

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06327・19K21411

研究課題名(和文)カルプロテクチン誘導性炎症関連因子の産生に及ぼす高グルコースの影響

研究課題名(英文) Effects of high glucose on production of calprotectin-induced inflammation related molecules in human gingival fibroblasts.

研究代表者

西川 泰史 (NISHIKAWA, Yasufumi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10823833

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)：カルプロテクチンは、ヒト歯肉線維芽細胞における炎症関連因子の発現を亢進させる。このことは、歯周組織での炎症反応を誘発させ、歯周炎を進行させると考えられている。歯周炎は、様々な全身性疾患と関連性があることが報告されている。特に、糖尿病患者は、重度歯周炎を発症しやすいことが知られているが、両疾患の関連性に関しては不明な点が多い。本研究では、高グルコース条件下で培養したヒト歯肉線維芽細胞にカルプロテクチンを刺激添加することで糖尿病関連歯周炎の発症機序を明らかにすることとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者の歯周病は、進行しやすく治癒しにくいことが知られており、糖尿病関連歯周炎と呼ばれる。しかしながら、両疾患の関係性については、不明な点が多い。研究代表者の研究室では、過去にカルプロテクチンという分子が、糖尿病患者の歯周ポケット(歯と歯茎の溝)に多く検出されることを明らかにした。歯茎を構成している歯肉線維芽細胞を糖尿病患者の歯周組織を模倣した高グルコース条件下で培養し、培養液中にカルプロテクチンを添加することで糖尿病関連歯周炎の発症機序を明らかにすることとした。

研究成果の概要(英文)：Calprotectin is considered as a contributor of periodontitis progression by demonstrating that its higher level at inflamed periodontal sites and that calprotectin up-regulates various inflammation related molecules in human gingival fibroblasts (HGFs). Periodontitis greatly affects the course and pathogenesis of a number of systemic diseases. Especially, diabetic patients are susceptible to severe periodontitis, however, the causal relationship between these diseases has not yet fully understood. The aim of this study was to clarify the pathogenic mechanism of diabetes-related periodontitis using calprotectin-treated HGFs culture system under the high-glucose condition.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 糖尿病 カルプロテクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病と歯周病は、国民病と言われ、両疾患は、互いに悪影響を及ぼし合っていることが知られている。糖尿病患者に発症した歯周病は、重症化しやすいことが報告されているが、その病態形成は不明な点が多い。研究代表者の研究室では、カルプロテクチンという分子が糖尿病患者の歯肉溝滲出液中に有意に高く検出されることを明らかにし、新たな歯周病の診断マーカーとしての有用性を示唆した。さらにカルプロテクチンは、ヒト歯肉線維芽細胞において炎症関連因子の発現を亢進することを見出した。しかしながら、糖尿病関連歯周炎の病態形成の解明は、重要な課題であるが不明点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、カルプロテクチンをターゲット分子とし、高グルコース状態で培養した歯肉線維芽細胞における細胞反応やその反応機序を明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞

歯肉線維芽細胞は、CRL-2014™(ATCC)を用いた。培地は、ウシ胎児血清を10%の割合で含むDMEM(5.5mM glucose[normal glucose, NG]および25mM glucose[high glucose, HG])を用い、浸透圧対照としてマンニトールを用いた。

#### (2)試薬

カルプロテクチンは、kwonらの記載(Kwon *et al.*, Mol Cells, 2013)を参考にリコンビナントS100A8, S100A9(ATGen)を用いて調整した。

#### (3)HGによる細胞障害作用の検討

細胞障害作用は、通法に従いMTT assayによる細胞増殖活性を指標にして検討した。

#### (4)炎症関連因子産生の検討

NG, HG条件で培養し、カルプロテクチンで30分刺激した後、全細胞蛋白を回収し、BioRad社のWestern Blotting kitを用いてNF- $\kappa$ Bのリン酸化活性を調べた。なおマンニトールを浸透圧対照として用いた。また、同様の条件でカルプロテクチンを24時間刺激した後の培養上清を回収し、pro-MMP-1, TIMP-1及びMCP-1の産生性を市販の各種ELISAキットを用いて測定した。さらにMMP-1産生におけるNF- $\kappa$ B経路の関与はBay11-70821を用いて検討した。

#### (5)統計解析

統計解析は、統計解析ソフトSPSSを用いて行い、P値が0.05未満を有意差ありと判定した。

### 4. 研究成果

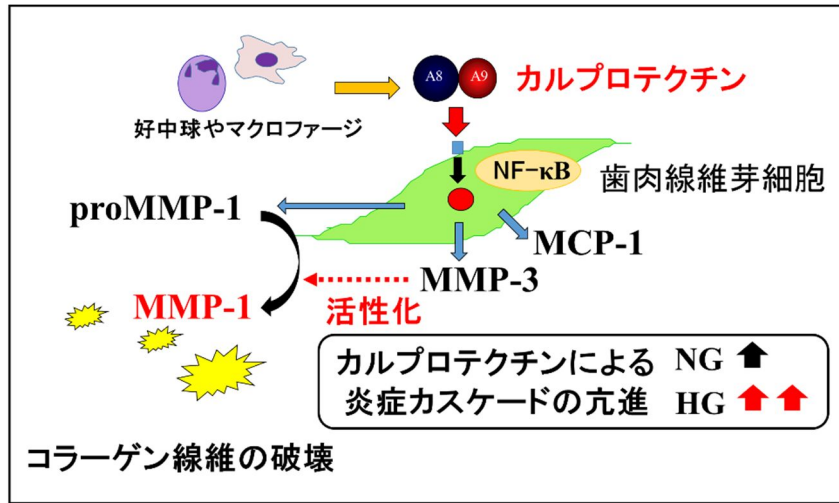
(1)各々の培養系における細胞増殖活性に有意差は認められなかった。(ANOVA TukeyHSD)

(2)カルプロテクチンは、NG条件下で培養するとpro-MMP-1, TIMP-1及びMCP-1の産生を有意に誘導した。またHG条件下でカルプロテクチンによるMMP-1及びMCP-1の産生は、NG条件下と比較して有意に亢進した。(ANOVA TukeyHSD)

(3)カルプロテクチン刺激により、ヒト歯肉線維芽細胞のNF- $\kappa$ B経路のリン酸化の亢進を認められた。またHG条件下で培養するとNG条件下と比較して有意にリン酸化の亢進を認められた。

(4)Bay11-70821によってNF- $\kappa$ B経路を阻害するとカルプロテクチンによるpro-MMP-1の産生は有意に抑制された。

これらの結果から、カルプロテクチンは、ヒト歯肉線維芽細胞のMMP-1, TIMP-1及びMCP-1の産生を誘導し、さらにHG条件群では、MMP-1とMCP-1の産生性が有意に亢進された。それに相応してNF- $\kappa$ B経路でリン酸化の亢進が認められた。このことは、糖尿病患者の歯周病重症化機序において、カルプロテクチンによる炎症カスケードの亢進が重要な役割を果たすことを示唆するものである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西川泰史、成石浩司、木戸淳一、湯本浩通
2. 発表標題 Diabetic High-Glucose Condition Enhances Calprotectin-induced Inflammatory Responses In Gingival Fibroblasts
3. 学会等名 国際歯科学会（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
--	---------------------------	-----------------------	----