

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06288・19K21377

研究課題名(和文) 糖尿病モデル動物の歯周組織に抗酸化剤が与える効果

研究課題名(英文) Effects of antioxidants on periodontal tissue of diabetic model animals

研究代表者

城戸 大輔(Kido, Daisuke)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40822549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病モデルラットに抗酸化剤を投与することで酸化ストレスを抑制し、糖尿病による組織傷害発現を抑制することによって酸化ストレスが歯周組織の創傷治癒に与える影響を検討した。糖尿病モデルラットから単離した歯肉線維芽細胞を使用したin vitro実験において、高血糖状態を再現した培養液に抗酸化剤を添加することで酸化ストレスが低下し、またそれによってインスリン抵抗性が改善した。さらには細胞増殖能および細胞遊走能が改善することが示された。糖尿病モデルラットを使用したin vivo実験においては、投与する抗酸化剤の種類や期間による創傷治癒への影響については今後さらに検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、糖尿病モデルラットに抗酸化剤を投与し、糖尿病による高血糖が引き起こす傷害発現を抑制することによって酸化ストレスが歯周組織に与える影響について明らかにすることである。本研究は、糖尿病モデルラットの口蓋に創傷を作製し、その治癒状況を検討するin vivo実験、および動物組織より単離した歯肉線維芽細胞を使用し増殖能やインスリン抵抗性を検討するin vitro実験により構成し、当該仮説の可否を検討するものである。本研究によってもたらされる結果は、糖尿病による創傷治癒遅延のメカニズム解明の糸口となることが見込まれる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the mechanisms of impaired gingival wound healing via oxidative stress. To clarify the oxidative stress, gingival fibroblasts of diabetic and control rats were cultured underwent N-acetyl-L-cysteine(NAC) treatment. Cell proliferation and migration, which was declined by high glucose state prior to NAC treatment. Administration of NAC to cells of control rats and diabetic rats in the media significantly elevated cell proliferation and migration in cells of diabetic rats. Further investigations of effect and it's mechanisms of antioxidant in periodontal tissue are needed to clarify the relationship between diabetes and periodontal disease and to develop a therapeutic approach for diabetic patients with periodontitis.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 糖尿病

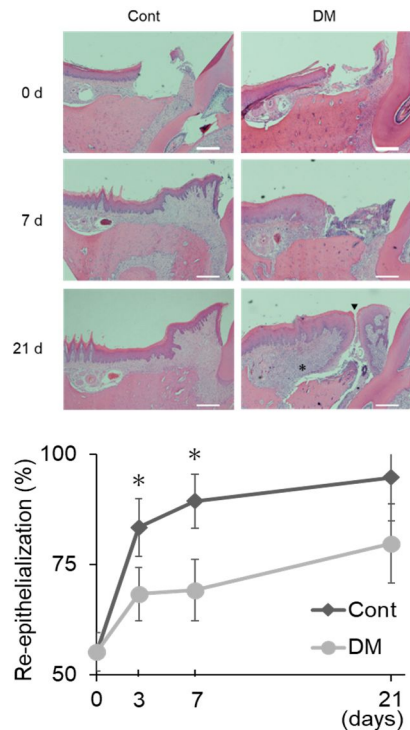
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の学術的背景として、予てより指摘される糖尿病と歯周病の相互関係性が挙げられる。細菌感染症たる歯周炎と、代謝疾患たる糖尿病の相互関係については多くの研究がなされており、近年では、好中球の機能不全、コラーゲン合成阻害、微小循環障害、線維芽細胞機能不全、最終糖化産物による組織破壊への関与や酸化ストレスによる影響などが報告されているが未だ詳細は不明である。本研究者は、糖尿病と歯周組織の関連に関する研究を行い、高血糖状態において増大する酸化ストレスを介してインスリン抵抗性が歯周組織に発生することを示してきた。生活習慣病たる糖尿病の治療には日々の食生活のコントロールが不可欠であり、早期の口腔内環境の改善は急務と考えられる。血糖コントロールが不十分な状況下での歯周病管理の重要性を認識することから、糖尿病患者における歯周組織への抗酸化剤の応用が検討された。

本研究者は、糖尿病と歯周病の関係性の解明において、糖尿病の特徴たる持続する高血糖状態の引き起こす酸化ストレスによって糖尿病の合併症が引き起こされることに着目し、血糖状態が引き起こす酸化ストレスによって歯周組織にインスリン抵抗性が発現し歯肉線維芽細胞の機能不全が起こり歯肉の創傷治癒が遅延することを示した(Kido, 2017、右図)。

本研究の解明すべき学術的「問い」は、高血糖に長期間曝露された歯周組織は、酸化ストレスによって傷害されるものであるのか、というものである。酸化ストレスは、脂質酸化、タンパク変性、DNA 損傷などに身体に悪影響を及ぼすことは広く知られるところであるがその詳細な機序は明らかにされていない。その一方で酸化ストレスに拮抗する抗酸化剤については、Paul Talalay らによる研究等、少数が行われているに過ぎず今後も解明が必要と考えられる。抗酸化剤を使用した *in vitro*、*in vivo* の両者を用いて解析している研究はなく新規性は著しいと考えられる。本研究は、高血糖状態において歯周組織に起こる傷害と酸化ストレスの関係を示しその理解の一助となると考えられる。



### 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病モデル動物の歯周組織において酸化ストレスによる影響を *in vitro*、*in vivo* で示し、最終的には糖尿病患者の歯科治療時における補助療法として抗酸化剤の実効性を明らかにすることである。

本研究の学術的独自性として以下の点が上げられる。

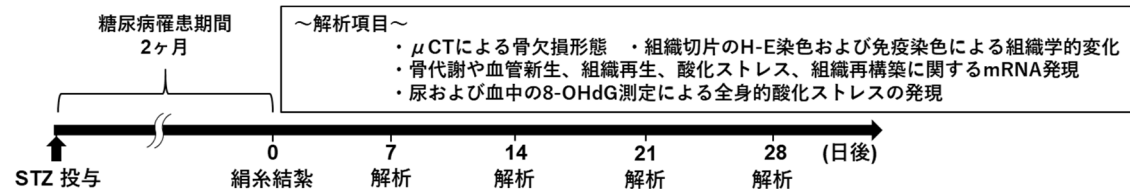
(1) 従来の研究では、単に酸化ストレスによる歯周組織への影響を検討しているが、申請者の研究では検討を行った動物の歯肉から線維芽細胞、血管内皮細胞、歯根膜線維芽細胞抽出し、それぞれの組織、細胞種において個別に検討を行う。

(2) 糖尿病モデル動物において、抗酸化剤の歯周組織への影響を検討した研究はこれまでほとんどなされていないが、本研究では *in vivo*、*in vitro* 両面から詳細に検討を行う。

本研究の創造性は、糖尿病の罹患によって悪化や重症化する歯周病に対しての予防的治療への応用が期待できる点である。

### 3. 研究の方法

#### <in vivo 実験>



5 週齢雄性ラット (Slc:Wistar) に 12 時間の絶食後、ストレプトゾトシンを 60 mg/kg にて腹腔内投与し糖尿病を誘発させる。糖尿病誘発 2 ヶ月後に、コントロール群、糖尿病それぞれ上顎左右側臼歯歯頸部に絹糸を結紮する。

結紮 2 週間後にラットを安楽殺し、 $\mu$ CT にて骨欠損形態、骨塩量を定量する。また骨欠損部については、組織切片を作成し、H-E 染色、マッソントリクローム染色、免疫染色による評価を行う。さらに、歯周炎部の肉芽組織より mRNA を抽出し、Runt-related transcription factor 2 (Runx2)、Osterix、Collagen type I、Alkaline phosphatase (Alp)、Fibroblast growth factor (FGF-2)、Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Endothelial nitric oxide synthase

(e-NOS)などの発現の検討を行う。また糖尿病を誘発させたラットの一部には、抗酸化剤であるN-acetylcysteine (NAC)を経口投与し、抗酸化剤の投与による血中および尿中の酸化ストレスレベルの変化を8-Hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)にて測定する。また、同様に創傷を作製することで抗酸化剤の投与による創傷治癒への影響を検討する。

#### <in vitro 実験>

ラットより単離した歯肉線維芽細胞をそれぞれ高血糖状態を再現した培養液および通常培養液で培養する。各細胞群において、細胞増殖能、インスリン抵抗性、酸化ストレスの評価を行う。また糖尿病を誘発させたラットから単離した歯肉線維芽細胞については、培養液中に抗酸化剤NACを添加することで、抗酸化剤の投与による細胞増殖能、インスリン抵抗性、酸化ストレスへの影響を検討する。

#### 4. 研究成果

糖尿病モデルラットから単離した歯肉線維芽細胞を培養液中のグルコース濃度を通常としたもの、および高血糖状態を再現したものを使用した *in vitro* 実験において、抗酸化剤であるNACを、高血糖状態を再現した培養液に添加することで歯肉線維芽細胞における酸化ストレスが改善した。またそれによってインスリン抵抗性が改善し、さらには細胞増殖能および細胞遊走能が改善することが示された。糖尿病モデルラットでの *in vivo* 実験においては、投与する抗酸化剤の種類や期間によって創傷治癒の改善がどのように変化するのか、また抗酸化剤の種類によって効果発現に差違が発生するその機序について今後さらに検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Daisuke Kido, Koji Mizutani, Yuichi Izumi, Hiroshi Nitta
2. 発表標題 Insulin resistance improvement with periodontal treatment in type - 2 diabetic patients with localized, severe chronic periodontitis
3. 学会等名 105th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Risako Mikami, Koji Mizutani, Takanori Matsuura, Daisuke Kido, Yoshiyuki Sasaki, Takanori Iwata
2. 発表標題 The impact of diabetes on periodontal parameters in Japanese hemodialysis patients: A cross-sectional study
3. 学会等名 105th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Takeda, Koji Mizutani, Takanori Matsuura, Daisuke Kido, Risako Mikami, Masahiro Noda, Prima Buranasin, Yoshiyuki Sasaki, Yuichi Izumi, Takanori Iwata
2. 発表標題 Periodontal regenerative effect of enamel matrix derivative in diabetes
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----