

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20621

研究課題名(和文) 糖尿病関連歯周炎の重症化機序におけるカルプロテクチンの作用

研究課題名(英文) The effect of calprotectin on mechanism of progression of diabetes-associated periodontitis

研究代表者

生田 貴久 (IKUTA, Takahisa)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：00746563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者の歯周病は重症化されると言われるが(糖尿病関連歯周炎)、その病態機序は不明である。本研究の目的は糖尿病関連歯周炎の病態形成におけるカルプロテクチンの作用を調べることである。以下に本研究の成果を示す。

1.カルプロテクチンはTLR4-NF- $\beta$ 経路を介し歯肉線維芽細胞のIL-6産生を誘導した。2.高グルコースはTACEを活性化しTHP-1マクロファージのsIL-6R産生を誘導した。即ち、歯周炎症によるIL-6作用が、高血糖により誘導されるsIL-6R産生の亢進によって増強されるという歯肉線維芽細胞とマクロファージの“重複した炎症反応”が糖尿病関連歯周炎の重症化の一翼を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Diabetic patients are susceptible to severe periodontitis, but the precise mechanism is not well understood. Purpose of this study was to investigate the biological pathogenesis of severe periodontitis in diabetic patients focusing on calprotectin (CPT) effects in human gingival fibroblasts (HGFs) and macrophages crosstalk. The results were as follows: 1. CPT increased significantly IL-6 production via TLR4-NF- $\beta$  pathway in HGFs. 2. High glucose increased significantly sIL-6R production via Tace activation in THP-1 macrophages. These results support that diabetic conditions such as HG may induce sIL-6R production from macrophages and may exacerbate the periodontitis synergistically via CPT-induced IL-6 production in HGFs. CPT or HG-induced IL-6 cascades surrounding HGFs may lead in periodontitis progression through the crosstalk of fibroblasts-macrophages. This pathway could be an attractive target to clarify the pathogenesis of severe periodontitis in diabetic patients.

研究分野：歯周病学

キーワード：カルプロテクチン 糖尿病関連歯周炎 TLR4 IL-6 THP-1 sIL-6R

### 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国の糖尿病患者は激増している。また糖尿病患者の歯周病は重症化することが知られているが(糖尿病関連歯周炎)、その病態機序は不明である。昨今、最終糖化蛋白 AGEs は様々な糖尿病合併症に負の影響を及ぼすことが明らかになり、このことは糖尿病関連歯周炎の重症化にも AGEs が深く関与していることを示唆する。一方、S100 タンパク質であるカルプロテクチンは歯周病患者の歯肉溝滲出液中に有意に高い濃度で存在することから、その歯周病の診断マーカーとしての有用性が提唱されているが、その機能は全く不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周炎症病巣に存在するカルプロテクチンの作用に着目して、糖尿病関連歯周炎の細胞生物学的な重症化機序を探求するために、歯肉線維芽細胞の RAGE 発現に及ぼすカルプロテクチンの影響及び AGEs による炎症性サイトカイン産生性の相乗効果を調べることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生におけるカルプロテクチンの作用

糖尿病関連歯周炎の重症化機序を探る第一段階として、通常歯周病の重症化機序を調べることにした。カルプロテクチンは、好中球等から分泌される S100A8 と S100A9 分子の複合体である。これまでに我々の研究室では、歯周病患者の GCF 中にカルプロテクチンが有意に高いレベルで存在することを報告した(Kido et al, J Clin Periodontol, 1999)。このことは、カルプロテクチンは歯周病診断に有用な疾患マーカーであることを示唆するが、歯周病の病態形成におけるカルプロテクチンの役割は不明である。一方、歯肉線維芽細胞は歯周炎病巣内のサイトカインネットワークの一翼を担い、歯周病の病態形成に重要な役割を果たすことが知られる。そこで本研究では、歯周病の病態形成においてカルプロテクチンが果たす役割を調べることを目的とし、歯肉線維芽細胞における炎症関連因子の産生性に及ぼすカルプロテクチンの影響について検討した。

#### (2) 歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生における AGEs の作用

AGEs は Advanced Glycation End Products の略語であり、タンパク質の糖化反応(メイラード反応)によって作られる生成物の総称である。また、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、慢性腎不全あるいはアルツハイマー型認知症などの疾患を重症化させると言われ、とりわけ糖尿病の血管系合併症の主因ともされる。しかしながら、糖尿病関連歯周炎の重症化機序における AGEs の作用については未だ不明である。

そこで、上記 3(1)と同様に歯肉線維芽細胞

に着目し、AGEs による歯肉線維芽細胞の炎症関連因子の産生に与える影響を検討した

すなわち、株化ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)は DMEM を用いてサブコンフルエントになるまで培養後、リコンビナント S100A8, S100A9, カルプロテクチンを添加し、経日的な培養上清中の MCP-1, IL-6, VEGF, 及び proMMP-1 濃度を市販の各種 ELISA キットを用いて測定した。また、RAGE, TLR2, TLR4 mRNA 発現は RT-PCR 法を用いて調べた。

#### (3) THP-1 Mφ における sIL-6R 産生に及ぼす高グルコースの影響

糖尿病関連歯周炎の重症化機序を探るために、歯周組織の炎症を想定して THP-1 単球を Mφ に分化させた後、高グルコース条件下(25 mM グルコース)で培養し、その sIL-6R の産生性を検討した。

#### (4) 歯肉線維芽細胞の MMP-1 産生に及ぼす高グルコースの影響

高グルコース条件下で培養した歯肉線維芽細胞に IL-1 や IL-6 で刺激を行い、MMP-1 産生性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生におけるカルプロテクチンの作用

・歯肉線維芽細胞は口腔上皮細胞に比較して、恒常的に有意に TLR4 mRNA を発現した。一方、RAGE mRNA 発現は有意に弱かった。

・カルプロテクチンは歯肉線維芽細胞の IL-6 および MCP-1 産生を誘導した。また、そのカルプロテクチン誘導性 IL-6 および MCP-1 産生は、TLR4 (細胞表面)、MAPKs および NF-κB (細胞質内) の阻害によって有意に抑制された。

・TLR4 siRNA を遺伝子導入した細胞では、陰性対照と比較して、カルプロテクチンによる p38MAPK, JNK, ERK および IκB のリン酸化が抑制された。また TLR4 siRNA を遺伝子導入した細胞では、陰性対照と比較してカルプロテクチンによる MCP-1 及び IL-6 の産生が有意に抑制された。

これらの研究成果から、カルプロテクチンは、TLR4 を介してヒト歯肉線維芽細胞の MAPK および NF-κB 経路を活性化し、MCP-1 と IL-6 の産生を亢進することが示唆された。MCP-1 はマクロファージ等の炎症細胞の遊走能を惹起して炎症病巣への炎症細胞浸潤を促進する作用を有する。また、IL-6 は血管浸潤作用や骨吸収促進作用を有するので、歯周病の重症化を促進する機能を持つことが知られる。すなわちカルプロテクチンによる炎症性サイトカインの産生誘導は、歯周病の重症化をきたす細胞生物学的機序の一翼を担う可能性があると考えられる。

#### (2) 歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生における AGEs の作用

AGEs は RAGE の発現を誘導すること、そし

て、それに呼応するように IL-6 の産生を誘導することが分かった。すなわち、糖尿病関連歯周炎の重症化機序において AGEs は IL-6 シグナル系を誘導することで、歯周組織の炎症反応を惹起する可能性が示唆された。

(3) THP-1 Mφにおける sIL-6R 産生に及ぼす高グルコースの影響

sIL-6R は IL-6 のアゴニスト作用を有する分子である (Naruishi et al, J Dent Res, 2001)。興味あることに THP-1 Mφ はグルコース濃度依存性に sIL-6R 産生を有意に誘導した。

(4) 歯肉線維芽細胞の MMP-1 産生に及ぼす高グルコースの影響

高血糖条件下で培養した歯肉線維芽細胞を IL-1 や IL-6 で刺激すると、タンパク分解酵素 MMP-1 の産生が有意に亢進した。また、この MMP-1 誘導は NF-κB 系あるいは MAPK 系によって制御されることも分かった。IL-1 は歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を劇的に誘導することから (Sawada et al, Biomed Res, 2013), IL-1 を基点とした IL-6 シグナルの惹起による歯周組織破壊が糖尿病関連歯周炎の重症化機序の一翼を担う可能性が示唆された。

(5) 糖尿病関連歯周炎の重症化における細胞生物学的機序 ～まとめ～

本研究で得られた知見をまとめると、歯周炎症病巣の好中球が産生・分泌するカルプロテクチンが歯肉線維芽細胞に作用して IL-6 産生を誘導する反応に加えて、高グルコースによるマクロファージの sIL-6R 産生誘導が相まって生じる IL-6 ネットワークの増強反応が、結果的に歯周病の重症化を促進する可能性が示唆された。すなわち、マクロファージと線維芽細胞のクロストークによって生じる様々なサイトカインネットワークが、

糖尿病患者における歯周病重症化機序の一翼を担っていると考えられる (右図)。

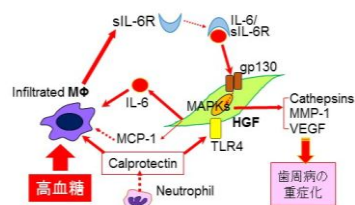


図 糖尿病関連歯周炎の細胞学的重症化機序

(6) 研究の総括

我が国の糖尿病予備軍を含めた糖尿病患者数は約 2,000 万人と推計され (平成 24 年厚労省統計より), 糖尿病は「国民を悩ます」疾患として広く認知されている。一方、歯周病は糖尿病の合併症の一つである。古くから糖尿病患者の歯周病は重症化することが知られるが (糖尿病関連歯周炎), その病態機序は不明であった。

本研究結果から、歯周炎症巣に浸潤した好中球が産生するカルプロテクチンが歯肉線維芽細胞の IL-6 産生を誘導するという環境下に、さらに高血糖によって誘導されるマクロファージの sIL-6R 分泌亢進という現象が相まって起こる“重複した炎症反応”が糖尿病関連歯周炎の重症化に関与する可能性が示唆された。我々はこれらの病態機序を基盤に

して、糖尿病関連歯周炎に対する新たな診断技術の確立および治療戦略の提唱に貢献できるものと考えている。

今後、当該研究領域のエビデンスが益々蓄積されて更なる発展を遂げることで、将来、本疾患によって悩まされる患者が減少すること、ひいては国民の健康寿命の延伸に繋がることを期待する。

謝辞 本研究の遂行にあたり、終始、ご助言をいただいた徳島大学木戸淳一准教授ならびに梶浦由加里先生に心より感謝申し上げます。また、様々な局面でサポートいただいた徳島大学大学院医歯薬研究部歯周歯内治療学分野の諸先生方に感謝申し上げます。

## 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 2 件)

1. Nonaka K, Kajiura Y, Bando M, Sakamoto E, Inagaki Y, Lew JH, Naruishi K, Ikuta T, Yoshida K, Kobayashi T, Yoshie H, Nagata T, Kido J.

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

J Periodontal Res. in press. doi:

10.1111/jre.12518. (査読あり)

2. Kajiura Y, Lew JH, Ikuta T, Nishikawa Y, Kido JI, Nagata T, Naruishi K.

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

Ann Clin Biochem, 54(6):664-670, 2017.

doi: 10.1177/0004563216680232. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

・国際学会発表

1. Lew JH, Naruishi K, Kajiura Y, Ikuta T, Nishikawa Y, Kido J, Nagata T.

Periodontal evaluation using sIL-6R/calprotectin in GCF during SPT phase. The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, 9/10/2016.

・国内学会発表

1. 坂本英次郎, 稲垣裕司, 木戸淳一, 高木亮輔, 生田貴久, 成石浩司, 永田俊彦. マウス骨細胞株 MLO-Y4-A2 のスクレロチン発現における最終糖化産物および LPS の影響. 第 145 回日本歯科保存学会春期学術大会, 2016 年 10 月 27 - 28 日

2. 木戸淳一, 板東美香, 中島由紀子, 梶浦由加里, 稲垣裕司, 生田貴久, 坂本英次郎, 成石浩司, 永田俊彦. ヒト口腔上皮細胞と歯肉線維芽細胞において低酸素環境が誘導す

る遺伝子発現の比較. 第 143 回日本歯科保存学会秋期学術大会, 2015 年 11 月 12 - 13 日

3. 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. 最終糖化産物はヒト口腔上皮細胞の遺伝子発現を調節する. 第 58 回日本歯周病学会秋期学術大会, 2015 年 9 月 12 - 13 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

生田 貴久 (IKUTA, Takahisa)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：00746563