

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09901

研究課題名(和文) 糖尿病での歯周病の進行・難治化における終末糖化産物の関与を調べる基礎研究

研究課題名(英文) Basic research to investigate the involvement of advanced glycation endproducts in the progression and exacerbate of periodontal disease in diabetes mellitus

研究代表者

田邊 奈津子 (TANABE, Natsuko)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10409097

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)：終末糖化産物(AGEs)はタンパク質のアミノ酸と還元糖(グルコースなど)との間で起こるメイラード反応によって生成され、食品だけでなく生体内でも生成され蓄積される。AGEsは生理活性を示し、さまざまな生活習慣病の発症・進展に関わっていることが近年報告されている。そこで本研究は、AGEs生成と関連が深い糖尿病と歯周病との関係に着目し、糖尿病によって血中濃度が上昇し蓄積したAGEsが糖尿病罹患した患者の歯周病の増悪・難治化に影響を与えている要因の1つではないかと考え本研究を企図した。その結果、AGEsは、歯周病原菌であるグラム陰性菌の内毒素LPSが促進させた炎症をさらに増悪させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、AGEsが骨芽細胞でLPSによって誘導された炎症を増悪することをIL-1 $\alpha$ 、プロスタグランジンE2ならびにS100A9などの炎症性メディエーター発現の促進と促進するための分子制御機構の1つを明らかにした。これらの本研究成果は、高血糖状態によって生成されたAGEsが、歯周病での歯槽骨吸収の原因の1つであるLPSによる炎症を増悪させること、さらにその機構が明らかとなることによって、将来的に歯周病の治療や予防へ役立つ一考になると考える。

研究成果の概要(英文)：AGEs are generated by the Maillard reaction between amino acids of proteins and reducing sugars such as glucose. They are produced and accumulated not only in foods but also in living organisms. In this study, we focused on the relationship between diabetes and periodontal disease, which is closely related to the generation of AGEs. We hypothesized that AGEs accumulated in the blood due to diabetes may be one of the factors affecting the exacerbation and refractoriness of periodontal disease in diabetic patients. The results showed that AGEs further exacerbate the inflammation promoted by the endotoxin LPS of Gram-negative bacteria, which are periodontal pathogens.

研究分野：口腔生化学

キーワード：終末糖化産物 骨芽細胞 炎症性メディエーター

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

終末糖化産物 (advanced glycation end-products, AGEs) はタンパク質のアミノ酸と還元糖 (グルコースなど) との間で起こるメイラード反応によって生成され、食品だけでなく生体内でも生成され蓄積される。AGEs の中でも糖代謝の中間体のグルセルアルデヒドに由来する AGEs の毒性が強く、AGEs 受容体 (RAGE) を介して生理活性を示し、さまざまな生活習慣病の発症・進展に関わっていることが近年報告されている。そこで本研究は、AGEs 生成と関連が深い糖尿病と歯周病との関係に着目し、糖尿病によって血中濃度上昇し蓄積した AGEs が糖尿病罹患した患者の歯周病の増悪・難治化に影響を与えている要因の1つではないかと考え本研究を企図した。

### 2. 研究の目的

具体的には歯周病原菌であるグラム陰性菌の内毒素 LPS によって惹起した歯周組織の炎症メディエーター発現に及ぼす影響を *in vitro* で細胞生物・分子生物学的に検索することで分子メカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

<AGEs の作成法>

①0.1M D1-Glyceraldehyde, 5 mM DTPA, BSA 50 mg/ml を D-PBS に加え、ろ過滅菌する。

②250 rpm, 37°C で7日間、攪拌、反応

③NO.2 のろ紙でろ過

④PD10 で脱塩後タンパク量を定量し、Freeze Dry する。

(1) AGEs が LPS 誘導性骨芽細胞、歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞の炎症性メディエーター産生に及ぼす影響を調べる (細胞生物学的検索)

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。細胞を cell culture plate に播種し、24 時間静置後、*E. coli* 由来の LPS を播種した骨芽細胞に刺激し、14 日間以下に示す条件で培養し、サンプルをそれぞれ回収した。COX2, IL- $\alpha$  および S100A9 の遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を western blotting 法、PGE<sub>2</sub> の発現を ELISA 法で確認した。

<培養条件>

①untreated control

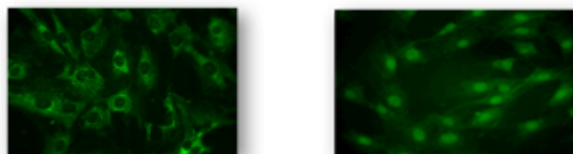
②LPS (100 ng/ml)

③AGEs (100  $\mu$ g/ml)

④AGEs+LPS

(2) AGEs が LPS 誘導性骨芽細胞の炎症性メディエーター産生に関わる分子メカニズムの検索 (分子生物学的検索)

骨芽細胞として、マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。細胞を cell culture plate に播種し、24 時間静置後、*E. coli* 由来の LPS を播種した骨芽細胞に刺激し、14 日間以下に示す条件で培養し、サンプルをそれぞれ回収した。AGEs の受容体 RAGE の阻害剤 FPS-ZM1 と PLC $\gamma$ 1 の阻害剤 U73122 と PLC $\gamma$ 1 の遺伝子配列を含む RNAi プラスミドを用いて、それぞれの細胞に刺激または、遺伝子導入し、方法(1)で示した培養条件で培養し細胞を固定したのち、炎症性サイトカイン産生に関与するシグナル伝達因子 NF- $\kappa$ B の活性化を NF- $\kappa$ B の蛍光免疫染色法で調べた。さらに、LPS と AGEs による炎症性メディエーター発現に関わる下流のシグナル伝達因子を検索するために、PLC $\gamma$ 1 と JNK のリン酸化を western blotting 法で調べた。以下に申請者が以前行った MC3T3-E1 細胞の NF- $\kappa$ B の免疫蛍光染色像を示す (Nagao et al., J Cell Physiol., 2017)。



(核内移行していない NF- $\kappa$ B) (核内移行している NF- $\kappa$ B)

### 4. 研究成果

方法(1)では、炎症性メディエーターとして、PGE<sub>2</sub>, COX2, IL- $\alpha$  および S100A9 発現に及ぼす LPS と AGEs の共刺激の影響を調べた。S100A9 は、S100 ファミリーに属するカルシウム結合タンパクであり、好中球、単球、角化細胞(ケラチノサイト)およびマクロファージの初期分化状態などの多種多様な細胞で発現する。また、S100A9 と S100A8 とのヘテロ二量体であるカルプロテクチンは、炎症時にその発現が上昇することから、急性および慢性炎症における重要な炎症性メディエーターとしての働きを有すると報告されている (Wang et al, Front Immunol. 2018)。さらに、カルプロテクチンは、LPS の受容体 toll-like receptor 4 (TLR4) と糖代謝障害による高血糖で上昇する AGEs 受容体 RAGE の ligand である (Wang et al, Front Immunol. 2018) との報告が

あることから本研究では、PGE<sub>2</sub> と IL- $\alpha$  だけでなく、MC3T3-E1 細胞の S100A9 発現が LPS と AGEs の共刺激に及ぼす影響を調べた。その結果 LPS+AGEs は COX2 および PGE<sub>2</sub> の発現をコントロールと比較して有意に促進した一方、PLC 阻害剤 U73122 添加では LPS と TAGE の共刺激の影響を抑制した (Fig 1)。また、LPS と AGEs の共刺激が IL- $\alpha$  と S100A9 発現に及ぼす影響を調べた結果、LPS+AGEs は IL- $\alpha$  と S100A9 発現をコントロール比較して有意に促進させた一方、U73122 添加では LPS と AGEs の共刺激の影響を抑制した (Fig 2)

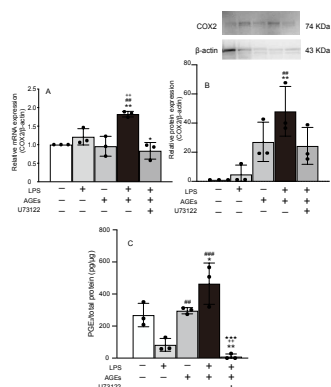


Fig 1

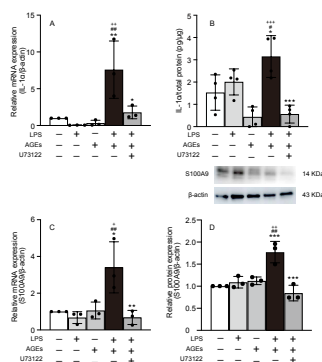


Fig 2

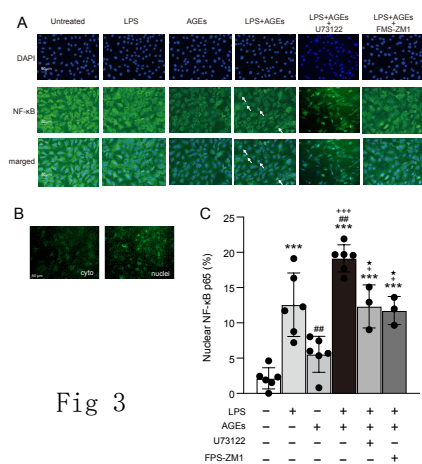


Fig 3

方法(2)の AGEs の NF- $\kappa$ B の活性化に及ぼす影響の検索では、①untreated control, ②LPS (100 ng/ml), ③AGEs (100  $\mu$ g/ml), ④LPS (100 ng/ml)+AGEs (100  $\mu$ g/ml), LPS (100 ng/ml)+AGEs (100  $\mu$ g/ml)+U73122 (10  $\mu$ M) の条件で実験を実施した。その結果、AGEs+LPS は、NF- $\kappa$ B の活性化を促進させる一方で、U73122 を作用させた細胞は、AGEs+LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化の促進は認められなかった。また、RAGE の antagonist である FPS-ZM1 (40  $\mu$ M) で作用させた細胞についても、AGEs+LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化の促進は認められなかった (Fig 3)。さらに、siRNA を用いて PLC  $\gamma$ 1 のノックダウン細胞を作成し、AGEs と LPS の共刺激が si PLC  $\gamma$ 1- NF- $\kappa$ B の活性化に及ぼす影響を調べた結果、si PLC  $\gamma$ 1 細胞は、LPS+AGEs 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化の促進は認められなかった (Fig 4, 5)。さらに LPS+AGEs 刺激は、PLC  $\gamma$ 1 と JNK のリン酸化をコントロールと比較して促進し、U73122 は LPS

と AGEs の共刺激の影響を抑制した。したがって、LPS+AGEs 刺激は、PLC  $\gamma$ 1-JNK を介して NF- $\kappa$ B の活性化を促進することが明らかとなった (Fig 6)。以上の結果から、LPS と AGEs の共刺激は RAGE/ PLC  $\gamma$ 1/JNK 経路を介して NF- $\kappa$ B の活性を促進し、炎症性メディエーター発現を促進することが示唆された。

まとめると、これらの研究成果より、高血糖状態または高血糖状態によって生成された AGEs は、歯周病の炎症の原因の1つである LPS による炎症を増悪させる可能性とその分子メカニズムを明らかにした。

研究成果は、Tanabe N, Tomita K, Manaka S, Ichikawa R, Takayama T, Kawato T, Ono M, Masai Y, Utsu A, Suzuki N, Sato S (2023) Co-Stimulation of AGEs and LPS Induces Inflammatory Mediators through PLC  $\gamma$ 1/JNK/ NF- $\kappa$ B Pathway in MC3T3-E1 Cells. Cells. 2023 12, 1383. doi: 10.3390/cells12101383 に掲載されている。

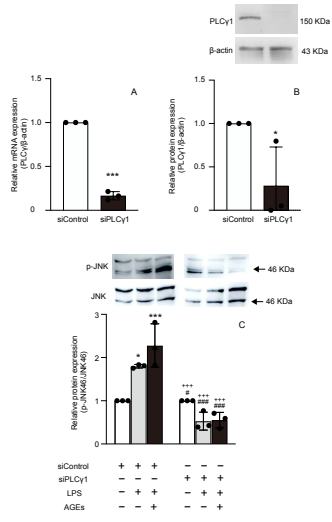


Fig 4

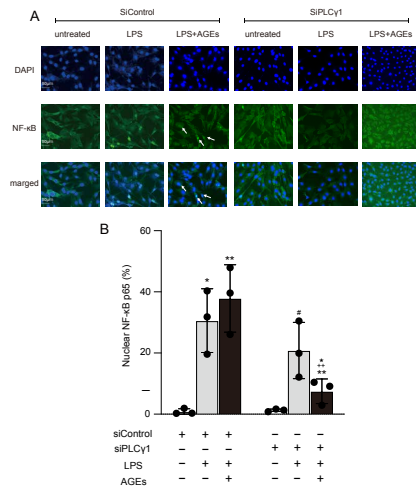


Fig 5

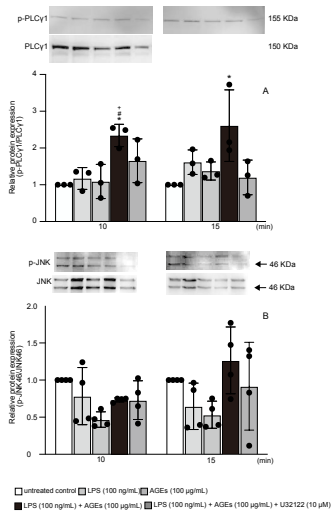


Fig 6

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tanabe Natsuko, Tomita Keiko, Manaka Soichiro, Ichikawa Risa, Takayama Tadahiro, Kawato Takayuki, Ono Misae, Masai Yuma, Utsu Akihisa, Suzuki Naoto, Sato Shuichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Co-Stimulation of AGEs and LPS Induces Inflammatory Mediators through PLC 1/JNK/NF- B Pathway in MC3T3-E1 Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1383 ~ 1383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12101383	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 -

1. 著者名 Utsu Akihisa, Tanabe Natsuko, Manaka Soichiro, Tomita Keiko, Ichikawa Risa, Ono Misae, Masai Yuma, Suzuki Naoto, Motoyoshi Mitsuru	4. 巻 33
2. 論文標題 Low-Intensity Pulsed Ultrasound Induced Osteoblast Differentiation Mediated by the PYK2-ERK2 Signaling in MC3T3-E1 Cells.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.33.47	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 K. Tomita , N. Tanabe , R. Ichikawa , S. Manaka , A. Utsu ,N. Suzuki , S. Sato
2. 発表標題 AGEs and LPS induces inflammatory mediators through PLC 1/JNK/NF- B pathway
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 A. Utsu, N. Tanabe, K. Tomita, R. Ichikawa, Y. Masai1, S. Manaka, M. Ono, N. Suzuki, M. Motoyoshi
2. 発表標題 LIPUS Promotes Osteoblast Differentiation Mediated by PYK2-ERK Pathway in Osteoblasts
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 R. Ichikawa , N. Tanabe , K. Tomita , M. Ono , Y. Masai ,S. Manaka , A. Utsu , N. Suzuki , S. Sato
2. 発表標題 AGEs reduced the expression of Claudin 4 and 7 in Ca9-22 cells
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of the IADR ( 国際学会 )
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 市川理沙, 田邊奈津子, 富田景子, 小野美紗恵, 正井佑篤, 間中総一郎, 高山忠裕, 奥野健二, 増田晴美, 鈴木直人, 佐藤秀一
2. 発表標題 AGEsはCa9-22細胞におけるCLDN7の発現を低下させる
3. 学会等名 第67回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 R. Ichikawa , N. Tanabe , K. Tomita , M. Ono , Y. Masai ,S. Manaka , A. Utsu , N. Suzuki , S. Sato
2. 発表標題 AGEs reduced the expression of Claudin 4 and 7 in Ca9-22 cells.
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of the IADR ( ( 国際学会 )
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 K. Tomita , N. Tanabe , R. Ichikawa , S. Manaka , A. Utsu ,N. Suzuki , S. Sato
2. 発表標題 AGEs and LPS induces inflammatory mediators through PLC 1/JNK/NF- B pathway
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of the IADR ( 国際学会 )
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 A. Utsu, N. Tanabe, K. Tomita, R. Ichikawa, Y. Masai, S. Manaka, M. Ono, N. Suzuki, M. Motoyoshi
2. 発表標題 LIPUS Promotes Osteoblast Differentiation Mediated by PYK2-ERK Pathway in Osteoblasts
3. 学会等名 102nd General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 富田 景子, 田邊 奈津子, 高山 忠裕, 間中 総一郎, 市川 理沙, 正井 佑篤, 汐見 登, 大塩 薫里, 鈴木 直人, 佐藤秀一
2. 発表標題 AGEs は p- PLC 1 NF- B の活性化を介して骨芽細胞の PGE2 および IL-1 産生を促進する
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川理沙、田邊奈津子、富田景子、高山忠弘、鈴木直人、佐藤秀一、齋藤 政一、八木 宏明
2. 発表標題 ヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22細胞の上皮バリア機能に及ぼすAGEsの影響
3. 学会等名 第66回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 市川理沙、田邊奈津子、富田景子、小野美紗恵、間中総一郎、鈴木直人、佐藤秀一
2. 発表標題 ヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22細胞が上皮バリア機能に及ぼすAGEsの影響
3. 学会等名 第75回 日本大学歯学会総会・学術大会
4. 発表年 2023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	鈴木 直人  (Suzuki Naoto)  (10226532)	日本大学・歯学部・教授   (32665)	

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