

令和元年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11391

研究課題名(和文) 最終糖化産物とインフラマソームの関連から探る糖尿病関連歯周炎の病態

研究課題名(英文) Effect of advanced glycation end-products and inflammasome for pathogenesis of Diabetes mellitus-associated periodontitis

研究代表者

板東 美香 (BANDO, Mika)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：10510000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、糖尿病合併症の原因因子の1つである最終糖化産物(AGEs)がヒト歯肉線維芽細胞において、AGEsの受容体やMAPK、NF- κ Bのシグナル活性化を介して、炎症関連因子(IL-6とICAM-1)を増加させることを明らかにした。また炎症・免疫反応に関与する単球の歯肉線維芽細胞への接着を増強した。AGEsはIL-6を増加させることによってICAM-1を増加させ、歯周組織局所に炎症性細胞を補充することで、炎症を悪化させ、糖尿病関連歯周炎の病態に影響を与えていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は糖尿病の第6の合併症と言われており、糖尿病患者での歯周病の発症率は高く、その病態も非糖尿病患者と比べて重篤である。しかしながら糖尿病関連歯周炎の病態は不明な点が多い。本研究により、糖尿病合併症の原因の1つである最終糖化産物(AGEs)による歯肉線維芽細胞における炎症の増悪化機序の一端を解明できた。今後、AGEsによる炎症反応の抑制方法および機序を探索することによって、将来的に新しい糖尿病関連歯周炎の診断・治療・予防法の開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：In the present study, AGEs cause diabetes mellitus(DM) complications increased inflammation-related factors (IL-6 and ICAM-1) via the receptor for AGE(RAGE), MAPKs and NF- κ B pathway in human gingival fibroblasts. Furthermore, AGEs promoted the adhesion of monocytes to gingival fibroblasts. AGEs increase ICAM-1 expression by upregulation of IL-6 and may recruit inflammatory cells and exacerbate inflammation in periodontal tissue. These results suggest that AGEs aggravate inflammatory responses by upregulating IL-6 and ICAM-1 expression in gingival fibroblasts and influence the pathogenesis of DM-associated periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：糖尿病関連歯周炎 最終糖化産物 歯肉線維芽細胞 炎症関連因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は糖尿病の第6の合併症であると言われている。実際、糖尿病患者での歯周病の発症率は高く、その病態も非糖尿病患者と比べて重篤である。その理由として、微少循環障害による歯周組織の創傷治癒遅延や高血糖に伴うコラーゲン代謝機能の低下、歯根膜線維芽細胞の機能変化などが考えられているが、糖尿病関連歯周炎の病態については未だ不明な点が多い。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構造体である最終糖化産物 (Advanced glycation end-products: AGEs) が生体内に存在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。これらの疾患において AGEs は、活性酸素種(ROS)を誘導し酸化ストレス反応を亢進させることにより発症・進展に関与することが考えられている (*Biochim. Biophys. Acta*, 2011)。我々は、糖尿病関連歯周炎の歯肉溝滲出液からのバイオマーカーの探索を行い、糖尿病あるいは糖尿病関連歯周炎の患者において AGEs の前駆体であるグリコアルブミンが増加することを報告している (*J Periodontol*. 2014)。一方、インフラマソームはプロテアーゼの一種であるカスパーゼ-1 活性化をひき起こすタンパク質複合体の総称で、細菌などの病原体などの刺激により活性化され、IL- β , IL-18 分泌などを誘導する。インフラマソームにより誘導されたこれらの炎症誘導性サイトカインは ROS の産生、NF- κ B の活性化などを介し、他の免疫細胞の活性化や TNF- α , IL-6 などの炎症性サイトカインの誘導を促進することから、インフラマソームは酸化ストレスなどを介して様々な疾患の発症と進行に関与すると言われている (*PLOS ONE*. 2013)。近年、歯周組織においてもインフラマソームの中心的構成因子である NLRP3, ASC および caspase-1 が存在し、歯周炎患者の歯周組織においてインフラマソームの発現が増加することが報告された (*Clin Exp Immunol*. 2009)。しかしながら、糖尿病関連歯周炎におけるインフラマソームの機能についての報告はなく、最終糖化産物が歯周組織に及ぼす影響を調べた報告も少ない。

2. 研究の目的

本研究では歯周組織の細胞において、AGEs が単独あるいは P-LPS のような歯周病原因子やカルプロテクチン(S100A8/A9)のような炎症起因为質との複合作用により、インフラマソームを誘導し、酸化ストレスや NF- κ B 活性化などを介して炎症の増悪化に影響を与える可能性について検証を行い、糖尿病関連歯周炎の病態を詳細に調べ、その治療法としてインフラマソームを介する炎症増悪化を抑制する方法を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

《実験1》歯周組織における AGEs とインフラマソームの関連

(1) AGE の作製

AGE は Okamoto らの方法 (*FASEB J*. 2002) に従って作製した。すなわち、ウシ血清アルブミン (50 mg/ml) と D-グリセルアルデヒド (0.1 M) を 0.2 M のリン酸緩衝液に溶解し、37 °C で 7 日間反応後、4 °C の PBS 中で 3 日間透析を行い AGEs を作製した。作製した生理活性の評価は蛍光光度計を用いて測定した。

(2) AGEs、P-LPS、カルプロテクチンによる歯周組織の細胞でのインフラマソーム活性化への影響

インフラマソーム関連因子を発現する歯周組織細胞の探索

歯周組織細胞として単球 (THP-1)、歯肉上皮細胞 (Sa3)、口腔粘膜上皮細胞 (TR146)、歯肉線維芽細胞 (CRL2014) の各種細胞株を用いた。それぞれ confluent 状態の細胞が

ら RNA を抽出し、インフラマソーム関連因子の発現を確認するため IL-1 β , IL-18, NLRP3, caspase-1 のプライマーを数種設計し、アニーリング温度など条件を変えて RT-PCR を行った。

単球と歯肉線維芽細胞に AGEs(500 μ g/ml)を単独または、P-LPS(1 μ g/ml), カルプロテクチン(CPT:50 nM)を複合添加し、24h 後の RNA を抽出し IL-1 β , IL-18, NLRP3, caspase-1 の発現を RT-PCR にて確認した。

実験 2 歯肉線維芽細胞において AGEs が炎症関連因子の発現に及ぼす影響とその機序の解明

(1) AGEs による歯肉線維芽細胞への細胞障害性

CRL2014 を 4800 cells/cm² の密度で播種し 5 日間培養後、BSA あるいは AGEs をそれぞれ 500 μ g/ml 添加し 24, 48, 72, 96 h の細胞障害性を Cell Counting Kit-8(Dojindo)を用いて測定した。

(2) AGEs が炎症性関連因子の発現に及ぼす影響

5 日間培養した CRL2014 に BSA あるいは AGEs をそれぞれ 500 μ g/ml 添加し、24 h 培養後の cell lysate を回収し、RAGE 発現を RAGE 抗体(Cell Signaling)を用いた western blotting により調べた。さらに 48 h 後の上清および cell lysate を回収し、それぞれ IL-6 と ICAM-1 の発現を各 ELISA kit にて測定した。

(3) RAGE ノックダウンが AGEs 誘導性 IL-6 と ICAM-1 発現に及ぼす影響

CRL2014 を 9500 cells/cm² の密度で播種し 70%confluent の状態まで培養後、RAGE siRNA(Bioneer)と control siRNA(Sigma-Aldrich)を Lipofectamine RNA iMAX Reagent (Invitrogen)を用いて transfection した。24h 培養後に BSA あるいは AGEs をそれぞれ 500 μ g/ml 添加し、24h 培養後の RNA を抽出し RAGE のノックダウンを確認した。同条件で transfection し BSA・AGE 添加後 48h 培養した細胞から上清と lysate を回収し、IL-6 と ICAM-1 の発現を ELISA kit にて測定した。

(4) MAPK 阻害剤が AGEs 誘導性 IL-6 と ICAM-1 発現に及ぼす影響

CRL2014 を 4800 cells/cm² の密度で播種し 5 日間培養後、BSA あるいは AGEs をそれぞれ 500 μ g/ml 添加し 30 分後の cell lysate を回収し、MAPK のリン酸化を各種抗体(p-p38/p38, pERK/ERK, p-JNK/JNK: Cell Signaling)を用いて western blotting で調べた。また、同培養系の BSA・AGE 添加 2 h 前に MAPK 阻害剤(p38:SB203580, ERK:U0126, JNK:SP600125)を作用させてから 48h 培養後の細胞の上清と lysate を回収し、IL-6 と ICAM-1 の発現を ELISA kit にて測定した。

(5) NF κ B 阻害剤が AGEs 誘導性 IL-6 と ICAM-1 発現に及ぼす影響

CRL2014 を 4800 cells/cm² の密度で播種し 5 日間培養後、BSA あるいは AGEs をそれぞれ 500 μ g/ml 添加し 30 分後の cell lysate を回収し、p65 と I κ B α のリン酸化を各種抗体(p-p65/p65, p-I κ B α / I κ B α : Cell Signaling)を用いて western blotting で調べた。また、同培養系の BSA・AGE 添加 24 h 前に NF κ B 阻害剤(Bay11-7082: Selleckchem)を作用させてから 48h 培養後の細胞の上清と lysate を回収し、IL-6 と ICAM-1 の発現を ELISA kit にて測定した。

(6) IL-6 および IL-6 ノックダウンが AGEs 誘導性 ICAM-1 発現に及ぼす影響

CRL2014 を 4800 cells/cm² の密度で播種し 5 日間培養後、recombinant human IL-6 (rhIL-6; R&D)を添加し 24h 培養後の RNA と 48h 培養後の cell lysate を回収し、ICAM-1 の発現を RT-PCR と ELISA 法で確認した。IL-6 のノックダウンは (3) と同様の培養系

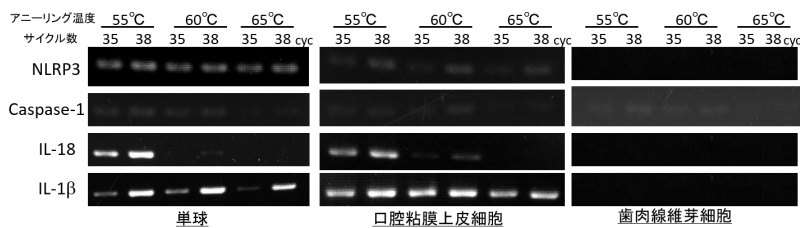
に siIL-6(Sigma)と control siRNA を transfection し、24h 培養後 BSA,AGE 添加、さらに 24h 後の RNA を抽出した。RT-PCR にて IL-6 と ICAM-1 の発現を確認した。

- (7) AGEs および IL-6 ノックダウンが歯肉線維芽細胞と単球との接着に及ぼす影響
 1.5x 10⁶ cells/cm²の密度で播種した THP-1 を、Fixable Live Cell Tracking Kit で標識し、AGE 添加あるいは IL-6 ノックダウンした CRL2014 の細胞系に 30 分共培養させる。未接着の細胞を除去し、蛍光顕微鏡で確認し蛍光強度測定を行った。

4. 研究成果

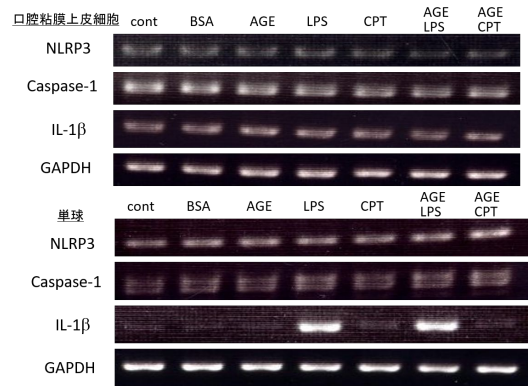
実験 1

- (1) 歯肉上皮細胞、口腔粘膜上皮細胞、単球ではインフラマソーム関連因子が発現するが、歯肉線維芽細胞ではほとんど発現が認められなかった(図1)。



【図1】 歯周組織細胞におけるインフラマソーム関連因子発現

- (2) 口腔粘膜上皮細胞では、AGEs および P-LPS で IL-1βの遺伝子発現がやや増加する傾向が認められたが反応は弱く、その他の遺伝子(NLRP3 と caspase-1)発現や CPT 刺激では変化が認められなかった。また単球では、P-LPS で IL-1β発現が著しく増加したが、NLRP3 と caspase-1 には変化が認められなかった。(図2)



【図2】 AGE、P-LPS、CPTがインフラマソーム関連遺伝子発現に及ぼす影響

実験 2

- (1) 歯肉線維芽細胞において、AGEs 刺激下 72 h 培養までは細胞障害性は認められなかった(図3)。

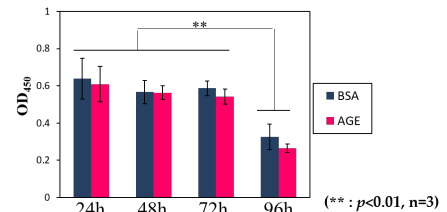


図3 歯肉線維芽細胞に対するAGEsの細胞障害性 (**: p<0.01, n=3)

- (2) 歯肉線維芽細胞において、AGEs が RAGE, IL-6, ICAM-1 の発現を有意に増加させた(図4)。
 (3) 歯肉線維芽細胞において、RAGE をノックダウンすると(図5A)、AGEs 誘導性の IL-6 と ICAM-1 の遺伝子発現が有意に抑制された(図5B,C)。

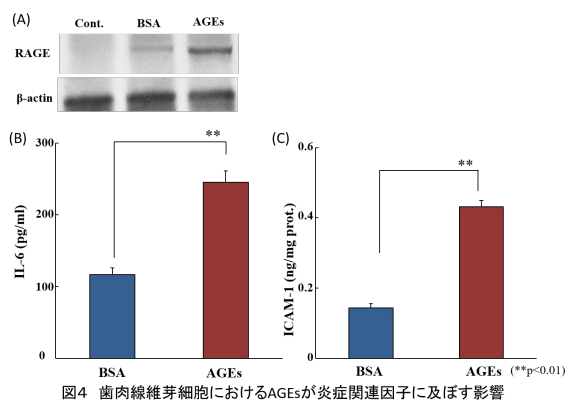


図4 歯肉線維芽細胞におけるAGEsが炎症関連因子に及ぼす影響

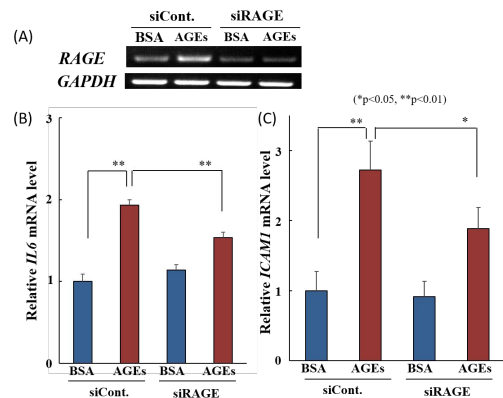


図5 歯肉線維芽細胞においてRAGEノックダウンがAGEs誘導性 IL-6,ICAM-1遺伝子発現に及ぼす影響

(4) AGEs により p38 と ERK のリン酸化の亢進が認められたが、JNK のリン酸化には変化が認められなかった (図 6 A)。さらに p38 阻害剤 (SB203580) と ERK 阻害剤 (U0126) で AGEs 誘導性の IL-6 と ICAM-1 の発現が有意に抑制された (図 6 B, C)。

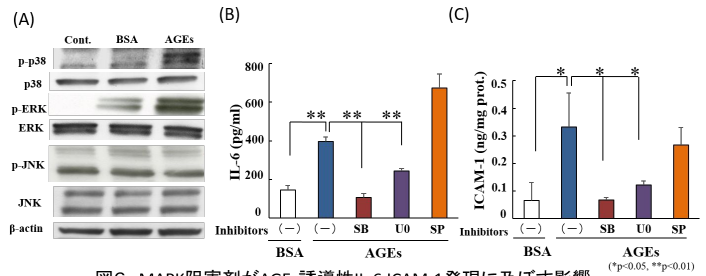


図6 MAPK阻害剤がAGEs誘導性IL-6,ICAM-1発現に及ぼす影響 (*p<0.05, **p<0.01)

(5) AGEs により p65 と I κ B α のリン酸化の亢進が認められた (図 7 A)。さらに NF κ B 阻害剤 (Bay11-7082) で AGEs 誘導性の IL-6 と ICAM-1 の発現が有意に抑制された (図 7 B, C)。

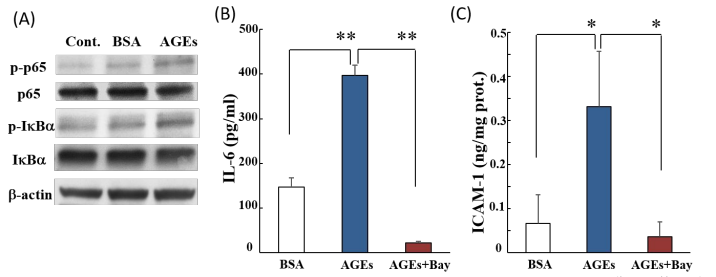


図7 NF- κ B阻害剤がAGEs誘導性IL-6,ICAM-1発現に及ぼす影響 (*p<0.05, **p<0.01)

(6) rhIL-6 により ICAM-1 の発現が遺伝子および蛋白レベルで有意に増加した (図 8 A, B)。IL-6 をノックダウンすると AGEs 誘導性 IL-6 と ICAM-1 の発現が有意に抑制した (図 8 C, D)。

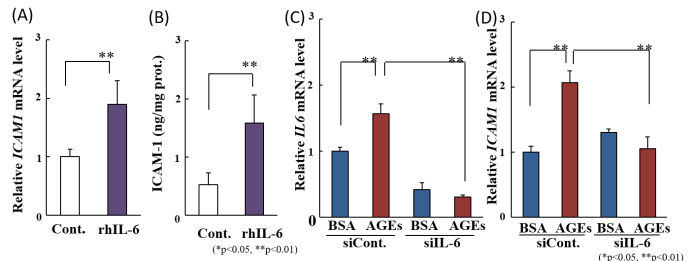


図8 IL-6およびIL-6ノックダウンがAGEs誘導性IL-6,ICAM-1発現に及ぼす影響 (*p<0.05, **p<0.01)

(7) AGEs により歯肉線維芽細胞と単球との細胞接着が有意に増強された (図 9 A)。さらに IL-6 をノックダウンすると AGEs が誘導する細胞接着が有意に抑制された (図 9 B)。

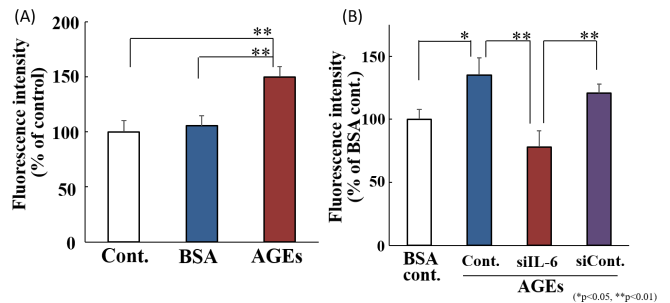


図9 AGEsおよびIL-6ノックダウンが歯肉線維芽細胞と単球との接着に及ぼす影響 (*p<0.05, **p<0.01)

結論と考察

ヒト歯肉線維芽細胞では AGEs によるインフラマソーム反応の誘導を確認することはできなかった。AGEs は、ヒト歯肉線維芽細胞において RAGE、MAPK 及び NF- κ B のシグナルを介して IL-6 及び ICAM-1 の産生を増加させる。また、炎症・免疫に関与する単球との接着を誘導することに よって糖尿病関連歯周炎の病態形成に影響を及ぼしている可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Advanced glycation end-products increase IL-6 and ICAM-1 expression via RAGE, MAPK and NF- κ B pathways in human gingival fibroblasts.

Nonaka K, Kajiura Y, Bando M(13人中3番目), Naruishi K(13人中7番目), Kido J(13人中13番目) *et al.*

J Periodont Res. 2017; 1-11, DOI:10.1111/jre.12518, 査読あり

Clinical significance of GCF sIL-6R and calprotectin to evaluate the periodontal inflammation.

Kajiura Y, Kido J(7人中5番目), Naruishi K(7人中7番目) *et al.*

Ann Clin Biochem. 2017; 54,664-670, DOI.org/10.1177/0004563216680232, 査読あり

YKL-40 level in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis and type 2 diabetes.

Kido J(12人中1番目), Bando Y, Bando M(12人中3番目) *et al.* Oral Dis. 2015; 5,667-673,

〔学会発表〕(計 3 件)

ショウガオールはヒト歯肉線維芽細胞における AGE 誘導性 IL-6 および ICAM-1 産生を抑制する

野中康平、板東美香、木戸淳一、稲垣裕司、坂本英次郎、成石浩司、湯本浩通

第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会 (大阪 2018.10.26) ポスター発表

最終糖化産物はヒト歯肉線維芽細胞における IL-6 と ICAM-1 の発現増加を介して単球との接着を誘導する

野中康平、板東美香、木戸淳一、稲垣裕司、坂本英次郎、成石浩司、湯本浩通

第 61 回春季日本歯周病学会学術大会 (東京 2018.6.1) 口頭発表

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 の発現を調節する .

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 (新潟 2016.10.6)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 木戸 淳一

ローマ字氏名 : KIDO, Jun-ichi

所属研究機関名 : 徳島大学

部局名 : 大学院医歯薬学研究部 (歯学域)

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 10195315

研究分担者氏名 : 成石 浩司

ローマ字氏名 : NARUISHI, Koji

所属研究機関名 : 徳島大学

部局名 : 病院

職名 : 講師

研究者番号 (8 桁) : 00346446

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。