

令和元年6月14日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11846

研究課題名(和文) 歯周病におけるインクレチンGIPの作用機構の解明

研究課題名(英文) Therapeutic mechanism of GIP on periodontal disease

研究代表者

成瀬 桂子 (Naruse, Keiko)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：30387576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)はインスリン分泌を増強するが、GIP受容体は全身に分布し、その降外作用が注目されている。我々は、GIP受容体欠損マウス(GIPRKO)を用いて、歯周炎の発症・進展におけるGIPの役割を統合的に解析した。その結果、GIPシグナルの欠損により歯周炎が悪化すること、歯周炎の誘導により歯肉に浸潤した炎症性細胞はGIP受容体を発現しており、GIPは炎症性細胞のGIP受容体を介して抗炎症効果を発揮することが明らかとなった。本研究によりGIPが歯周炎に対する新たな治療戦略となり得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

本研究結果はGIPがその受容体を介して歯周病の発症・進展を抑制することを示唆しており、GIP関連薬は歯周病の新しい治療戦略となり得る。さらに現在我が国の糖尿病患者に最も多く使用されているDPP-4阻害薬は、GIPの作用も増強することから、DPP-4阻害薬を含めたGIP関連薬は、血糖降下作用とともに歯周炎に対する抗炎症作用を持つ糖尿病合併歯周炎の新しい治療戦略としても期待できる。

研究成果の概要(英文)：Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulates pancreatic cells to secrete insulin secretion. Since the receptor of GIP located in whole body, there are many investigations about the extrapancreatic effects of GIP. To examine the effect of GIP on periodontitis, we induced experimental periodontitis in GIP receptor-knockout mice (GIPRKO) in this study. Periodontitis in GIPRKO showed a marked increase of inflammatory cells in the gingivomucosal tissue. The infiltrated inflammatory cells expressed GIPR, suggesting that GIP ameliorates periodontitis via GIPR of inflammatory cells. These results suggest the therapeutic potency of GIP on periodontal disease.

研究分野：糖尿病

キーワード：歯周治療学 代謝学

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者では歯周病の罹患率が高く重症化しやすいことより、糖尿病合併症の一つとして歯周病が注目されている。我々はこれまでに実験的歯周炎を惹起して糖尿病における歯周病悪化のメカニズムについて検討し、糖尿病ラットにおいてニトロ化ストレスが歯周病悪化に関与していること (J Clin Periodontol, 2012) および歯周病の惹起が感作された単核球を介して大動脈における初期炎症を誘導することを証明した (Sci Rep, 2014)。歯周病と糖尿病は、双方向性に影響し合うのみでなく、歯周病による慢性炎症は、他の合併症に悪影響を及ぼす可能性が高く、糖尿病患者における歯周病治療の重要性は、ますます増していると考えられる。

(2) インクレチンは、消化管より分泌されインスリン分泌を促進するホルモンの総称であり、小腸K細胞より分泌される glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) および小腸L細胞より分泌される glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が同定されている。血中に分泌されたインクレチンは、dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) という分解酵素により数分で分解され活性を失う。インクレチンの分解抑制によりインクレチン作用を増強させる薬剤である DPP-4 阻害薬は、現在では 2 型糖尿病に対し最も多く使用されている薬剤となっている。DPP-4 阻害薬は、GLP-1 とともに GIP 作用も増強する。GLP-1 はすでに GLP-1 受容体作動薬が注射薬として 2 型糖尿病患者に使用されているが、GIP については、いまだ不明な点も多い。GLP-1 受容体、GIP 受容体については、膵臓のみでなく全身に発現しており、またその発現パターンはそれぞれの受容体によって異なる。特に骨については、GIP 受容体は、骨芽細胞および破骨細胞で発現しており、骨形成に重要な役割を果たしていると考えられる。GIP は、さらに炎症性細胞に発現しており炎症に関与することが報告されているが、その効果は組織により異なっている。歯周病は、歯周ポケットに存在する歯周病原細菌より波及した炎症が、セメント質、歯根膜および歯槽骨などの深部歯周組織に波及した慢性炎症である。炎症と骨形成に作用する GIP は、歯周病の発症・進展に大きく関与する可能性が想定される。

2. 研究の目的

- (1) GIP 受容体欠損マウス (GIPRKO) に実験的歯周炎を惹起し、歯周炎の発症・進展における GIP の役割を統合的に解析する。
- (2) 培養実験系を用いて、GIP の歯周炎改善に関わる分子メカニズムを明らかにする。

得られた知見は、GIP が新たな歯周病治療戦略となることが期待できるとともに、GIP の血糖降下作用に加わる新たな抗歯周病作用機構を明らかにすることにより、歯周炎改善の観点を含めた糖尿病治療ストラテジーを構築することが期待される。

3. 研究の方法

(1) GIPRKO マウスおよび WT マウスに対する実験的歯周炎惹起：歯周炎の惹起は、麻酔下で上顎右側第二臼歯 (M2) と上顎右側第二臼歯 (M2) 歯間部に出来るだけ歯肉に損傷を与えないようにリガチャーワイヤー (Nilaco Corporation Tokyo, Japan) を巻いて結紮し、ブラークの停滞しやすい環境を人工的に作製した。

(2) 病理組織学的検討：実験的歯周炎誘導 2 日～14 日経過後に、上顎第 1-3 臼歯周囲の歯周上顎骨とともに一塊として組織を摘出固定した。得られた組織は、OCT コンパウンドに包埋し、凍結した。凍結組織は、脱灰することなく薄切し、HE 染色、免疫組織染色を行った。歯周組織における炎症については、抗 Mac1 抗体を用いた免疫組織染色、GIP 受容体発現については抗 GIP 受容体抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(3) 遺伝子発現解析：上顎第 2 臼歯周囲の歯周組織における mRNA 発現について、炎症性サイトカインを中心に real time PCR 法にて測定した。

(4) ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に対する GIP の抗炎症作用の検討：THP-1 細胞に各種濃度の GIP を添加した後 lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、炎症性サイトカイン遺伝子発現に対する GIP の効果を検討した。さらにその経路についても検討した。

4. 研究成果

(1) 歯肉における炎症細胞浸潤：歯肉における炎症性細胞浸潤を H-E 染色を行い評価した。WT 群、GIPRKO 群ともに対照側に比べて歯周炎群では炎症性細胞浸潤の増加を認め、GIPRKO 歯周炎群ではさらに著大な炎症性細胞浸潤を認めた。単球、顆粒球、マクロファージなどの表面抗原のマーカーである Mac-1 を用いて免疫染色を行った結果、WT 対照側では Mac-1 陽性細胞を認めなかったが、WT 歯周炎側では留置したワイヤー周囲に有意な Mac-1 陽性細胞の増加を認めた。一方、GIPRKO 対照側

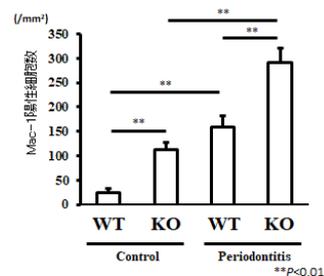


図1. 歯肉におけるMac-1陽性細胞数(文献19)

では、歯周組織においてすでに少数の Mac-1 陽性細胞を認め、GIPRKO 歯周炎側では、ワイヤー周囲を中心に最も多くの Mac-1 陽性細胞が観察された(図 1)。

(2) 歯肉における GIP 受容体発現：WT 群および GIPRKO 群の歯肉を GIP 受容体抗体、および Mac-1 抗体を用いて二重染色した。GIP 受容体は WT マウスの歯周炎側で発現確認され、さらに GIP 受容体発現細胞は Mac-1 も発現していたため、歯周炎により歯肉に浸潤した炎症性細胞において GIP 受容体が発現していると考えられた(図 2)。

(3) 歯間部歯肉における遺伝子発現：WT、GIPRKO 群ともに歯周炎群で TNF- α および iNOS の遺伝子発現が有意に増加した。また、WT 歯周炎側と比較して、GIPRKO 歯周炎側で有意に TNF- α および iNOS の遺伝子発現が増加していた。IL-1 β においては、WT、GIPRKO 群ともに対照側と比較して歯周炎側で有意に増加した。IL-1 α では有意差は認められなかった。

(4) THP-1 細胞における LPS 誘導炎症性サイトカイン発現に対する GIP の効果：THP-1 における遺伝子発現では、コントロールと比較して LPS の添加で TNF- α 、iNOS の遺伝子発現が有意に増加した。GIP の存在は LPS の刺激による TNF- α および iNOS 遺伝子発現を濃度依存性に有意に抑制した。また、阻害剤を用いた LPS 誘導炎症性サイトカイン発現の抑制メカニズムについては、cAMP 阻害薬 (MDL-12330A) および PKA 阻害薬 (PKI14-22) の添加により炎症性サイトカインの発現に対する GIP の抑制効果を阻害した。

(5) 我々は、歯間部のワイヤー結紮により実験的歯周炎を惹起した。このリガチャーワイヤー誘導性歯周炎モデルはヒトの歯周炎の病態に近い歯周炎モデルである。この実験的歯周炎モデルを用い、GIP シグナルの欠損によって歯周炎が悪化することが明らかとなった。前述の結果は、歯周炎における GIP の抗炎症作用を示唆する。歯周炎の誘導により歯肉に浸潤した炎症性細胞は GIP 受容体を発現していることより、GIP の歯周炎抑制効果は炎症性細胞に発現している GIP 受容体を介していると考えられた。さらに培養細胞を用いた検討により、マクロファージにおける GIP の抗炎症作用は GIPR/cAMP/PKA 経路を介していることが明らかとなった。本研究により GIP は歯周炎に対する新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。

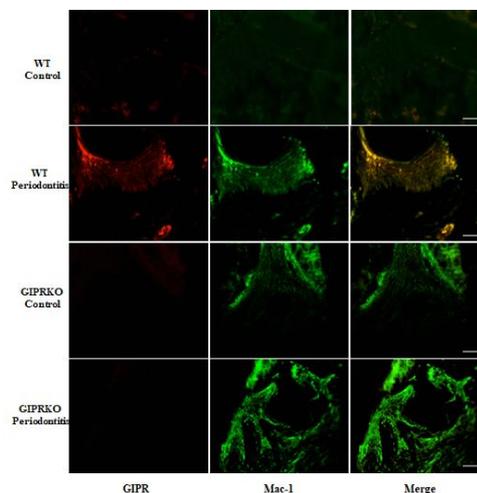


図2. 歯肉におけるGIP受容体発現とMac-1陽性細胞(文献8)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 23 件)

Mohiuddin MS, Naruse K(他 13 名、18 番目), et al. : Glucagon-like peptide-1 receptor agonist protects dorsal root ganglion neurons against oxidative insult. J Diabetes Res 2019; 9426014.2019. 査読有

DOI: 10.1155/2019/9426014.

稲垣幸司, 菊池 毅, 三谷章雄, 成瀬桂子, 松原達昭. : 糖尿病合併症予防 歯周病 . 内科 121:121-126.2018. 査読有

Nakamura N(1 番目), Naruse K(他 6 名、2 番目), et al. : Chemerin promotes angiogenesis in vivo. Physiol Rep 6 : e13962.2018.査読有

DOI: 10.14814/phy2.13962.

Naitoh M, Mitani A(他 7 名、2 番目), et al. : Quantification of voxel values in micro computed tomography using multiple porosity hydroxyapatite blocks. Okajimas Folia Anat Jpn. 95: 9-13, 2018. 査読有

DOI: 10.2535/ofaj.95.9.

Nagano K, Mitani A(他 4 名、5 番目), et al. : Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA and mfaI fimbrial genotypes in subgingival plaques. PeerJ, 6: e5581, 2018. 査読有

DOI: 10.7717/peerj.5581.

Kobayashi T, Mitani A(他 13 名、11 番目), et al. : The KCNQ1 gene polymorphism as a shared genetic risk for rheumatoid arthritis and chronic periodontitis in Japanese adults: A pilot case-control study. J Periodontol, 89(3): 315-324, 2018. 査読有

DOI: 10.1002/JPER.17-0412.

Irie K, Mitani A(他 10 名、9 番目), et al. : Age-related changes of CD4⁺ T cell migration and cytokine expression in germ-free and SPF mice periodontium. Arch Oral Biol, 87: 72-78, 2018. 査読有

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.12.007.

成瀬桂子. : 特集 糖尿病と感染症【各論】5 . 糖尿病と歯周病. Diabetes Frontier 28 : 421-426.2017. 査読有

稲垣幸司, 菊池毅, 三谷章雄, 成瀬桂子, 松原達昭. : 糖尿病合併症予防 歯周病 . 内科 121 : 121-126.2017. 査読有

Tsukamoto J, Naruse K(2 番目), Nakamura N(他 7 名、5 番目), et al. : Efficacy of a self-assembling peptide hydrogel, SPG-178-Gel, for bone regeneration and three-dimensional osteogenic induction of dental pulp stem cells. Tissue Eng Part A 23: 1394-1402.2017. 査読有

DOI: 10.1089/ten.TEA.2017.0025.

Adachi K, Nakamura N(3 番目), Mitani A(14 番目), Naruse K(他 12 名、16 番目), et al. : Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of periodontitis in diabetes. J Clin Periodontol 44: 971-980.2017. 査読有

DOI: 10.1111/jcpe.12758.

Okabe I, Mitani A(他 11 名、12 番目), et al. : IL-15 and RANKL play a synergistically important role in osteoclastogenesis. J Cell Biochem, 118:739-747 2017. 査読有

DOI: 10.1002/jcb.25726.

Sasaki Y, Mitani A(他 11 名、11 番目), et al. : New irradiation method with Indocyanine Green-loaded nanospheres for inactivating periodontal pathogens. Int J Mol Sci 18:E154, 2017 . 査読有

DOI: 10.3390/ijms18010154.

Okada K, Mitani A(他 12 名、13 番目), et al. : Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17 expression and production by human CD4+ T cells. PeerJ 5:e2999, 2017. 査読有

DOI: 10.7717/peerj.2999.

Orimoto A, Mitani A(他 7 名、7 番目), et al. : F-spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of TGF- β activity. Arch Oral Biol 79:7-13, 2017. 査読有

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.02.019.

Ohno T, Mitani A(他 10 名、11 番目), et al. : Angiopoietin-like protein 2 regulates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival epithelial cells. PLoS One 12:e0184825, 2017 . 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0184825.

Houno Y, Mitani A(他 7 名、5 番目), et al. : Optimizing the reconstruction filter in cone-beam CT to improve periodontal ligament space visualization: An in vitro study. Imaging Sci Dent 47:199-207, 2017 . 査読有

DOI: 10.5624/isd.2017.47.3.199.

Ishida N, Mitani A(他 10 名、9 番目), et al. : Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. NPJ Aging Mech Dis, 3:15, 2017 . 査読有

DOI: 10.1038/s41514-017-0015-x.

Suzuki Y, Nakamura N(2 番目), Mitani A(15 番目), Naruse K(他 13 名、17 番目), et al. : Anti-inflammatory role of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in periodontitis. J Diabetes Investig 7: 497-505.2016. 査読有

DOI: 10.1111/jdi.12450.

Iwamura Y, Mitani A(他 14 名、14 番目), et al. : Assessment of oral malodor and tonsillar microbiota after gargling with benzethonium chloride. J Oral Sci 58: 83-91, 2016. 査読有

DOI: 10.2334/josnusd.58.83.

②1 Okabe E, Mitani A(他 11 名、12 番目), et al. : Adhesion properties of human oral epithelial-derived cells to zirconia. Clin Implant Dent Relat Res 18: 906-916, 2016. 査読有

DOI: 10.1111/cid.12369.

②2 Hasegawa Y, Mitani A(他 8 名、8 番目), et al. : Role of Mfa5 in expression of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res 95: 1291-1297, 2016. 査読有

DOI: 10.1177/0022034516655083.

②3 Nishida E, Mitani A(他 9 名、10 番目), et al. : Serum amyloid A promotes E-selectin expression via Toll-like receptor 2 in human aortic endothelial cells. Mediators Inflamm 2016: 7150509, 2016. 査読有

査読有

[学会発表](計 14 件)

澤田憲孝, 中村信久(3 番目), 三谷章雄(11 番目), 成瀬桂子(他 9 名、13 番目)他. : 歯周炎に対する GLP-1 受容体作動薬 (Liraglutide) の効果. 第 33 回日本糖尿病・肥満動物学会 (福岡), 2019.

菊池毅, 成瀬桂子(7 番目), 三谷章雄(他 5 名、8 番目)他. : 2 型糖尿病を伴う広汎型重度慢性歯周病患者に対して歯周基本治療が奏功した一症例. 第 61 回春季日本歯周病学会学術大会 (東京), 2018.

Miura E, Naruse K(他 10 名、4 番目), et al. : Secreted factors from dental pulp stem cells ameliorated diabetic polyneuropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. 78th Scientific

Sessions of American Diabetes Association (Orlando),2018.

Makino E, Nakamura N(2 番目), Naruse K(他 10 名、13 番目), et al. : Mechanisms of therapeutic effects of conditioned media from cultured dental pulp stem cells on diabetic polyneuropathy. 78th Scientific Sessions of American Diabetes Association (Orlando),2018.

秦正樹, 成瀬桂子 (他 6 名、6 番目) 他. : 歯髄幹細胞を用いた骨組織再生療法の検討. 第 39 回日本炎症・再生医学会 (東京), 2018.

中村信久 (1 番目), 成瀬桂子 (他 3 名、2 番目) 他. : Chemerin の血管形成促進作用と Chemerin 受容体の同定. 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (大阪), 2018.

Naruse K(1 番目), Nakamura N(他 6 名、4 番目)他. : Role of anti-inflammation by dental pulp stem cell transplantation on diabetic polyneuropathy-promoting macrophage polarization into M2 phenotype. Neurodiab 2018 (Roma),2018.

中村信久, 成瀬桂子, 松原達昭. : Chemerin は CMKLR1 を介して血管新生能を促進する. 第 39 回日本肥満学会 (神戸), 2018.

Naruse K(1 番目), Nakamura N(他 12 名、5 番目), et al. : Therapeutic effects of conditioned media from cultured dental pulp stem cells in diabetic polyneuropathy. American Diabetes Association, 77th Scientific Sessions (San Diego),2017.

Naruse K(他 7 名、1 番目), et al. : Cell therapy using human dental pulp stem cells bypasses impacts of aging and diabetes and ameliorates diabetic polyneuropathy. Neurodiab 2017(Coimbra),2017.

鈴木佑基, 中村信久 (2 番目), 三谷章雄 (16 番目), 成瀬桂子(他 14 名、18 番目)他. : GIP による歯周炎抑制作用についての検討. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会(京都),2016.

中村信久 (1 番目), 成瀬桂子 (他 2 名、2 番目) 他. : アディポサイトカインである Chemrin の血管形成促進作用とそのメカニズムの解明. 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (東京), 2016.

鈴木佑基, 成瀬桂子 (2 番目), 中村信久 (3 番目), 三谷章雄(他 2 名、14 番目)他. : GIP による歯周炎抑制効果の検討. 第 23 回日本歯科医学会総会 (福岡), 2016.

Omi M, Nakamura N (3 番目), Naruse K(他 2 名、8 番目), et al. : Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammatory phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. The 54th Midwest Regional Society of Developmental Biology Meeting (Michigan), 2016.

鈴木佑基, 成瀬桂子 (2 番目), 中村信久 (3 番目), 三谷章雄 (他 5 名、9 番目) 他. : GIP による歯周炎抑制経路の検討. 第 11 回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 (岐阜), 2016.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 信久

ローマ字氏名：(NAKAMURA,Nobuhisa)

所属研究機関名：愛知学院大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：50619773

(2)研究分担者

研究分担者氏名：三谷 章雄

ローマ字氏名：(MITANI,Akio)

所属研究機関名：愛知学院大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50329611

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。