

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462960

研究課題名(和文) 糖尿病患者における歯内疾患悪化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidate the mechanism of aggravation of endodontic disease on diabetic patients

研究代表者

内田 雄士 (Uchida, Yushi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40363080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病は他の疾患同様に歯の神経の病気にも大変影響をしていると考えられる。そこで、糖尿病になったマウスを検証してみた。虫歯を実験的に作ると歯の根の先が化膿するまでの時間が健康なマウスと比較して糖尿病のマウスは早かった。そのメカニズムは、体中を巡っている白血球が血糖値の上昇とともに何らかの影響を受けて、炎症が急速に進む可能性があることが分かった。つまり、血糖値が常時高い値を示している人は、血液中の細胞に異常が起き、虫歯が進行し歯の神経まで到達すると健康者よりも急速にあごの骨の中に炎症と感染が進行する可能性があるということである。

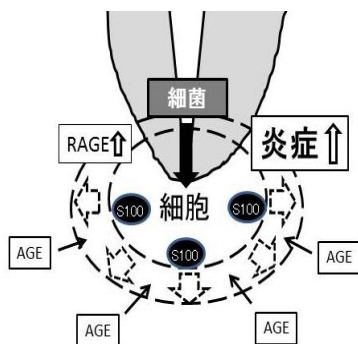
研究成果の概要(英文)：Diabetes Mellitus (DM) effects on endodontic disease as other disease. Endodontic disease of DM model mouse proceeds more rapidly than normal mouse. The white blood cell which circulated through the whole body change the some functions, and the inflammation of endodontic tissue proceed rapidly. But the fibroblasts from pulp tissue on DM patients produce the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) as much as healthy subjects. It might be very important that RAGE on the white blood cell more than cell of endodontic tissue.

研究分野：歯内歯周病学

キーワード：糖尿病 歯内疾患 好中球

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者における根尖性歯周炎の保有率に関する横断的疫学調査では、健常者と比較して糖尿病患者が有意に多くの根尖性歯周炎を有している(参考文献 1))。この疫学研究を考慮すると、健常者と糖尿病患者を同じように歯内治療していることが原因である可能性がある。そこで、先に述べた3つの因子(AGE、S100、RAGE)に着目して、糖尿病患者の歯内疾患における免疫応答を調べることで糖尿病患者と健常者の歯内疾患発症・進行の違いを検証することとした。AGEは長期高血糖状態の血中で産生され、いろいろな組織で炎症性サイトカインを誘導し炎症に参与している。また、AGEはRAGEを介して免疫担当細胞である好中球の機能に大きな影響を及ぼしている(参考文献 2))。一方、S100も腎臓や脳、肺の炎症性サイトカイン発現を誘導し、炎症惹起に関わっている(参考文献 3) -5))。申請者らは、歯周炎発症時にS100発現が亢進し炎症性サイトカインの誘導因子となり、歯周炎の惹起に関与していることを確認した。そこで、糖尿病患者の根尖部に細菌が感染すると右図のような免疫反応が起きるといふ仮説を立てた。AGEは各種細胞表面のRAGE発現を増加させる。根尖周囲組織では細菌感染によってS100発現が誘導される。血中から滲出するAGEと炎症時に誘導されるS100が過剰発現したRAGEを介して炎症を増悪させる。この仮説を立証することは、糖尿病患者における歯内疾患発症・進行のメカニズムを解明する上で有用である。さらに、AGE



とS100がRAGEを介して根尖性歯周炎の発症と進行に関わりがあれば、糖尿病の程度に応じた治療法の確立に繋がる。このように、本研究は健常者と同じように行ってきた糖尿病患者の歯内治療の妥当性を検証するためにも必要である。また、特定のタンパク質に着目し、糖尿病と歯内病変の関係を調べたことも新規性があると考えられる。

2. 研究の目的

糖尿病患者での免疫応答は健常者と比較して低下していることが知られているが、糖尿病患者における歯内疾患の病態の詳細は明らかにされておらず、治療への応答性も不明である。治療への応答性を検証するためにはまず糖尿病を伴う歯内疾患への免疫応答を検証する必要があると考える。そこで、本研究では、糖尿病患者の歯内疾患に対する免疫反応を調べるために、3つの因子に着目し実験を計画した。

- 1) **糖化最終産物 (AGE)** : 糖尿病における代表的な炎症増悪因子
- 2) **S100 タンパク質 (S100)** : 炎症の初期に産生され、サイトカインを誘導因子
- 3) **AGE の受容体 (RAGE)** : S100 と AGE 共通の受容体

in vivo の系において糖尿病モデルラットを用いて根尖性歯周炎の経時的な進行速度と組織破壊を解析し、*in vitro* の系では、歯髓細胞や根尖周囲由来の細胞でのRAGEとS100タンパク質(S100)の発現、および、この3因子の炎症増悪に対する役割を解析する。そして、糖尿病罹患患者における歯内疾患悪化メカニズムを明らかにする。

3. 研究方法

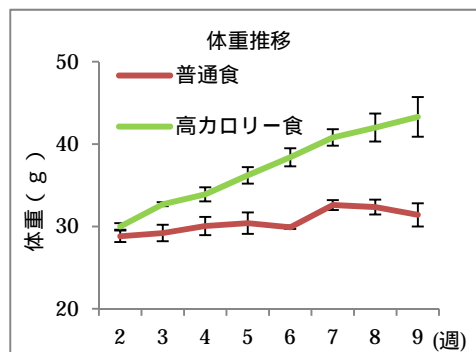
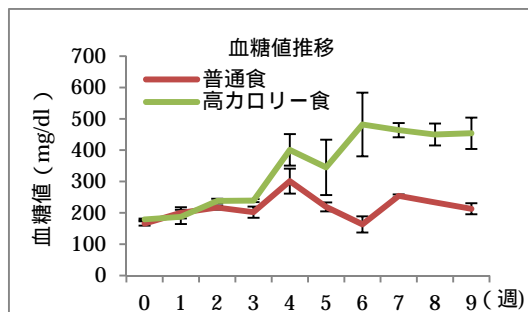
- 1) マウスの歯内病変モデルマウスを作成した。歯内病変モデルを作成する際に、

下顎の第一臼歯を露髄させ、1、3、5、7 日後の根尖周囲の炎症波及の範囲は、組織切片を HE 染色し炎症所見を確認する。歯内病変モデルでは露髄範囲に応じて根尖への炎症波及速度に差があるため第 1 臼歯の咬合面全体を露髄させる、根管形成用ファイルを根管孔内に挿入し根管内の歯髄に感染を容易にすることとした。そして、糖尿病誘導マウスと健常マウスを用いて歯髄炎 根尖性歯周炎に至る速度の違いを確認する。糖尿病誘導マウスの作製は、5 週齢のオスの KK/TaJcl マウスに Hight Fat Diet 32 を 8 週間与えることで作成する。

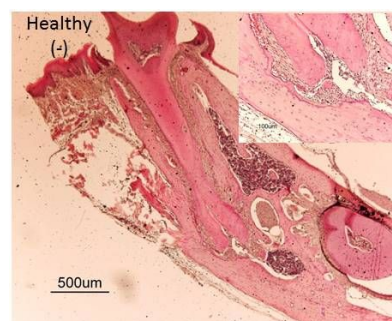
- 2) 炎症細胞ある好中球における RAGE の発現を糖尿病患者と健常者で比較する。
- 3) 健常者から採取した好中球に RAGE のリガンドである S100 たんぱく質を作用させ活性酸素の産生量をと糖尿病患者から採取した好中球の産生量を比較する。

4. 研究成果

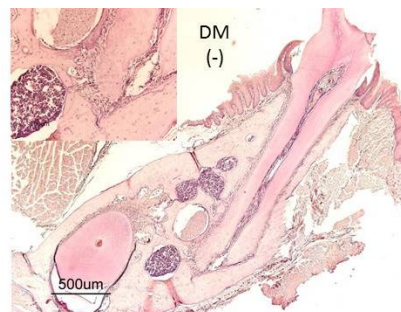
- 1) 糖尿病誘導マウスの 8 週後（13 週齢）の血糖値は 450 ± 54 mg/dl、体重は 43 ± 2.8 g であり、健常マウス（普通食投与群）は血糖値が 212 ± 17 mg/dl、体重は 31 ± 1.4 g であった。



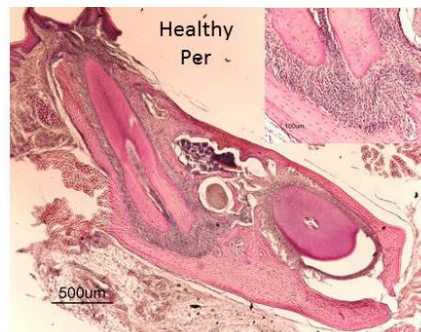
- 2) 根尖周囲への炎症波及範囲は露髄後 3 日後から明らかな差が生じていた。



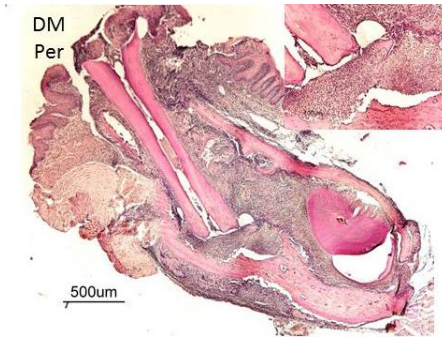
健常マウスの露髄なし



糖尿病マウスの露髄なし



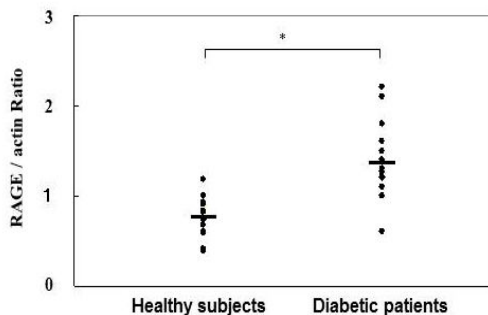
健常マウスの露髄あり



糖尿病マウスの露髄あり

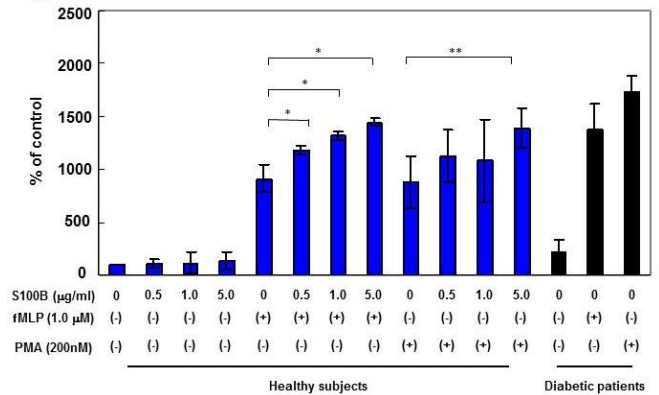
糖化最終産物レセプター (RAGE) の関与を証明するためにリコンビナント RAGE(rRAGE)を露髄後すぐに根管内に投与群と非投与群を作成し比較した。rRAGE投与群は非投与群と比較して炎症の波及が緩やかな傾向であった。

- 3) 糖尿病患者の好中球における RAGE の発現は健常者と比較して増加していた。



- 4) 健常者から採取した好中球に RAGE のリガンドである S100 たんぱく質を作用させ活性酸素の産生量をと糖尿病患者から採取した好中球の産生量を比較したところ、同レベルの産生量が検出された。

このことから、糖尿病患者における歯髄疾患の進行には、血中で糖に長期間暴露され



た好中球などの炎症細胞が関係していることが示唆された。

<引用文献>

- 1) López-López J, et. al. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod.* 2011 May; 37(5):598-601.
- 2) Soro-Paavonen A, et.al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes.* 2008 Sep; 57(9):2461-9.
- 3) Hofmann Bowman MA, et. al. Transgenic expression of human S100A12 induces structural airway abnormalities and limited lung inflammation in a mouse model of allergic inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2011 Jun; 41(6):878-89.
- 4) D'Agati V, et. al. RAGE and the pathogenesis of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2010 Jun; 6(6):352-60. Review.
- 5) Qin W, et. al. S100A7, a novel Alzheimer's disease biomarker with non-amyloidogenic alpha-secretase activity acts via selective promotion of ADAM-10. *PLoS One.* 2009; 4(1): e4183.

5. 主な発表論文等

学会発表(3件)

- 1) 内田 雄士、應原 一久、他4名、糖化最終産物レセプターの歯肉上皮細胞への影響、第556回日本歯周病学会秋季学術大会2013年9月22日 (前橋)

2) 水野 智仁、應原 一久、内田 雄士、ほか 7 名、臨床検査によって根管内滲出液サンプルから同定した細菌種と抗菌薬感受性について、第 35 回日本歯内療法学会学術大会、2014 年 7 月 13 日、(新潟)

3) Y. Uchida, K. Akutagawa, K. Ouhara, T. Fujita, H. Shiba, J.Katz, S. Cha, H. Kurihara ,A Role of Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Gingival Epithelial Cells、IADR2015 年 3 月 12 日、(ボストン、米国)

6. 研究組織

1) 研究代表者

内田 雄士 (UCHIDA, Yuushi)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40363080

2) 研究分担者

應原 一久 (OUHARA, Kazuhisa)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80550425