

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792333

研究課題名(和文) 終末糖化産物とレドックス制御との関連から探る糖尿病関連歯周炎の病態

研究課題名(英文) Investigation of diabetes-associated periodontitis pathogenesis from a point of relevance for advanced glycation end-product and redox regulation.

研究代表者

板東 美香 (BANDO, Mika)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：10510000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、酸化ストレスの観点から糖尿病関連歯周炎の病態を調べるとともに、その治療法として酸化ストレス防御機構を応用することを目指した基礎研究である。歯肉線維芽細胞において終末糖化産物(AGE)と歯周病原因子(P-LPS)により、酸化ストレス指標、抗酸化酵素、サイトカインが増加した。またMAPK経路阻害剤がAGEによるサイトカイン誘導を抑制し、KGFが抗酸化酵素を増加させた。これらの結果から、AGEはP-LPSとともに酸化ストレスを誘導し、サイトカインの発現に影響を与え、糖尿病関連歯周炎の病態を悪化させる可能性が示唆された。また、KGFにより酸化ストレス防御機構を促進できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is investigation of diabetes-associated periodontitis pathogenesis from a point of oxidative stress, and utilization of antioxidative stress mechanism as new treatment. Advanced glycation end-product (AGE) and periodontopathic factor (P-LPS) increased expressions of AGE receptor, oxidative stress markers, antioxidative enzyme and inflammatory cytokine in human gingival fibroblasts. Inhibitors of MAPK pathway inhibited AGE-induced cytokine expression. KGF increased expression of an antioxidative enzyme. These findings suggest that AGE and P-LPS make a diabetes-associated periodontitis pathogenesis worse by production oxidative stress and inflammatory cytokine. KGF may enhance antioxidative stress mechanism.

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：終末糖化産物 歯肉線維芽細胞 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

歯周病は糖尿病の第6の合併症であると言われている。実際、糖尿病患者での歯周病の発症率は高く、その病態も非糖尿病患者と比べて重篤である。その理由として、微少循環障害による歯周組織の創傷治癒遅延や高血糖に伴うコラーゲン代謝機能の低下、歯根膜線維芽細胞の機能変化などが考えられているが、糖尿病関連歯周炎の病態については未だ不明な点が多い。一方糖尿病では、慢性的な高血糖状態から、血中のグルコースなどの還元糖と蛋白質との間の非酵素的糖化反応の後期段階で生成する構造体である終末糖化産物 (Advanced glycation end-products; AGEs) が生体内に存在することが明らかになっている。AGEs が、活性酸素種(ROS)を誘導し酸化ストレス反応を亢進させることにより様々な糖尿病合併症の発症・進展に関与することが考えられている(*Biochim. Biophys. Acta*, 2011)。また、酸化ストレス防御の役割を担っているのが、転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) とその抑制性制御因子 Kelch-like-Ech-associated protein 1(Keap1)である。平常時には、Nrf2 は細胞質に存在する Keap1 により抑制されているが、酸化ストレスが加わると Nrf2 は安定化し、応答配列に結合し活性酸素の産生を抑制する酵素群を誘導制御する(*Trends Mol Med* 10: 549-557, 2004)。

最近、糖尿病患者の歯周組織においても AGEs が存在することが報告されているが(*J periodont Res* 31: 508-515, 1996)、歯周組織局所における AGEs の作用については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では糖尿病関連歯周炎においても糖尿病合併症の起因物質である最終糖化産物 (AGEs) と酸化ストレスが深く関わり、AGEs が歯周組織での酸化ストレス反応を亢進したり、Keap1-Nrf2 システムのような酸化ストレス防御機構を抑制したりすることにより炎症の増悪化や骨吸収の進行促進に関与しているのではないかという仮説を立て、レドックス制御の観点から糖尿病関連歯周炎の病態を詳細に調べることを目的とする。つまり、AGE と歯周病原因子が歯周組織細胞での炎症と酸化ストレスの関連因子の発現に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) 歯肉線維芽細胞と口腔上皮細胞において AGE と P-LPS が遺伝子発現に及ぼす影響: 歯肉線維芽細胞株(CRL2014)と口腔上皮細胞株(TR146)を培養し、サブコンフ

ルエントに達した後*AGE(500 µg/ml)と**P-LPS (1 µg/ml)を添加し、24 時間後に RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA から通法に従い cDNA を作製した後、AGE 受容体(RAGE)、抗酸化酵素(HO-1)、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-β, TNFα)、抗菌ペプチド(S100A8, S100A9)、細胞外マトリックス分解酵素(MMP-1, -2, -3)のプライマーでそれぞれ RT-PCR を行った。内部標準として Glyceraldehyde-3-phosphate- dehydrogenase (GAPDH)を使用した。

*AGE は BSA と glyceraldehyde の混合による Takeuchi(M *et al.* Mol Med, 2000)らの方法により作製

**P-LPS は *Porphyromonas gingivalis* 由来の Lipopolysaccharide(Invitrogen)

(2) 歯肉線維芽細胞において AGE と P-LPS が酸化ストレス指標の ROS 産生に与える影響: 歯肉線維芽細胞に AGE(500 µg/ml) と P-LPS (1 µg/ml)を添加し、6, 12, 24 時間後に OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs) を用いて ROS 産生量の測定を行った。

(3) 歯肉線維芽細胞において AGE と P-LPS が酸化ストレス指標の 8-OHdG 産生に与える影響: 歯肉線維芽細胞に AGE(500 µg/ml)と P-LPS (1 µg/ml)を添加し、24 時間後に FastPure® DNA Kit(TaKaRa)を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set(Wako)を用いて前処理を行い、Oxiselect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit (Cell Biolab)により、8-OHdG 産生量の測定を行った。

(4) 歯肉線維芽細胞において AGE と P-LPS が IL-6 の蛋白発現に与える影響: 歯肉線維芽細胞に AGE(500 µg/ml)と P-LPS (1 µg/ml)を添加してから 24 時間後に蛋白を抽出した後、Human IL-6 Quantkine® (R&D system)Kit を用いて IL-6 蛋白の定量を行った。

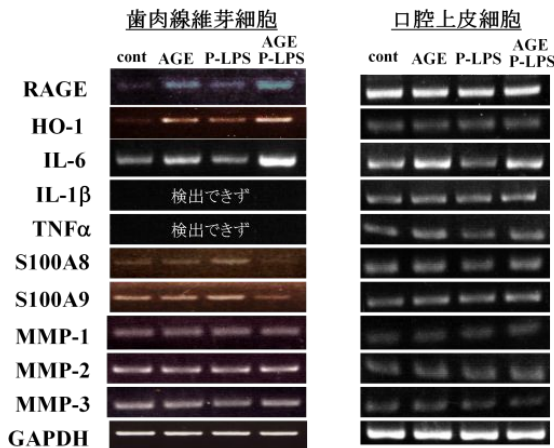
(5) 歯肉線維芽細胞において MAPK 経路阻害剤が AGE 誘導 IL-6 遺伝子の発現に及ぼす影響: 歯肉線維芽細胞に MAPK 経路阻害剤として SB203580(p38 阻害剤)、U0126(ERK 阻害剤)、SP600125(JNK 阻害剤)を添加し 2 時間作用後、AGE(500 µg/ml)を加え 24 時間培養した。培養後通法に従い RNA を抽出し、IL-6 のプライマーを用いて RT-PCR を行った。

(6) 歯肉線維芽細胞において KGF が抗酸化酵素発現関連転写因子の Nrf2 と HO-1 遺伝子発現に及ぼす影響: 歯肉線維芽細胞に keratinocyte growth factor (KGF)

(10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)を添加し、48時間培養後の RNA を抽出した。Nrf2 と HO-1 mRNA の発現を RT-PCR にて調べた。

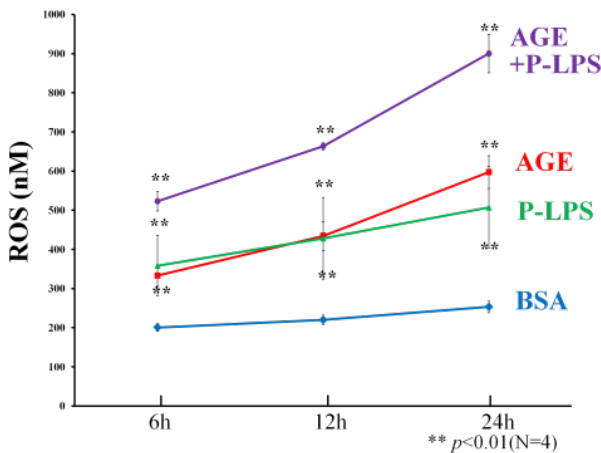
4. 研究成果

(1) 歯肉線維芽細胞では、AGE と P-LPS により、RAGE、HO-1 および IL-6 の遺伝子発現が増加し、共存下でさらに増加を示した。抗菌ペプチドの S100A8 と S100A9 は共存下で減少したが、その他の遺伝子は変化が認められなかった。口腔上皮細胞では、AGE により IL-6 の増加が認められたが、その他の遺伝子には変化がなかった (図 1)。



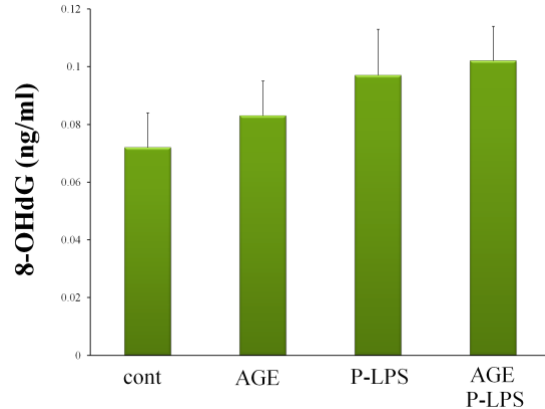
【図 1】AGE と P-LPS が遺伝子発現に及ぼす影響

(2) 歯肉線維芽細胞において AGE と P-LPS 刺激後時間依存的に (6, 12, 24 時間) ROS 産生が増加した。さらに AGE と P-LPS との共存下で有意に増加した (図 2)。



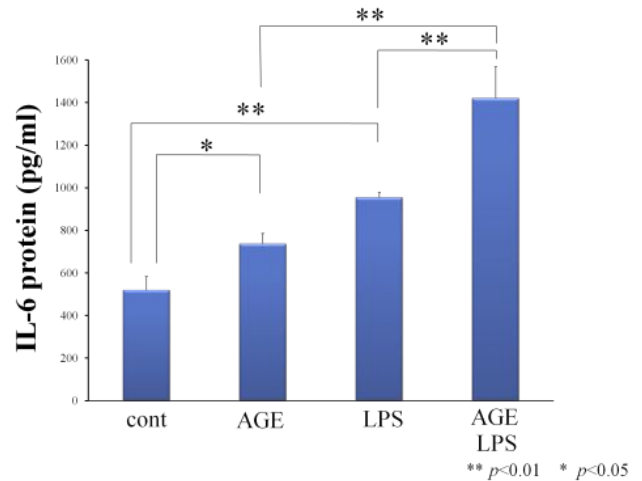
【図 2】AGE と P-LPS が ROS 産生に及ぼす影響

(3) 歯肉線維芽細胞において AGE と P-LPS が 8-OHdG 産生を増加させる傾向が認められた (図 3)。



【図 3】AGE と P-LPS が 8-OHdG 産生に及ぼす影響

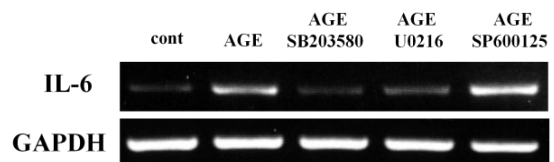
(4) 歯肉線維芽細胞において AGE と P-LPS により IL-6 蛋白量が増加し、共存下でさらに有意な増加を示した (図 4)。



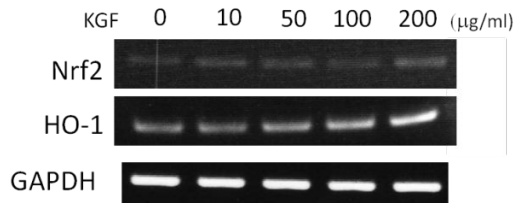
【図 4】AGE と P-LPS が IL-6 蛋白発現に及ぼす影響

(5) 歯肉線維芽細胞において SB203580 (p38 阻害剤) と U0126 (ERK 阻害剤) が、AGE による IL-6 遺伝子発現の誘導を抑制した (図 5 A)。

また、KGF によち Nrf2 および HO-1 遺伝子発現が増加した。その発現増加は KGF が 200 $\mu\text{g/ml}$ で最大となった (図 5 B)。

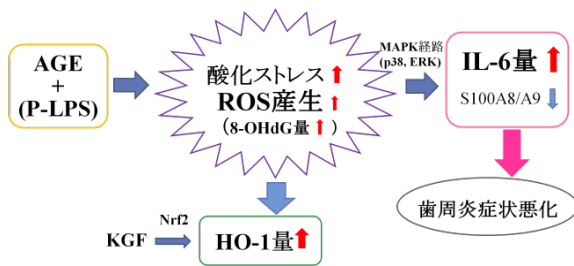


【図 5 A】MAPK 経路阻害剤が AGE 誘導 IL-6 遺伝子の発現に及ぼす影響



【図 5 B】KGF が Nrf2 および HO-1 遺伝子発現に及ぼす影響

(6) 本研究から、歯肉線維芽細胞において、AGE は P-LPS とともに酸化ストレスを誘導し、MAPK 経路を介して炎症性サイトカインの発現に影響を与え、糖尿病関連歯周炎の病態を悪化させる可能性が示唆された。また、KGF により酸化ストレス防御機構を促進できる可能性を見出した。



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 4 件)

Ikuta T, Inagaki Y, Tanaka K, Saito T, Nakajima Y, Bando M, Kido J, Nagata T.

Gene polymorphism of β -defensin-1 is associated with susceptibility to periodontitis in Japanese. *Odontology* 査読あり, in press

Bando M, Zou X, Hiroshima Y, Kataoka M, K.F.Ross, Shinohara Y, Nagata T, M.C.Herzberg, Kido J.

Mechanism of interleukin-1 α transcriptional regulation of S100A9 in a human epidermal keratinocyte cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* 査読あり 1829: 954-962, 2013.

Abe K, Hashimoto Y, Yatsushiro S, Yamamura S, Bando M, Hiroshima Y, Kido J, Tanaka M, Shinohara Y, Ooie T, Baba Y, Kataoka M.

Simultaneous immunoassay analysis of plasma IL-6 and TNF- α on a microchip.

PLOS ONE 査読あり 8:1-8,2013.

Hiroshima Y, Bando M, Inagaki Y, Mihara C, Kataoka M, Murata H, Shinohara Y, Nagata T, Kido J. Resistin in gingival crevicular fluid and induction of resistin release by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human neutrophils.

Journal of Periodontal Research 査読あり 47:554-562,2012.

〔学会発表〕(計 7 件)

Nakajima Y, Kido J, Bando M, Inagaki Y, Nagata T.

Effect of hypoxia and *P. gingivalis*-lipopolysaccharide on the expression of inflammation-related molecules in human oral keratinocytes.

第 57 回春季日本歯周病学会

2014/5/23-24 長良川国際会議場 (岐阜県)

梶浦由加里, 板東美香, 木戸淳一, 稲垣裕司, 生田貴久, 橋本万里, 篠原宏貴, 二宮雅美, 村田裕美, 中島由紀子, 米田哲, 美原智恵, 廣島佑香, 大石慶二, 永田俊彦. 歯肉溝滲出液中グリコアルブミンおよびカルプロテクチンを指標とした糖尿病関連歯周炎の診断.

第 57 回春季日本歯周病学会

2014/5/23-24 長良川国際会議場 (岐阜県)

板東美香, 中島由紀子, 梶浦由加里, 木戸淳一, 稲垣裕司, 村田裕美, 永田俊彦. 最終糖化産物は歯周組織細胞での炎症関連因子と酸化ストレス因子の発現に影響する.

第 57 回日本糖尿病学会

2014/5/22 リーガロイヤルホテル (大阪府)

Kajiura Y, Bando M, Inagaki Y, Murata H, Kido J, Nagata T. Advanced glycation end-product increases oxidative stress in human gingival fibroblasts.

Korean Academy of Periodontology Meeting

2013/11/22-23 Grand Hilton Hotel (Seoul, Korea)

Kido J, Bando M, Inagaki Y, Hiroshima Y, Murata H, Mihara C, Kajiura Y, Ikuta T, Shinohara H, Hashimoto M, Nakajima Y, Bando Y, Funaki M, Saito H, Nagata T. Diagnosis of diabetes-

associated periodontitis using glycoalbumin and calprotectin in gingival crevicular fluid.

10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting

2013/9/3-4 奈良県新公会堂 (奈良県)

梶浦由加里, 板東美香, 木戸淳一, 稲垣裕司, 永田俊彦. 最終糖化産物が歯肉線維芽細胞における酸化ストレス反応に及ぼす影響.

第 56 回春季日本歯周病学会

2013/6/1 タワーホール船堀 (東京都)

木戸淳一, 板東美香, 坂東由記子, 稲垣裕司, 廣島佑香, 梶浦由加里, 美原智恵, 村田裕美, 生田貴久, 篠原宏貴, 橋本万里, 船木真理, 齋藤晴比古, 永田俊彦. 糖尿病関連歯周炎の診断マーカーとしての歯肉溝滲出液中グリコアルブミンとカルプロテクチンの有用性.

第 56 回日本糖尿病学会

2013/5/16-18 ホテル日航熊本 (熊本県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板東 美香 (BANDO, Mika)

徳島大学 病院・助教

研究者番号: 10510000

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし