

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14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：2010～2011

課題番号：22890126

研究課題名（和文） レジスチンは歯周炎の新規モジュレーターか

研究課題名（英文） Is resistin a novel modulator of periodontitis?

研究代表者

村田 裕美（MURATA HIROMI）

徳島大学・病院・医員

研究者番号：00583874

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、糖尿病と関連のあるアディポサイトカインであるレジスチンの歯周炎における役割を検討することである。歯肉溝滲出液（GCF）中のレジスチンレベルを調べると、歯周炎患者と糖尿病関連歯周炎患者のレジスチンレベルは健常者に比べて高かった。また、*P.gingivalis* 由来のリポ多糖（P-LPS）はヒト好中球からのレジスチンの遊離を促進し、その遊離促進はアクチンの重合阻害剤によって阻害された。一方で、マクロファージ様に分化させたヒト単球系細胞株 U937 におけるレジスチン発現は、終末糖化産物（AGEs）と P-LPS による著明な影響を受けなかった。これらの結果から、レジスチンは歯周病における炎症のモジュレーターである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is investigate a role of resistin, an adipocytokine related to diabetes mellitus (DM), in periodontitis. When resistin level in gingival crevicular fluid (GCF) was examined, resistin level in GCF samples from periodontitis and DM-related periodontitis was higher than that of healthy sites. Lipopolysaccharide of *P.gingivalis* (P-LPS) increased a release of resistin from human neutrophils and its induction was inhibited with actin polymerization inhibitors. In contrast, advanced glycation end-products (AGEs) and P-LPS did not clearly affect on resistin expression in human macrophages derived from the U937 cell line. The present result shows resistin may modulate an inflammation in periodontal diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：レジスチン，歯周炎，糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

アディポサイトカインのひとつであるレジスチンはインスリン抵抗性を調節するタンパクとして発見され、糖尿病合併症の発症にも関与するとされている。我々は、歯周炎

罹患部位における歯肉溝滲出液（GCF）中にレジスチンが高濃度に存在することを見出したが、歯周炎におけるレジスチンの関与・役割については不明であった。

## 2. 研究の目的

歯周炎罹患部位におけるレジスチンの局在や発現調節機構および糖尿病関連歯周炎との関連に焦点を当て、レジスチンが歯周炎発症における新規モジュレーターであるかの検討を行い、将来レジスチンをターゲットとした歯周病治療への応用の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

(1) GCF 中のレジスチン量および濃度の測定：歯周炎罹患患者(P)、糖尿病関連歯周炎罹患患者(DM-P)および健常者(H)の歯周ポケット内から GCF を採取し、GCF 中のレジスチン量および濃度をウェスタンブロット解析および ELISA 法により測定した。

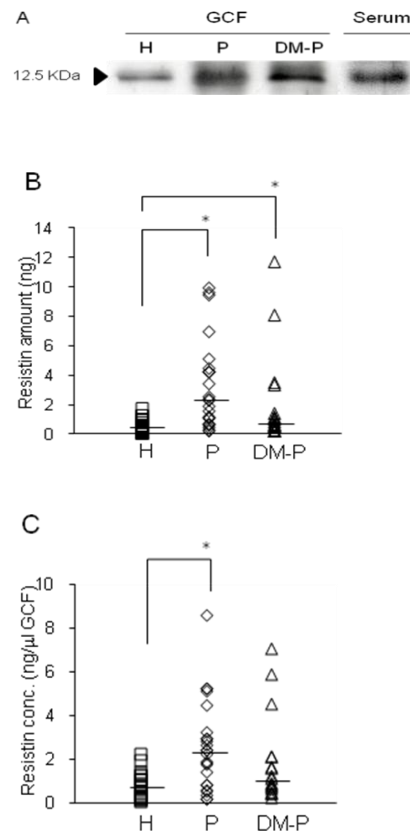
(2) 歯周病原細菌 *P.gingivalis* 由来 lipopolysaccharide (P-LPS) が歯周組織構成細胞からのレジスチン遊離に及ぼす影響の検討：ヒト末梢血より分離した好中球を P-LPS で処理し、培養上清および細胞からタンパク画分を抽出し、ウェスタンブロット解析および ELISA 法によりレジスチンタンパクの定量測定を行った。

(3) 後期糖化反応生成物 (advanced glycation endproducts; AGEs) が歯周組織に及ぼす影響の検討：単球系細胞株 U937 の培養系に AGEs を添加し、レジスチンを含む炎症性サイトカイン、抗菌ペプチドやケモカインなどの遺伝子発現の変化を mRNA レベルで検討した。

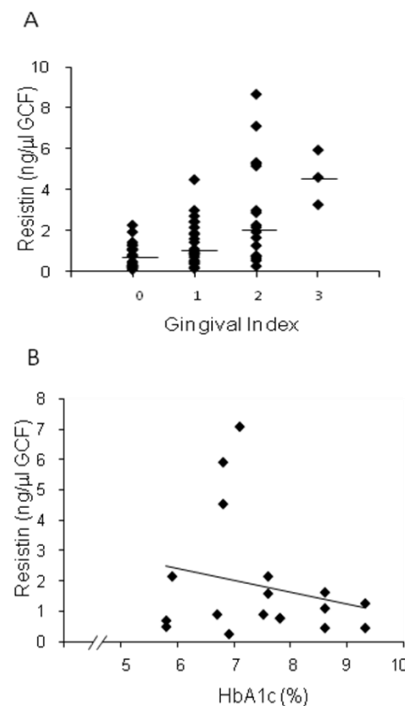
(4) 糖尿病関連歯周炎の歯周組織におけるレジスチン発現動態の解明：U937 を P-LPS と AGEs の共存下で培養した場合のレジスチンの発現変化を、各単体を添加した場合と比較して mRNA レベルで検討した。

## 4. 研究成果

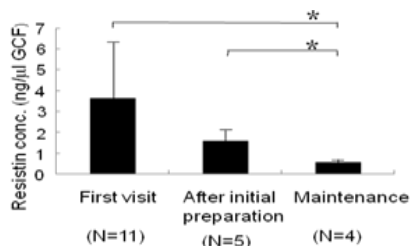
(1) GCF 中のレジスチンレベルは、健常者と比較して歯周炎および糖尿病関連歯周炎罹患患者は有意に高い値を示した (図 1)。また、GCF 中のレジスチンレベルと歯肉炎指数には有意な正の相関関係が認められたが、糖尿病の指標となる HbA1c に相関は認められなかった (図 2)。また、歯周炎の治療過程においてレジスチンレベルの変化を調べた結果、初診時より、初期治療後、歯周外科治療後のメンテナンス期のレジスチン濃度は有意に低かった (図 3)。これらの結果より、GCF 中にレジスチンが存在することが明らかになり、レジスチンは糖尿病の影響を受けず、歯周病診断のバイオマーカーとなることが示唆された。



【図 1】歯周炎罹患患者、糖尿病関連歯周炎罹患患者、および健常者の GCF 中のレジスチン量および濃度の比較

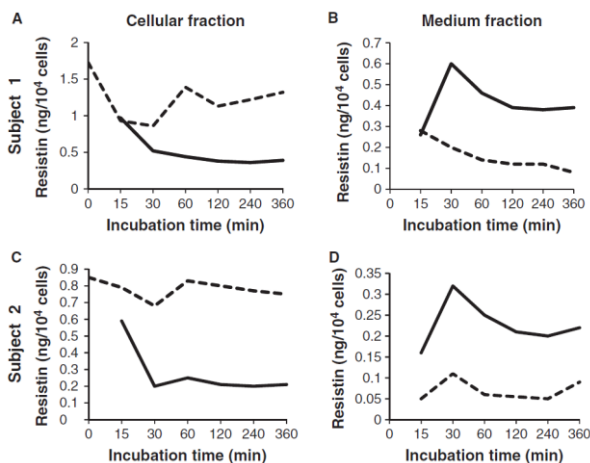


【図 2】GCF 中のレジスチン濃度と歯肉炎指数 (A) および HbA1c (B) との相関

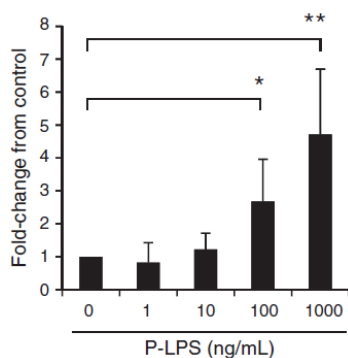


【図3】歯周炎の治療過程における GCF 中のレジスチン濃度の変化

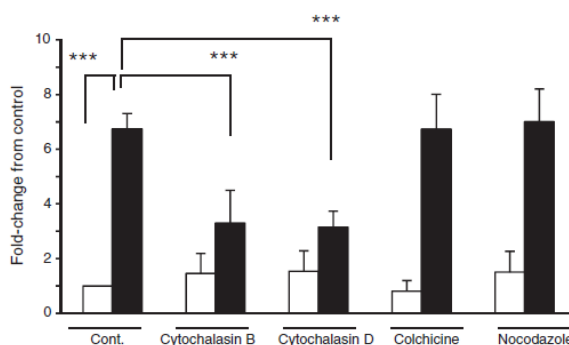
(2) また、P-LPS がヒト末梢血好中球からのレジスチン遊離に及ぼす影響について検討した。好中球を P-LPS で刺激すると、細胞上清中のレジスチンは刺激 30 分後に对照群の 3 倍の増加を示した (図 4)。またレジスチンの遊離は P-LPS の濃度に依存して上昇した (図 5)。さらに、この遊離促進はアクチンの重合阻害剤によって抑制されることが明らかになった (図 6)。これらの結果より、歯周病病変部位において病原因子の P-LPS が好中球でのレジスチンの遊離を促進させ、その結果、GCF 中のレジスチンレベルが高まるのが推察された。



【図4】P-LPS で刺激したヒト好中球におけるレジスチンレベルの変化

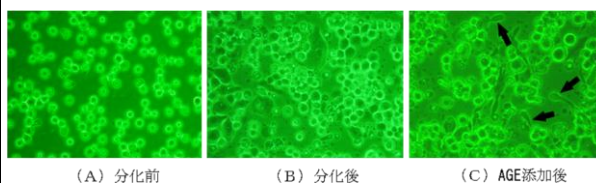


【図5】P-LPS 濃度によるヒト好中球のレジスチン放出量の変化 (ELISA 法)

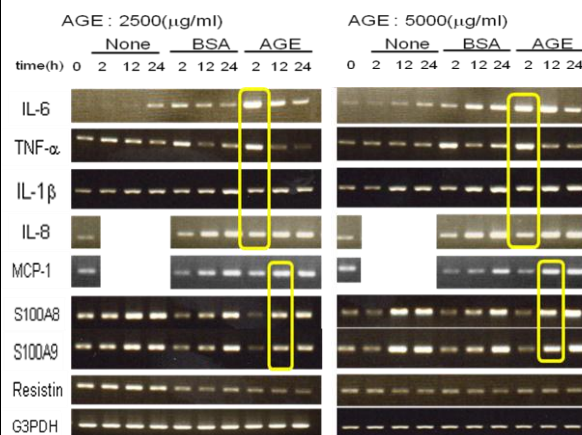


【図6】アクチン重合阻害剤によるヒト好中球のレジスチン遊離抑制効果

(3) 単球系細胞株 U937 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培地で 24 時間培養してマクロファージ様に分化させた後、AGEs を添加し 0~24 時間培養を行った結果、図 7-C のような細胞の形態的变化を認めた。また、AGEs 添加後短時間 (2~12 時間) で IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインや MCP-1 などのケモカイン、およびカルプロテクチン (S100A8/A9) の mRNA 発現が上昇したが、レジスチンは著明な変化を示さなかった (図 8)。

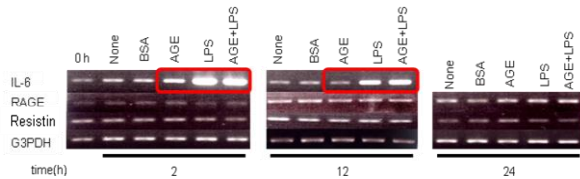


【図7】AGE 添加による U937 の形態変化



【図8】AGE 添加時の炎症関連因子の mRNA 発現

(4) また、糖尿病関連歯周炎を想定し P-LPS と AGEs を同時添加し 0~24 時間培養した結果、IL-6 は P-LPS の影響を受けて著しい発現増加を示したのに対し、レジスチンは著明な変化を示さなかった (図 9)。



【図 9】 AGE+LPS 添加時の炎症関連因子の mRNA 発現

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin release by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in human neutrophils. Hiroshima Y, Bando M, Inagaki Y, Mihara C, Kataoka M, Murata H, Shinohara Y, Nagata T, Kido J. *J Periodontal Res.* 査読有, 2012 Feb 6, in press

DOI:10.1111/j.1600-0765.2011.01466.x. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕 (計 4 件)

① 木戸淳一, 稲垣裕司, 板東美香, 廣島佑香, 村田裕美, 美原智恵, 堀部ますみ, 米田 哲, 二宮雅美, 大石慶二, 坂本英次郎, 中島由紀子, 生田貴久, 浅原洋士, 永田俊彦

「バイオマーカーを用いた糖尿病関連歯周炎の診断研究」

第 28 回 歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い, 2012 年 1 月 7 日, 東京 (歯科医師会館)

② 村田裕美, 木戸淳一, 板東美香, 廣島佑香, 稲垣裕司, 永田俊彦

「最終糖化産物はマクロファージ様細胞の炎症関連因子の発現を調節する」

第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2011 年 10 月 20 日-21 日, 大阪 (大阪国際交流センター)

③ 坂東由記子, 木戸淳一, 廣島佑香, 板東美香, 稲垣裕司, 村田裕美, 四釜洋介, 船木真理, 永田俊彦

「歯肉溝滲出液中の YKL-40 の分析」

第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会, 2011 年 9 月 24 日, 下関 (海峡メッセ下関)

④ 板東美香, 稲垣裕司, 木戸淳一, 廣島佑香, 片岡正俊, 村田裕美, 坂東由記子, 二宮雅美, 坂本英次郎, 中島由紀子, 永田俊彦

「歯肉溝滲出液中のグリコアルブミン測定法の確立」

第 54 回日本歯周病学会春季学術大会, 2011 年 5 月 27 日-28 日, 福岡 (福岡国際会議場)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 裕美 (MURATA HIROMI)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：00583874

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

