

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09603

研究課題名(和文) 2型糖尿病における歯周病原性細菌に対するインクレチン関連薬の影響

研究課題名(英文) Effects of the incretin-related drug on periodontopathic bacteria in type 2 diabetes

研究代表者

作田 哲也 (SAKUTA, TETSUYA)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：20284888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：フロリジンはリンゴより抽出されるポリフェノールの一種です。現在、このフロリジンを元にした SGLT-2 阻害薬が開発され、糖尿病の患者さんに用いられています。最近、フロリジンの代謝産物であるフロレチンが、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて、腸内細菌の種類を調節することによって症状が改善されることが報告されました。本研究では、義歯性口内炎や歯周病に関係する *Candida albicans* のバイオフィルム形成に対するフロリジンの影響を検討しました。今回、リンゴから抽出されるフロリジンが *C. albicans* の増殖能に影響を与えず、バイオフィルム形成能を抑制するという実験結果を見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンゴから取れるフロリジンという物質が、入れ歯が原因で生じる口の中の粘膜の炎症(義歯性口内炎)や歯周病の病態を軽くする可能性のある実験結果を得ました。つまり、義歯性口内炎等の原因となる菌であるカンジダアルビカンス(*C. albicans*)の増殖には影響を与えずに入れ歯や歯茎に菌がくっつく時に重要なバイオフィルム形成能を抑制したというものです。これは、フロリジンには口腔内の細菌叢(種々の細菌の種類)には影響を与えずに、*C. albicans*による病原性を抑えることを予想するものです。今後、入れ歯や歯茎にフロリジンを含むお薬を塗布することによって症状を緩和することが可能になるかもしれません。

研究成果の概要(英文)：Phloridzin is an apple polyphenol. Phloridzin is an SGLT2 inhibitor, and it was developed for use in clinical practice as an oral hypoglycemic agent. A recent report suggested that phloretin, a product of the phloridzin metabolism, ameliorates colon inflammation by regulating the gut microbiota in mice with ulcerative colitis. In this study, we examined the influence of phloridzin on the biofilm formation of *Candida albicans*, which is relevant to denture stomatitis and periodontitis. I found that phloridzin from an apple, prevented *C. albicans* biofilm formation without affecting its growth.

研究分野：歯科保存学分野

キーワード：歯周病 カンジダ バイオフィルム

1. 研究開始当初の背景

「糖尿病治療ガイド 2012-2013 (日本糖尿病学会)」によると(1) 歯周病は糖尿病の重大な合併症の一つである(2) 糖尿病患者では歯周病が重症化する(3) 歯周病が重症であるほど血糖コントロールは不良となる。さらには(4) 歯周病治療によって歯周組織の慢性炎症が改善すると、インスリン抵抗性が軽減し、血糖コントロール状態も改善することが報告されていると記載されている(図1)。

インクレチンは腸管由来のインスリン分泌刺激因子であり、主として glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide (GLP-1) があり、それぞれ十二指腸に存在する K 細胞と下部小腸や大腸に存在する L 細胞から分泌される。インクレチンは食事摂取により分泌が促進され、膵臓細胞に作用しインスリンの分泌を促進する。また、インクレチンは血中や細胞膜上の dipeptidyl peptide-4 (DPP-IV, CD26) によって速やかに分解される。インクレチン関連薬は、「血糖値が上昇した時にだけインスリンの分泌を促進する」という、従来にない新しい概念を有した経口糖尿病治療薬として市場に 2009 年に登場した。それからわずか 1 年半程の間に、糖尿病治療の管理下にある約 900 万人の糖尿病患者のうち、約 200 万人にこのインクレチン関連薬が投与されている(治療 94, 941, 2012)。

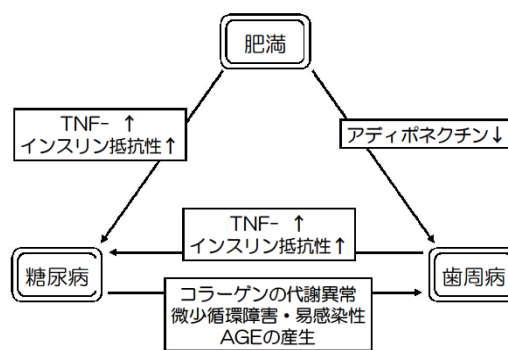


図1 歯周病、糖尿病と肥満が相互に及ぼす影響

インクレチン関連薬は、「血糖値が上昇した時にだけインスリンの分泌を促進する」という、従来にない新しい概念を有した経口糖尿病治療薬として市場に 2009 年に登場した。それからわずか 1 年半程の間に、糖尿病治療の管理下にある約 900 万人の糖尿病患者のうち、約 200 万人にこのインクレチン関連薬が投与されている(治療 94, 941, 2012)。本報告を行っている時点では、経口糖尿病治療薬による治療を受けている患者の約 7 割(約 300 万人)がこのインクレチン関連薬を投与されている(第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2017)。これは、インクレチン関連薬が、(1) 血糖依存的に細胞からインスリン分泌を促進する(2) 細胞における抗アポトーシス作用を有する(3) 低血糖リスクが小さい(4) 体重増加をきたしにくい(5) 膵臓細胞におけるグルカゴン分泌の促進が期待される、というような特徴を有しており、インスリン分泌が障害されやすい日本人の糖尿病治療において不可欠となっているためである。これらの作用は、他のインスリン分泌促進薬であるスルホニル尿素薬やグリニド薬とは異なるものである。

現在、次の 2 種類のインクレチン関連薬が臨床に用いられている。(1) DPP-IV 阻害薬: まず、DPP-IV の選択的阻害により生体内のインクレチンの不活性化を遅らせる。これにより血中の活性型 GLP-1 濃度および活性型 GIP 濃度を高め、インスリン分泌を促進することによって血糖降下作用を発揮する。(2) GLP-1 受容体作動薬: 膵臓細胞膜上の GLP-1 受容体に結合しインスリン分泌を促進する。通常、生体内の GLP-1 は DPP-IV により血中半減期が 1 - 2 分と速やかに分解されるが、治療に用いられている GLP-1 作動薬は DPP-IV による分解に抵抗するように改変されているため、半減期が長いという特徴がある。またインクレチンには膵臓細胞に対するインスリン分泌の促進以外の作用、すなわち、以下のような膵外作用を有している。(1) 中枢神経系に対する作用: 食欲の減退、記憶力の改善、糖尿病性多発神経障害の改善(2) 心血管

系に対する作用：抗動脈硬化作用、最近の大規模臨床研究において、GLP-1 受容体作動薬が心血管疾患を有意に抑制することが示された（3）消化器系に対する作用：胃運動の抑制、肝臓の糖新生の抑制（4）骨格筋系に対する作用：インスリン感受性の向上（5）腎・泌尿器系に対する作用：腎保護作用。

一方、口腔疾患と経口糖尿病治療薬との関連については、培養脂肪細胞においてチアゾリジン系糖尿病治療薬であるピオグリタゾン、*Porphyromonas gingivalis* の内毒素が誘導するインターロイキン-6 を抑制すること（J Dent Res 84, 240-244, 2005）、また、ラット歯周病モデル系においてピグアナイド系糖尿病治療薬であるメトホルミンが歯槽骨の吸収を抑制すること（J Periodontol 81, 412-419, 2010）などが報告されているが、新規の糖尿病治療薬であるインクレチン関連薬においては *in vitro* および *in vivo* において報告例がなかった。

研究開始当初はインクレチン関連薬について解析を行っていたが、同じく経口糖尿病治療薬として用いられている sodium-dependent glucose transporter (SGLT)-2 阻害における *Candida albicans* の増殖とバイオフィルム形成に対する作用について興味深い結果を得た。

SGLT-2 阻害薬は、「腎臓でのブドウ糖の再吸収を抑えて、尿から糖を出すことで血糖値を下げる」（糖尿病治療ガイド 2012-2013）というこれまでにない新しい概念を有した経口糖尿病治療薬として市場に 2014 年に登場した。もともとリンゴ果皮から抽出されたフロリジンが血糖低下作用を示すことから開発が進められた、最も新しい経口糖尿病治療薬である。腎臓では腎糸球体において過剰されたブドウ糖は、近位尿細管においてブドウ糖を再吸収する輸送担体である SGLT-2 を介して 100%再吸収される（図 2A）。SGLT-2 阻害薬は尿中へのブドウ糖の排泄を促進することにより血糖低下作用（図 2B）を示すが、そればかりでなく心血管イベントの抑制や末期腎不全への移行を遅らせるなどの腎保護作用も報告されており、現在、2 型糖尿病患者に対する薬物治療において重要な役割を担っている。

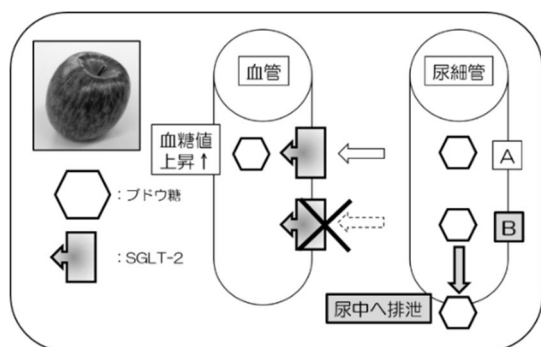


図2 A：SGLT-2を介して、尿中のブドウ糖は再吸収される。
B：SGLT-2の作用が阻害されると尿中へブドウ糖が排泄され、血糖値は低下する。

すなわち、SGLT-2 阻害薬はブドウ糖の尿中への排泄の促進のみならず、血中の高血糖状態を回避することによる糖毒性の解除をもたらす、歯周組織の炎症状態の改善やそこに存在する口腔細菌叢へ影響を及ぼす可能性が考えられる。

最近、SGLT-2 阻害薬のリード化合物であるフロリジンの代謝産物であるフロレチンが、腸内細菌叢を調節することにより、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて症状の改善をもたらすこと

が報告された (Pharmacol Res. 150, 2019)。このことは SGLT-2 阻害薬が口腔内細菌叢に対しても影響を及ぼすことを強く示唆する。しかしながら、SGLT-2 阻害薬による歯周病原性細菌に対する影響や辺縁歯周組織構成細胞との共培養系における影響についての報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

本研究では、*C. albicans* の増殖とバイオフィーム形成に SGLT-2 阻害薬がどのような変化をもたらすかについて解析した。すなわち、*C. albicans* の病原性に対する SGLT-2 阻害薬の影響を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

C. albicans JCM1537 株を YBD 培地に播種し 37 °C で 16 時間の培養を行った。その菌液を新しい培地 (YPD 培地あるいは 2%FBS/2%グルコース含有 RPMI1640 培地) に添加してさらに培養を行った。細菌数の測定：血球計算盤による測定を行った。生菌数の測定：YBD 寒天培地上に播種し生菌数 (CFU/mL) を測定することにより評価した。バイオフィームアッセイ：96 well ポリスチレンプレート表面に形成させたバイオフィームをクリスタルバイオレット法によって染色し OD560nm により測定した。

4. 研究成果

C. albicans の増殖におけるフロリジンの影響を調べるために種々の濃度のフロリジンを含む培地で 3 日間液体培養を行ったところ、*C. albicans* の増殖は 1600 μM のフロリジンの濃度まで影響を受けなかった (図 3)。

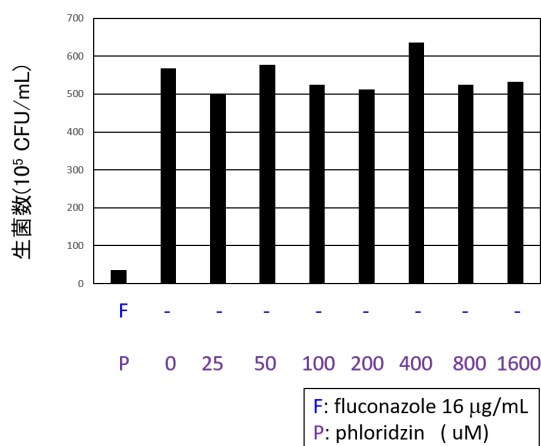


図3 *C. albicans* の増殖に与える phloridzin の影響. *C. albicans* を種々の濃度の phloridzin を含む YBD broth に 3 日間、継代培養。血球計算盤にて菌数を測定の後、40,000 倍に希釈した菌液 (100 μL) を YPD 寒天培地に播種。24 時間後にコロニー数をカウントし生菌数を CFU/mL にて測定。

次に *C. albicans* のバイオフィーム形成におけるフロリジンの影響を調べるために種々の濃度のフロリジンを含む培地で 3 日間液体培養を行ったところ、フロリジン (200 μM) は *C. albicans* のバイオフィーム形成を 47.1% の抑制を認めた (図 4)。

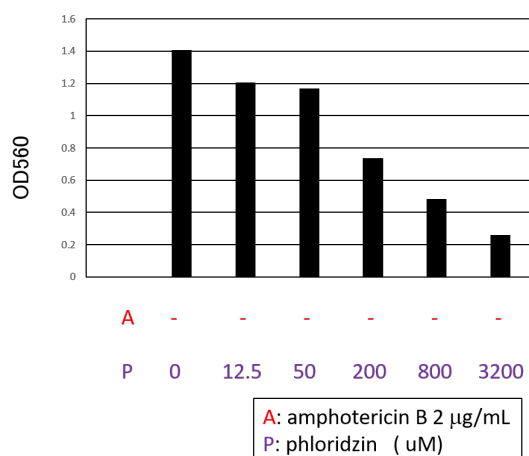
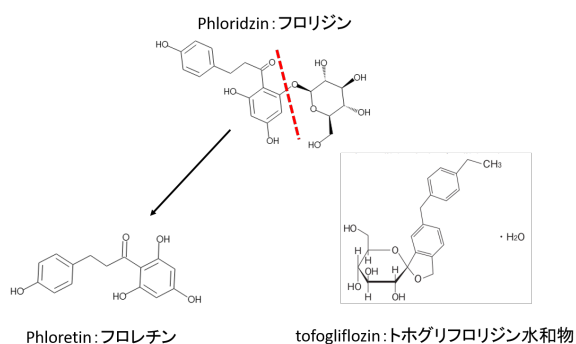


図4 *C. albicans*のバイオフィーム形成に与えるphloridzinの影響。
*C. albicans*を種々の濃度のphloridzinを含むYBD brothに3日間、継代培養。血球計算盤にて菌数を測定し、96 well plateに 5×10^2 個の*C. albicans*を播種。種々の濃度のphloridzinを含む培地 (2% glucose/2% FBS/RPMI)で2日間培養。1 X PBS(-)にて洗浄後、0.1%クリスタルバイオレットで染色。形成されたバイオフィームをOD560nmで測定。

フロリジンは腸内細菌によりフロレチンに変わるため SGLT-2 作用を失ってしまうが、経口投与された SGLT-2 阻害薬は腸管内での代謝を免れるため腸管で吸収された後に尿中へのグルコース排泄作用を示す (図5)。



経口投与されたフロリジンは腸管内で(上図の)右側のグルコースが切断(赤い破線)されるためSGLT-2阻害作用を失ってしまいます。

経口投与されても分解されず腸管で吸収された後、腎臓にてろ過、腎尿細管細胞の尿細管側に存在するSGLT-2に結合し、グルコースの再吸収を抑制する作用を持ちます

図5 フロリジンの代謝経路

今回、以下の結果を得た。(1) フロリジンは *C. albicans* のバイオフィーム形成作用を抑制しなかった。(2) フロリジンは 12.5 ~ 800 μM の濃度において *C. albicans* の増殖を抑制しなかった。(3) フロリジンによる *C. albicans* のバイオフィーム形成抑制作用は培養時間が 72hr になると認められなかった。以上のことから、フロリジンは *C. albicans* によるバイオフィームの形成を抑制する可能性が示唆された。今後、現在臨床で用いられているトホグリフロリジン等の SGLT-2 阻害剤が *C. albicans* のバイオフィーム形成能にどのような影響を与えるか。また、今回用いた *C. albicans* は標準株であるため、他の臨床分離株においても同様の抑制作用がみとめられるかどうかについて検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 作田哲也、大貝悠一、中田匡宣	4. 巻 76
2. 論文標題 Candida albicans の増殖とバイオフィルム形成に対するフロリジンの影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本細菌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3412/jsb.76.66	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田礼子, 松本祐子, 大戸敬之, 作田哲也, 鎌田ユミ子, 岩下洋一朗, 田口則宏
2. 発表標題 多職種連携に関する用語の認知
3. 学会等名 第13回日本総合歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大戸敬之, 岩下洋一朗, 松本祐子, 作田哲也, 吉田礼子, 田口則宏
2. 発表標題 授業科目「プロフェッショナリズム」が歯学生のプロフェッショナリズム醸成に与える影響
3. 学会等名 第38回日本歯科医学教育学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩下洋一朗, 吉田礼子, 松本祐子, 作田哲也, 中山歩, 大戸敬之, 田口則宏
2. 発表標題 鹿児島大学歯学部におけるアウトカム基盤型教育に基づくeポートフォリオの導入
3. 学会等名 第37回日本歯科医学教育学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小松澤 均 (Komatsuzawa Hitoshi) (90253088)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------