

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K17300

研究課題名（和文）糖尿病関連歯周炎におけるエネルギー監視シグナルの終末糖化産物による修飾

研究課題名（英文）Modification of energy monitoring signals by advanced glycation end products in diabetes-associated periodontitis

研究代表者

石塚 洋一（ISHIZUKA, Yoichi）

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10637664

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病とAGEs蓄積との関連を調べるため、ヒト歯肉上皮由来細胞株Ca9-22およびマウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1を用いて、短期的なAGE-ウシ血清アルブミン（BSA）による細胞増殖・細胞死への影響を評価した。それぞれの細胞株で細胞増殖の抑制傾向を認めただが、細胞死の増加に関して、コントロールBSAとの比較で有意差は認められなかった。また、これらの細胞株に加えて、マウス唾液腺などでAGEsの受容体であるRAGEの発現およびAGEsによる発現誘導があるかについてmRNAおよびタンパク質レベルで調べた。歯周組織に対するAGEsの作用は、受容体を介した機序を経ないものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は糖尿病の合併症の1つであるが、この2つの疾病の間の相互関係や因果関係についてはいまだに解明されていない。近年、この病態に慢性的な高血糖によるタンパク質の糖化反応で生じる終末糖化産物（AGEs）の蓄積が関与していることが示唆されている。

歯周組織のAGEs蓄積の非侵襲的な評価法を確立するため、研究者および研究協力者の唾液を用いて試験的研究を行った。ELISA法により、唾液中にAGEsが含まれていることがわかった。また、唾液中のどのタンパク質が糖化されているかを検討したが、明確な結果を得られなかった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the association between periodontal disease and AGEs accumulation, the effects of short-term AGE-bovine serum albumin (BSA) on cell proliferation and cell death were evaluated in the human gingival epithelium-derived cell line Ca9-22 and the mouse osteoblast-like cell line MC3T3-E1. Each cell line showed a tendency to inhibit cell proliferation, but no significant difference was observed with respect to increased cell death compared to control BSA. In addition to these cell lines, the expression of RAGE, the receptor for AGEs, and whether it is induced by AGEs in mouse salivary glands and other organs was examined at mRNA and protein levels. The effects of AGEs on periodontal tissues did not appear to be via a receptor-mediated mechanism.

研究分野：予防歯科学

キーワード：糖尿病関連歯周炎 終末糖化産物 RAGE AMP活性プロテインキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の合併症の1つに歯周病がある。しかし、この2つの疾病の間の相互関係や因果関係についてはいまだに解明されていない。慢性的な高血糖によって生成される終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGEs) とその受容体である RAGE (receptor for AGEs) が糖尿病患者における歯周病を含む各所の慢性的な炎症に重要な役割を演じていることが示唆され注目されている。

ヒトはグルコースを主なエネルギー源として生命活動を行っているため、常に一定の血糖値を維持している。タンパク質は生体を構成する主要な高分子であり、様々な生命活動の実行分子として機能している。このため、カルボニル基を有するグルコースなどの還元糖とタンパク質などがもつアミノ基との間に生じる糖化反応の影響を避けることができない。糖化反応は非酵素反応で、 Schiff 塩基形成を経てアマドリ化合物が生成する前期反応と、アマドリ化合物が酸化・脱水・縮合などの反応を経て AGEs が生成する後期反応の2段階からなる。生体内では、糖尿病のように血糖値の高い状態が続く疾患だけでなく、正常な血糖値であっても、加齢に伴って様々なタンパク質の糖化反応が進行する。臨床検査では、過去の平均血糖値のモニタリングを目的に HbA1c などのアマドリ化合物の測定法が確立されてきた。一方、AGEs は、1) タンパク質の構造や機能を変えることによって生体に障害を与えること、2) RAGE などの受容体によって認識され、受容体を介した病態の惹起に関与すること、3) AGEs 生成阻害剤が糖尿病性腎症や網膜症の発症を遅延させることから、創薬の分子標的になり得ることなどの点で慢性的な炎症性疾患との関連が注目されている。

RAGE は免疫グロブリン受容体ファミリーのメンバーで、2型糖尿病患者の歯肉組織に発現していることが明らかになり、その後、歯周病における RAGE の役割について多くの興味向けられた。しかし、RAGE には、AGEs に加えてアルツハイマー病に関与するアミロイド、がんの転移や炎症に関与する HMGB-1/アンホテリン、炎症メディエーターである S100 などがリガンドとして結合することもあり、歯周病と AGEs の関連はいまだに解明されていない。しかし、RAGE リガンドの蓄積と RAGE の発現量には相関があり、病巣での AGEs の蓄積は RAGE の発現を増強する。この正のフィードバックが炎症の遷延化に深く関わっていると考えられている。

細胞内アデニンヌクレオチドはアデニル酸キナーゼによって平衡状態にあり、ATP の減少は AMP の大幅な増加としてシグナルが伝達される。この増幅された AMP シグナルによって AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) が活性化されると、ATP の消費が抑制される一方で産生が促進され、それによって細胞の生死が分けられる。糖尿病では、AMPK の活性が抑制されていることが多く、AMPK の活性化は慢性炎症やがんの増殖・転移などの抑制に有効である。また、AMPK のシグナル伝達系は、RAGE の下流との共通性も多く、経口糖尿病治療薬のメトフォルミンは AMPK 活性化剤としても知られ、同時に糖化反応阻害剤としても働くことが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では糖尿病モデル動物や歯根膜細胞、歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞を用いて、AGEs の蓄積と歯周病との関連について、「AGEs そのものの細胞に対する作用なのか」、「RAGE を介しての作用なのか」、「AMPK とのクロストークが存在するのか」を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

AGEs が歯周組織に及ぼす影響について、次の5つについて明らかにする。

- (1) 高血糖により生成される AGEs は歯周組織のどの部位で著しいのか。
- (2) 同様に、RAGE の発現量はどうなっているのか。
研究代表者がこれまでに血中 AGEs 濃度や RAGE 発現量の上昇が認められている血管内皮細胞などを対象として、1型糖尿病モデル (ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウス)、2型糖尿病モデル (db マウス) の歯周組織における AGEs 蓄積と RAGE 発現量を解析したところ、蓄積傾向が認められた。2つのタイプの糖尿病において血糖値の上昇後、定期的に歯周組織の組織片中の AGEs 蓄積量を抗 AGEs 抗体を用いて検出し、組織の変化とともに評価する。同時に、血清中の AGEs および HbA1c などのアマドリ化合物やジカルボニル化合物の検出も行い比較する。また、RAGE 発現量については抗 RAGE 抗体や定量 RT-PCR 法を用いてその相関を明らかにする。
将来的な臨床応用には、非侵襲的な AGEs 蓄積の評価法を確立する必要がある。唾液は様々なバイオマーカーを含んでおり、口腔粘膜も口腔内の環境を表す指標となり得る。そこで、唾液および綿棒で採取した口腔粘膜細胞を試料として、抗 AGEs 抗体を用いた ELISA 法などによる検出法、AGEs のもつ自家蛍光を利用した光学的検出法を試みる。
- (3) AGEs の影響は AGEs そのものの作用なのか、それとも RAGE を介して起こるのか。
 - A. AGEs、アマドリ化合物として糖化したアルブミン、ジカルボニル化合物が培養歯根膜細胞の増殖に及ぼす影響の解析
 - A.1 WST 法による細胞増殖に及ぼす作用についての検討
 - A.2 増殖抑制効果があった場合は、細胞周期およびカスパーゼ3活性の確認

- B. 培養歯根膜細胞のサイトカイン産生およびコラーゲン架橋に及ぼす影響の解析
- B.1 ELISA 法による炎症性サイトカイン産生の有無の検討
炎症性サイトカイン産生の亢進が認められなくても、以下を試みる。
- B.2 組織破壊性のプロテアーゼ (MMP など) の検出
- B.3 HPLC による AGEs ペントシジン架橋 (非生理的架橋) の検出
- C. 下流分子およびデコイ受容体や他のリガンドを用いて AGEs-RAGE 特異的シグナルの関与を解析
RAGE はアダプタータンパク質に mDia1 (アクチン重合核形成タンパク質ファミリー) をもち、正のフィードバックにも関与する転写因子 NF- κ B が下流に存在する。
- C.1 mDia1 および NF- κ B の活性化のウエスタンブロットによる検出
- C.2 定量 RT-PCR による RAGE 転写亢進の解析
- D. リガンド結合部位のみをもつ可溶性 RAGE および AGEs 以外 (アミロイド、S100、HMGB-1/アンホテリン) の RAGE リガンドについて解析
- D.1 AGEs と同時に可溶性 RAGE を加えた解析 D.2 AGEs 以外のリガンドを加えた解析
- (4) AMPK 活性化あるいは不活性化は AGEs の作用に影響を及ぼすのか。
- (5) その影響は AMPK と RAGE との間のクロストークによるのか。
AMPK 活性化剤 / 阻害剤を用いて AGEs の作用への影響を解析する。また、ゲノム編集により AMPK / RAGE のノックアウト歯根膜細胞を作製し、これまでの解析結果を再確認する。AMPK ノックアウトマウスにストレプトゾトシンで糖尿病を誘発したときの AGEs の効果を全身的に調査していく。

4. 研究成果

歯周病と AGEs 蓄積との関連を調べるため、ヒト歯肉上皮由来細胞株 Ca9-22 およびマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いて、短期的な AGE-ウシ血清アルブミン (BSA) による細胞増殖・細胞死への影響を評価した。それぞれの細胞株で細胞増殖の抑制傾向を認めたが、細胞死の増加に関して、コントロール BSA との比較で有意差は認められなかった。また、これらの細胞株に加えて、マウス唾液腺などで AGEs の受容体である RAGE の発現および AGEs による発現誘導があるかについて mRNA およびタンパク質レベルで調べた。いずれもその発現は、(これまでの研究で最も発現量が高いことが知られている) 肺での発現と比較するとほとんど認められないレベルであった。したがって、歯周組織に対する AGEs の作用は、受容体を介した機序を経ないものと考えられる。

歯周組織の AGEs 蓄積の非侵襲的な評価法を確立するため、研究者および研究協力者の唾液を用いて試験的研究を行った。ELISA 法により、唾液中に AGEs が含まれていることがわかった。また、唾液中のどのタンパク質が糖化されているかを検討したが、明確な結果を得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------