

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20683

研究課題名(和文) 糖尿病の歯周病に対するインスリン治療効果の検討

研究課題名(英文) Impact of insulin on experimental periodontitis in diabetic rats

研究代表者

西川 徹(Nishikawa, Toru)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90771262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は糖尿病合併症の1つであり、糖尿病と歯周病が密接に関連していることが知られている。今回我々は糖尿病ラットの歯周病に対するインスリン治療効果を検討した。糖尿病では歯肉における血流障害があり、プラークの停滞による歯周病悪化が確認された。また、iNOSを介した過剰なNO産生によるニトロ化ストレスが、歯周病悪化に関与している可能性が示唆された。インスリン治療は、これらの悪化を緩和し、糖尿病患者の歯周病治療におけるインスリン治療の可能性が実験的に証明された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated whether administration of insulin improves periodontitis without any other treatments for periodontitis under the diabetic condition using the ligature-induced experimental periodontitis model. The treatment of insulin significantly ameliorated diabetic periodontitis without the local treatment of periodontitis in the STZ-induced diabetic rats, which strongly supports that the adequate treatment of insulin are necessary for the therapy of periodontitis in type 1 diabetic patients. Anti-inflammatory effect of insulin suggests the beyond lowering glucose lowering in the treatment of diabetic periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 糖尿病 インスリン

1. 研究開始当初の背景

近年、全身的要因の1つと考えられる糖尿病などの生活習慣病は、歯周病と密接に関係していることが疫学を中心に明らかにされつつある。糖尿病はインスリン作用不足による慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患群である。糖尿病合併症は高度のインスリン作用不足によって起こる急性合併症と、長年の高血糖によって起こる慢性合併症に分類される。歯周病は糖尿病の重大な慢性合併症の1つであり、糖尿病における高血糖状態の持続に起因する好中球の機能不全、コラーゲン合成阻害、歯根膜線維芽細胞の機能異常、終末糖化産物などによる炎症性組織破壊、微小循環障害、過剰な免疫反応などが歯周組織に影響を与え、歯周病を増悪させると考えられている。これまでに我々は、糖尿病における歯周病増悪のメカニズムを明らかにすることを目的に、STZ誘導糖尿病ラットに、実験的歯周炎を惹起し、NO経路を中心に検討した。その結果、糖尿病ラットでは、正常ラットと比較し、iNOSの遺伝子発現は有意に高かった。このiNOSの発現上昇は炎症刺激の結果であり、NOを大量に産生する(Nishikawa.T et al, *J Clin Periodontol*, 2012)。NOは高い反応性を有したフリーラジカルであり、過剰な存在はパーオキシナイトライトを産生し、ニトロ化反応により直接細胞障害を惹起することが知られている(Radomski MW, *Biochem Biophys Res Commun*, 1987)。我々の研究でも、糖尿病ラットの歯周組織において、ニトロ化反応産物であるニトロチロシンの増加を確認した。この結果は、糖尿病を伴う歯周病の悪化において、ニトロ化反応が関与していることを示した(Nishikawa.T et al, *J Clin Periodontol*, 2012)。

2. 研究の目的

我々はこれまでの歯周炎惹起モデルを用いた動物実験にて、糖尿病における歯周炎の悪化にニトロ化反応が関与している可能性

を示唆した(Nishikawa.T et al, *J Clin Periodontol* 2012)が、ニトロ化反応の抑制が、糖尿病に合併する歯周炎の治療戦略となる可能性が考えられる。これらの実験的検討は、臨床的にも学術的にも重要な意義を有すると思われたため、今回我々は、糖尿病ラットにインスリン治療を実施し、ニトロ化反応の抑制が歯周炎に対する治療戦略となるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

糖尿病ラット(DMラット)の作成:5週齢の雄性Sprague-Dawleyラットにstreptozocin(STZ)(50 mg/kg)を腹腔内投与し、糖尿病を誘導した。STZ投与2週間後の血糖値が、200 mg/dl以上のラットをDMラットとして実験に用いた。

実験的歯周炎の惹起およびインスリン治療:STZ投与2週間後に正常ラット及びDMラットに対し、上顎右側第二臼歯の歯頸部にナイロン糸を結紮し、実験的歯周炎を惹起し、対側をコントロール側とした。DMラット半数の背部皮下にインスリンペレット(LINPLANT、LINSHIN Canada社)を挿入し、DM+インスリンラットとした。

実験的歯周炎の評価:歯肉における組織血流の測定(レーザー血流計オメガフロ、OMEGAWAVE社)、遺伝子発現解析、組織学的評価(H・E染色、免疫染色)、マイクロCT撮影を行った。培養THP-1細胞を用いてLPS誘導炎症性サイトカイン発現に対するインスリンの効果を検討した。

4. 研究成果

(1)体重、血糖値、HbA1c:正常ラットと比較し、DMラットでは体重は減少、血糖値とHbA1cは上昇を認めた(体重:正常ラット323.8 ± 7.3 g, DMラット192.8 ± 22.0 g, 血糖:正常ラット114.9 ± 3.7 mg/dL, HbA1c:4.0 ± 0.1%, DMラット7.0 ± 0.2%)。DM+インスリンラットはDMラットと比べ有意な体重

の増加 (295.8 ± 18.5 g) 血糖値とHbA1cの低下 (136.5 ± 11.0 mg/dl、 5.2 ± 0.2 %) が認められた。

(2) 歯肉における組織血流：対照側の歯肉血流は正常ラットに比較し、DMラットで低下していた (正常ラット 14.3 ± 0.4 , DMラット 8.6 ± 0.5 ml/min/100g tissue)。歯周炎の惹起により歯肉血流は有意に増加するが、その増加率は正常ラット 37% に対し、DMラットでは 90% と DMラットにおける歯周炎による血流増加が顕著であり、炎症の程度と関連していると考えられた。インスリン治療は、非歯周炎の対照側歯肉血流を有意に増加した (12.4 ± 0.7 ml/min/100g tissue)。一方で、歯周炎惹起による歯肉血流増加は 60% で、インスリン治療が糖尿病ラット歯周炎を改善している可能性が示唆された。

(3) 遺伝子発現：DMラットで発現増加を認められた炎症性サイトカイン TNF- α の遺伝子発現は DM+インスリンラットでは有意な発現減少を認めた。

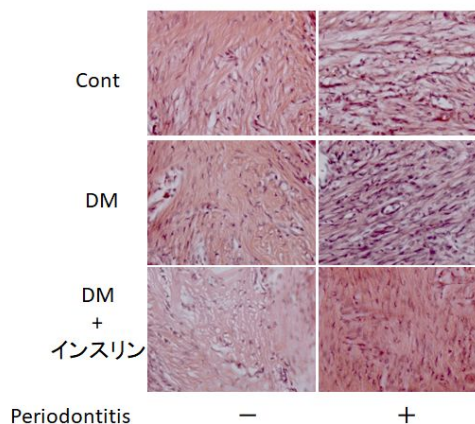
歯肉における TNF- α 遺伝子発現量の比較 (Comparative quantitation(fold))

| | 対照側 | 歯周炎側 |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常ラット | 1.1 ± 0.2 | 2.7 ± 0.3 |
| 糖尿病ラット | $2.8 \pm 0.4^{**}$ | $8.5 \pm 1.2^{**}$ |
| 糖尿病ラット+ インスリン治療 | $1.6 \pm 0.2^{* \cdot \#}$ | $4.7 \pm 0.6^{* \cdot \#}$ |

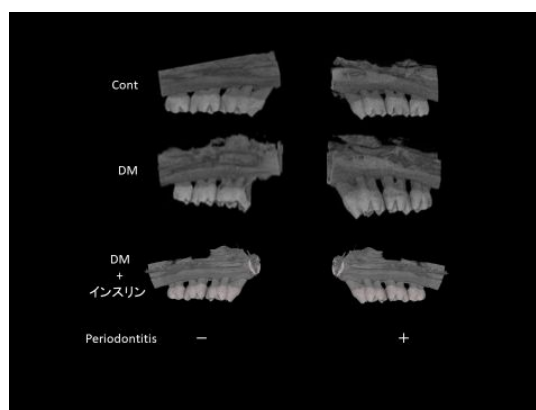
*P<0.05 vs.

(4) 組織学的評価：H・E 染色では歯周炎の惹起により、炎症性細胞浸潤を認めた。DMラット歯周炎側では、正常ラット歯周炎側に比較し顕著な炎症性細胞浸潤を認めたが、DM+インスリンラット歯周炎側では炎症性細胞浸潤の減少を認めた。

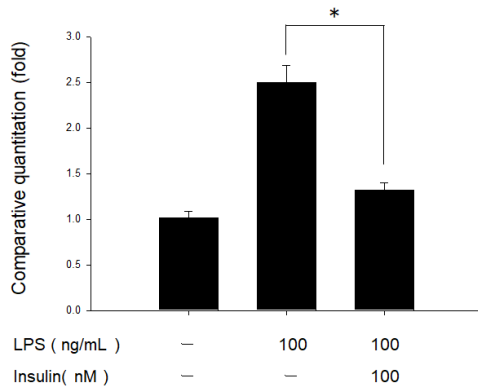
<H・E染色>



(5) マイクロ CT 撮影：歯周炎の惹起は、歯槽骨吸収を促進した。DMラット歯周炎側では、正常ラット歯周炎側に比較し、より顕著な骨吸収像を認めたが、DM+インスリンラット歯周炎側では糖尿病ラット歯周炎側に比較して有意に骨吸収の減少を認めた (CEJ から歯槽骨骨頂部までの計測 DMラット歯周炎側： 3.3 ± 0.5 mm、DM+インスリンラット歯周炎側： 2.1 ± 0.3 mm)。



(6) ヒトマクロファージ細胞株での評価：THP-1 細胞において、LPS 刺激は有意な TNF- α 遺伝子発現を増加させたが、インスリンは LPS が誘導する TNF- α 遺伝子発現を有意に抑制した (LPS 単独 TNF- α ： 2.5 ± 0.5 倍、LPS+インスリン TNF- α ： 1.3 ± 0.2 倍)



以上のことから、糖尿病ラットにインスリン治療を行うことにより、血糖コントロールが改善するとともに、歯周炎惹起による歯周組織の炎症反応が減弱され、さらに骨吸収も抑制された。また、THP-1 細胞における検討により、インスリンが直接的な作用により炎症抑制効果を示すことが明らかとなった。即ち、糖尿病と併発した歯周炎に対し、インスリン治療は血糖コントロール改善を介してのみでなく、直接的な炎症抑制作用も加わり歯周炎改善効果を呈することが示唆された。

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)

Adachi K, Miyajima S, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Nishikawa T, Suzuki Y, Kikuchi T, Kobayashi S, Saiki T, Mizutani M, Ohno N, Noguchi T, Mitani A, Matsubara T, Naruse K. J Clin Periodontol. 2017 Oct;44(10):971-980. (査読有)

Suzuki Y, Nakamura N, Miyabe M, Nishikawa T, Miyajima S, Adachi K, Mizutani M, Kikuchi T, Miyazawa K, Goto S, Tsukiyama K, Yamada Y, Ohno N, Noguchi T, Mitani A, Matsubara T, Naruse K. J Diabetes Investig. 2016 Jul;7(4):497-505. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

西川徹、成瀬桂子、中村信久、宮部愛、
宮島真一、足立圭、鈴木佑基、菊池毅、
水谷誠、本田雅規、松原達昭、三谷章雄

糖尿病誘導ラットにおけるインスリン投与が実験的歯周炎に及ぼす影響 日本歯科保存学会 2017 年度春季学術大会 (第 146 回) 2017 年

鈴木佑基、成瀬桂子、中村信久、宮部愛、西川徹、宮島真一、菊池毅、松原達昭、三谷章雄 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 2016 年

西川徹、菊池毅、真岡淳之、三谷章雄 慢性歯周炎患者の下顎大臼歯部に骨移植術を行った一症例 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 2016 年

鈴木佑基、小林泰子、中村信久、宮部愛、西川徹、宮島真一、足立圭、水谷誠、菊池毅、宮澤健、月山克史、山田祐一郎、後藤滋巳、大野紀和、野口俊英、三谷章雄、松原達昭、成瀬桂子 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 2016 年

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 徹 (Nishikawa Toru)
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：90771262

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

菊池毅 (Kikuchi Takeshi)
愛知学院大学・歯学部・准教授

宮島真一 (Miyajima Shin-ichi)
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

足立圭 (Adachi Kei)
愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

鈴木佑基 (Suzuki Yuki)
愛知学院大学・歯学部・非常勤助教

松原達昭 (Matsubara Tatsuaki)
愛知学院大学・歯学部・教授

成瀬桂子 (Naruse Keiko)
愛知学院大学・歯学部・准教授