血管内皮細胞である臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVEC) を用いて、高濃度のブドウ糖下 (10mM、20mM) で LPS を投与し、通常ブドウ糖濃度下 (5.5mM) で投与した場合と比べ MCP-1 の発現 (MCP-1 mRNA、MCP-1 蛋白) が増強するのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) LPS 刺激による MCP-1 mRNA 発現の検討

LPS 濃度を 0.1、1.0、10 $\mu\text{g/ml}$ に変えて HUVEC に投与し、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間で培養後、HUVEC より total RNA を抽出。その後、リアルタイム PCR で MCP-1 mRNA 発現量を測定する。なお、この際の培養液中の glucose 濃度は 5.5mM である。

(2) ブドウ糖による MCP-1 mRNA 発現の検討

培養液中の glucose 濃度を通常の 5.5mM から高濃度の 10mM、20mM に変え、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間培養し、MCP-1 mRNA の発現量を測定する。

(3) 高濃度 glucose 下 LPS 刺激による MCP-1 mRNA 発現の検討

培養液中の glucose 濃度を 5.5mM、10mM、20mM に変え、LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を投与。2 時間、4 時間、6 時間、12 時間培養し、MCP-1 mRNA 発現量を測定する。

(4) 高濃度 glucose 下 LPS 刺激による MCP-1 蛋白発現の検討

培養液中の glucose 濃度を 5.5mM、10mM、20mM に変え、LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を投与。2 時間、6 時間、12 時間、24 時間培養し、培養液を回収。ELISA 法 (R&D Systems 社製 ELISA キット) にて培養液中の MCP-1 蛋白を測定する。

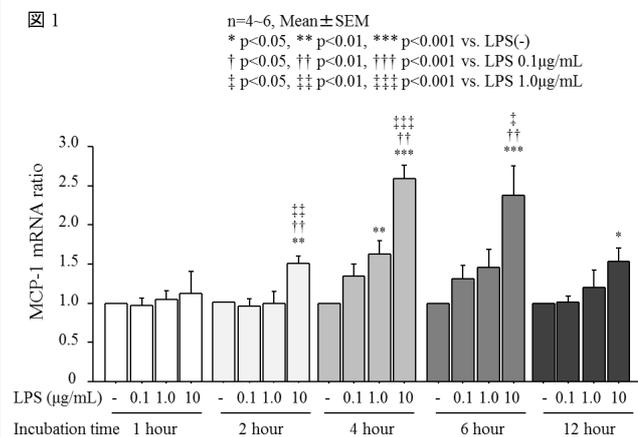
(5) ビタミン C または E による MCP-1 mRNA 発現の抑制の検討

glucose 20mM 下で LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ を投与する 1 時間前にビタミン C 100 μM またはビタミン E 50 μM を添加し、glucose 20mM 下 LPS 0.1 $\mu\text{g/ml}$ で HUVEC を 2 時間刺激。total RNA を抽出し、MCP-1 mRNA 発現量を測定する。

4. 研究成果

(1) LPS 刺激による MCP-1 mRNA の発現増強

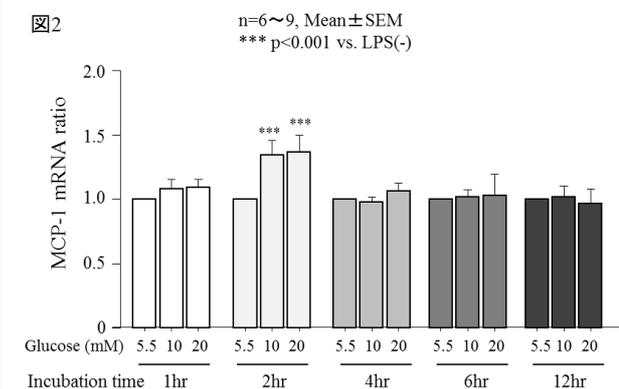
図 1 に LPS 刺激による MCP-1 mRNA の発現量を示す。



2 時間培養では LPS 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ で無刺激の HUVEC より有意に MCP-1 mRNA の発現が増強した。4 時間では LPS 濃度依存性に MCP-1 mRNA の発現増強がみられた。6 時間、12 時間では LPS 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ で MCP-1 mRNA 発現増強がみられた。

(2) glucose による MCP-1 mRNA の発現増強

図 2 に glucose による MCP-1 mRNA 発現量を示す。



高濃度 glucose 10mM、20mM で 2 時間培養した場合のみ glucose 5.5mM より MCP-1 mRNA の発現が増強した。

(3)高濃度 glucose 下 LPS 刺激による MCP-1 mRNA の発現増強

図 3 に glucose 濃度を 5.5mM、10m、20mM に変え HUVEC を LPS 0.1 μg/ml で刺激したときの MCP-1 mRNA の発現量を示す。

glucose 濃度 5.5mM 下では LPS を投与し、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間培養しても無刺激に比し MCP-1 mRNA 発現は変わらないが、glucose 濃度を 10mM、20mM にすると MCP-1 mRNA 発現は無刺激より有意に増加した。また、特に 20mM では 5.5mM で LPS 投与した場合よりも有意に MCP-1 mRNA 発現が増加した。

(4)高濃度 glucose 下 LPS 刺激による MCP-1 蛋白の発現増強

図 4 に glucose 濃度を 5.5mM、10mM、20mM に変え HUVEC を LPS 0.1 μg/ml で刺激したときの MCP-1 蛋白の発現量を示す。

高濃度 glucose 下で LPS を投与し、6 時間、12 時間、24 時間培養すると無刺激の HUVEC より培養液中の MCP-1 蛋白量が増加した。特に 12 時間培養では glucose 濃度 5.5mM 下で LPS 刺激した場合より有意に増加した。

(5)ビタミン C と E 投与による MCP-1 mRNA 発現の抑制

図 5 に glucose 20mM 下で LPS 0.1 μg/ml を投与する 1 時間前にビタミン C 100 μM またはビタミン E 50 μM を添加し、2 時間培養した場合の MCP-1 mRNA 発現量を示す。

ビタミン C 100 μM で glucose 20mM 下 LPS 刺激による MCP-1 mRNA の発現増強に対する抑制効果がみられた。ビタミン E 50 μM ではみられなかった。

(6)考察

血管内皮細胞に対する LPS と高濃度 glucose はそれぞれ単独で MCP-1 mRNA の発現を増強させるが、この際 LPS では 1.0 μg/ml 以上の濃度が必要であり、一方、高濃度 glucose では 2 時間培養でのみ MCP-1 mRNA の発現増強がみられた。これに対し高濃度 glucose 下であれば LPS は 0.1 μg/ml という MCP-1 mRNA 発現を増強しない濃度であっても MCP-1 mRNA 発現が増強し、この増強効果は 2 時間から 12 時間までみられた。また、培養液中で測定した MCP-1 蛋白も増加した。

その機序を解明するため、抗酸化剤であるビタミン C と E を使って高濃度 glucose による LPS の MCP-1 mRNA 発現増強を抑制するのか検討した所、ビタミン C で抑制効果がみられた。このことは高濃度 glucose による LPS の MCP-1 mRNA 発現増強は酸化ストレスを介していることを示唆するものと考えられる。

今後はこれらの機序を解明するため LPS による MCP-1 の転写因子および細胞内シグナル伝達が高濃度 glucose でどう変化するのか検討する必要がある。それにより糖尿病患者が歯周病を合併した場合、進展する動脈硬化を予防する方策を見つけることが可能となる。

図3

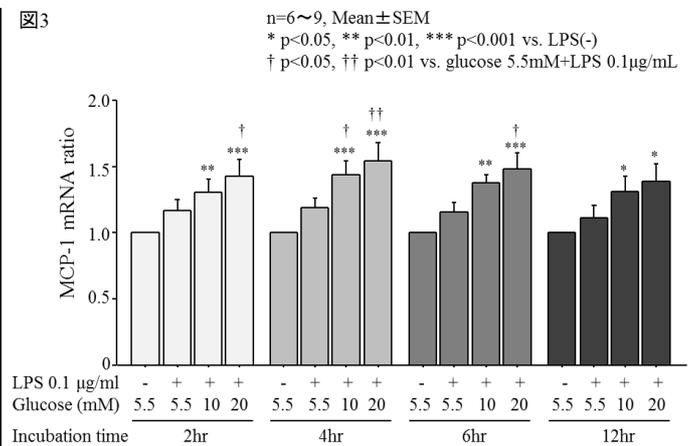


図4

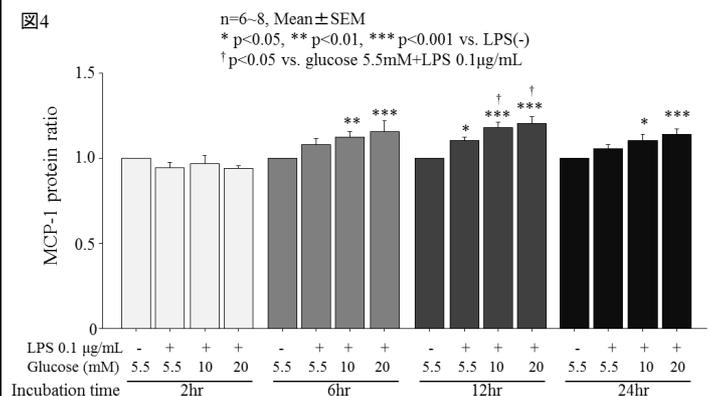
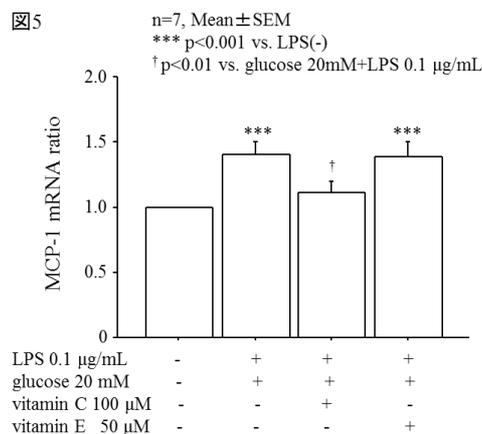


図5



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 0 件)

(学会発表)(計 2 件)

園木一男、坂室 直子、森山 美彩、村岡 宏祐、辻澤 利行、井上 博雅、引地 尚子 : 高濃度 glucose 下 LPS 刺激による培養血管内皮細胞の MCP-1 発現とビタミン C および E による抑制 . 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 27 年 5 月 21 日、下関市

園木一男、田上綾香、村岡宏祐、辻澤利行、井上博雅、引地尚子 : 高血糖は培養血管内皮細胞における歯周病細菌由来 LPS の単球走化性因子 MCP-1 発現を増強した . 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 26 年 5 月 24 日、大阪市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

園木 一男 (SONOKI, Kazuo)
九州歯科大学歯学部・准教授
研究者番号：50316155

(2)研究分担者

井上 博雅 (INOUE, Hiromasa)
九州歯科大学歯学部・教授
研究者番号：
20137326

引地 尚子 (HIKITI, Hisako)
九州歯科大学歯学部・教授
研究者番号：50292876

辻澤 利行 (TSUJISAWA, Toshiyuki)
九州歯科大学歯学部口腔保健学科・准教授
研究者番号：60265006

村岡 宏祐 (MURAOKA, Kousuke)
九州歯科大学歯学部・助教
研究者番号：80382422