

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463149

研究課題名(和文) 歯周組織の炎症性反応に対する糖尿病の影響の解析

研究課題名(英文) The influence of diabetes for inflammatory response in periodontal tissue

研究代表者

菊池 毅 (Kikuchi, Takeshi)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：40421242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：終末糖化産物(AGE)はマクロファージの増殖能には影響を与えないが、RANKL誘導性のマクロファージから破骨細胞への分化・活性化を低濃度で増強する可能性が示唆された。これらのことは、糖尿病環境下における歯周病の炎症性骨破壊増強メカニズムの一端を示している可能性が考えられ、糖尿病の歯周病発症や進行への影響に関する新たな機序解明とその治療ターゲットに繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The advanced glycation end product (AGE) did not affect the proliferative capacity of macrophages, however it was suggested the possibility of enhancing the differentiation / activation of RANKL-induced osteoclasts from macrophages at low concentrations of AGE. These possibilities may indicate part of the mechanism in the inflammatory bone destruction enhancement of periodontal disease in the diabetic environment, and those also might lead to elucidate a new mechanism concerning the influence of diabetes on periodontal disease onset and progression and identify a therapeutic target.

研究分野：歯周病態・診断学

キーワード：歯周病 糖尿病 終末糖化産物 炎症性骨破壊

1. 研究開始当初の背景

歯周病と糖尿病の関係を検討した疫学的研究は、その結果に多少のばらつきがみられるものの、両者の間に有意な相関を示しているものが多い。両者の関係は、相互に影響を及ぼすと考えられるが、両疾患の関与機序に関する詳細なメカニズムについては、推論の域を出ていない。

糖尿病においては、感染症への罹患率が高く、また組織修復能力が低下しているため、重症化しやすい。その原因として、高血糖や血流傷害などに起因する感染防御機能の低下が示唆される (Joshi N. et al. *N Engl J Med.* 1999)。具体的に、高血糖状態は、炎症誘発性である終末糖化産物 (AGE) の産生を引き起こす。型糖尿病患者において、血清中の AGE 濃度と歯周病の重症度は有為に関連している (Takeda et al. *J Periodontol.* 2006)。歯周病を伴った糖尿病モデルマウスでは、同コントロールマウスと比較してより重度な歯槽骨吸収を認め、その歯肉組織では、AGE とその受容体である receptor for advanced glycation end-products (RAGE) の発現上昇を認める (Lalla et al. *J Periodont Res.* 1998)。同モデルへの可溶性 RAGE の投与は、歯槽骨吸収を抑制し、糖尿病における歯周組織破壊に対する AGE-RAGE 相互作用の深い関与を示唆する (Lalla et al. *J Clin Invest.* 2000)。

これまでに申請者らは、自然発症 type2 糖尿病モデルである Zucker Diabetic Fatty Rat (ZDF) ラットを用いて実験的歯周炎を惹起させたところ、歯槽骨破壊が顕著であった。また、マイクロアレイによる同ラット歯肉における網羅的遺伝子解析を行い、その生物学的メカニズムの候補となる因子を同定した (Soboku. et al. *J Periodontol.* 2013)。これらのことを踏まえ、申請者は AGE 存在状態が歯周病における炎症性組織破壊を増強するのではないかと考えた。そこで、本研究では、AGE を用い、炎症性組織破壊に関与する細胞に焦点を絞り、糖尿病の歯周病に対する影響についての機序を解析することとした。

2. 研究の目的

今回、申請者は、生体内における糖尿病環境を模倣するため、AGE を用い、自然免疫を司り結合組織の代謝と密に関係しているマクロファージの機能に着目した。歯槽骨吸収に関与する破骨細胞分化促進因子 (RANKL) 刺激下で AGE 存在状態で培養することにより、歯周炎における炎症性骨破壊

反応が増強することを予想し実験を行った。本研究は、血糖コントロール不良による糖尿病と歯周炎を歯周組織破壊の機序の見地から研究するものであり、生活習慣病である糖尿病と歯周炎の関連を解明するのは大変有意義である。本研究の結果より、歯周組織局所において糖尿病が炎症性組織破壊に影響を与えることが証明され、糖尿病のコントロールの重要性や特定因子をターゲットとした生体防御機構の調整の可能性も踏まえ、今後の歯周病治療にフィードバックすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AGE によるマウスマクロファージ細胞増殖能に対する影響解析

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用い、0.01nM から 10nM の濃度範囲に調整した AGE (Pentosidin) および 25ng/ml の RANKL を加え、1 日間培養後、BrdU 化学発光キットを用いて細胞増殖能を検討した。

(2) AGE の破骨細胞分化に対する影響解析

RAW264.7 細胞を用い、0.01nM から 10nM の濃度範囲に調整した AGE (Pentosidin) および 25ng/ml の RANKL を加え、5 日間培養後、TRAP 染色を用いて多核の破骨細胞数を測定した。

(3) AGE の破骨細胞活性化に対する影響解析

RAW264.7 細胞を用い、0.01nM から 10nM の濃度範囲に調整した AGE (Pentosidin) および 25ng/ml の RANKL を加え、5 日間培養後、Corning Osteo Assay Kit を用いて破骨細胞活性化能を検討した。

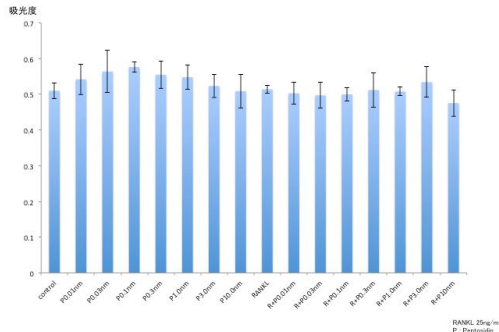
(4) AGE の破骨細胞分化・活性化関連因子遺伝子発現に対する影響解析

RAW264.7 細胞に対して、0.01nM から 0.1nM の濃度範囲に調整した AGE (Pentosidin) および 25ng/ml の RANKL を加え、3 日間培養後、細胞より total RNA を Nucleospin RNA システムを用いて抽出した。cDNA を合成後、qPCR 法にて 18SrRNA に対する MMP-9、TRAP、RANK、Cathepsin K の発現量を検討した。

4. 研究成果

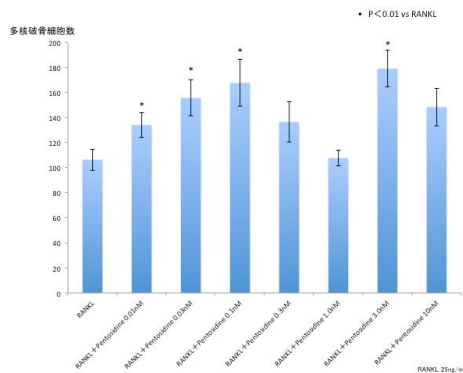
(1) AGE によるマウスマクロファージ細胞増殖能に対する影響解析

AGE および RANKL の添加は、1 日後の Raw264.7 細胞の細胞増殖能に対して影響を与えなかった。



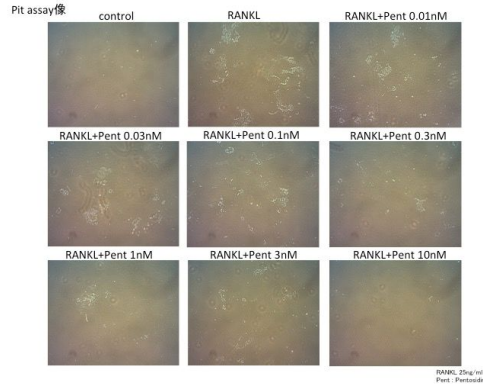
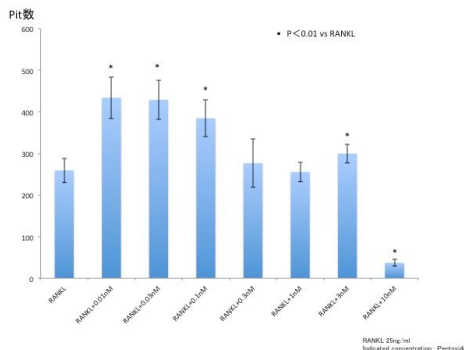
(2) AGE の破骨細胞分化に対する影響解析

低濃度 (0.01nM~0.1nM) AGE および RANKL の添加は、RANKL 単独添加と比較し Raw264.7 細胞の 5 日後の多核破骨細胞形成を有意に促進した。



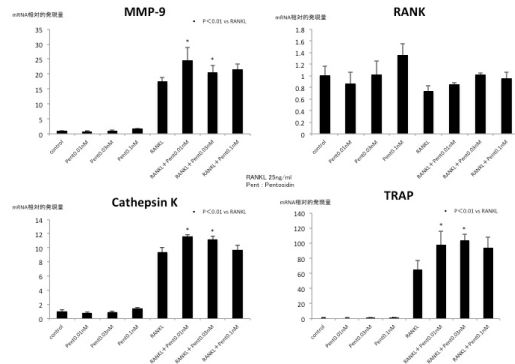
(3) AGE の破骨細胞活性化に対する影響解析

低濃度 (0.01nM~0.1nM) AGE および RANKL の添加は、RANKL 単独添加と比較し Raw264.7 細胞の 5 日後の破骨細胞活性化 (Pit 数) を有意に促進した。



(4) AGE の破骨細胞分化・活性化関連因子遺伝子発現に対する影響解析

低濃度 (0.01nM・0.03nM) AGE および RANKL の添加は、RANKL 単独添加と比較し Raw264.7 細胞の 3 日後の MMP-9、TRAP、Cathepsin K の発現量を有意に促進した。



(5) まとめ

本研究により、AGE はマクロファージの増殖能には影響を与えないが、RANKL 誘導性のマクロファージから破骨細胞への分化・活性化を低濃度で増強する可能性が示唆された。これらのことは、糖尿病環境下における歯周病の炎症性骨破壊増強メカニズムの一端を示している可能性が考えられ、糖尿病の歯周病発症や進行への影響に関する新たな機序解明とその治療ターゲットに繋がる可能性が示唆された。

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10件)

稲垣幸司、菊池 毅、三谷章雄、成瀬桂子、松原達昭、糖尿病合併症予防 歯周病、内科、査読無、121(1)、2018 年、pp121-126

菊池 毅、岡部 猪一郎、岡田康佑、大野 祐、後藤久嗣、藤村岳樹、菱川敏光、山本弦太、福田光男、三谷章雄、歯周病における組織破壊に関する免疫学的考

察、日本歯周病学会会誌、査読有、59(4)、2017年、pp185-190
Adachi K, Miyajima S, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Nishikawa T, Suzuki Y, Kikuchi T, Kobayashi S, Saiki T, Mizutani M, Ohno N, Noguchi T, Mitani A, Matsubara T, Naruse K, Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation in the Pathogenesis of Periodontitis in Diabetes, Journal of Clinical Periodontology、査読有、44(10)、2017、pp971-980
Ohno T, Yamamoto G, Hayashi JI, Nishida E, Goto H, Sasaki Y, Kikuchi T, Fukuda M, Hasegawa Y, Mogi M, Mitani A, Angiopoietin-like protein 2 regulates Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival epithelial cells, PLoS One、査読有、12(9)、2017、pp.e0184825
Okabe I, Kikuchi T, Mogi M, Takeda H, Aino M, Kamiya Y, Fujimura T, Goto H, Okada K, Hasegawa Y, Noguchi T, Mitani A, IL-15 and RANKL play a synergistically important role in osteoclastogenesis、Journal of Cellular Biochemistry、査読有、118(4)、2017、pp739-747
Hasegawa Y, Iijima Y, Persson K, Nagano K, Yoshida Y, Lamont RJ, Kikuchi T, Mitani A, Yoshimura F, Role of Mfa5 in Expression of Mfa1 Fimbriae in Porphyromonas gingivalis, Journal of Dental Research、査読有、95(11)、2016、pp1291-1297
Suzuki Y, Nakamura N, Miyabe M, Nishikawa T, Miyajima S, Adachi K, Mizutani M, Kikuchi T, Miyazawa K, Goto S, Tsukiyama K, Yamada Y, Ohno N, Noguchi T, Mitani A, Matsubara T, Naruse K, Anti-inflammatory role of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in periodontitis, Journal of Diabetes Investigation、査読有、7(4)、2016、pp497-505
Goto H, Ishihara Y, Kikuchi T, Izawa A, Ozeki N, Okabe E, Kamiya Y, Ozawa Y, Mizutani H, Yamamoto G, Mogi M, Nakata K, Maeda H, Noguchi T, Mitani A, Interleukin-1 Receptor Antagonist Has a Novel Function in the Regulation of Matrix Metalloproteinase-13 Expression, PLoS ONE、査読有、10(10)、2015、pp.e0140942
Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, Fujimura T, Fukuda M, Mitani A, Adjunctive Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy in Nonsurgical Periodontal

Treatment: A Review of Literature International Journal of Molecular Sciences、査読有、16(10)、2015、pp24111-24126
Miyajima S, Naruse K, Kobayashi Y, Nakamura N, Nishikawa T, Adachi K, Suzuki Y, Kikuchi T, Mitani A, Mizutani M, Ohno N, Noguchi T, Matsubara T, Periodontitis-activated monocytes/macrophages cause aortic inflammation, SCIENTIFIC REPORTS、査読有、Jun4(4)、2014、5171

〔学会発表〕(計14件)

飯島由羅、長谷川義明、菊池 毅、三谷章雄、歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa5 の Mfa1 線毛形成における役割、日本歯周病学会60周年記念京都大会、2017年
大野 祐、山本弦太、林潤一郎、西田英作、後藤久嗣、佐々木康行、菊池 毅、長谷川義明、茂木眞希雄、福田光男、三谷章雄、アンジオポエチン様タンパク2は歯肉上皮細胞において炎症反応を遷延化させる、日本歯周病学会60周年記念京都大会、2017年
西川 徹、成瀬桂子、中村信久、足立圭、鈴木佑基、菊池 毅、本田雅規、松原達昭、三谷章雄、糖尿病誘導ラットにおける インスリン投与が実験的歯周炎に及ぼす影響、第146回日本歯科保存学会春季学術大会、2017年
鈴木佑基、成瀬桂子、中村信久、宮部愛、宮島真一、菊池 毅、宮澤 健、後藤滋己、松原達昭、三谷章雄、Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide(GIP)による 歯周病抑制効果の検討、第23回日本歯科医学 会総会、2016年
Okabe I, Kikuchi T, Mogi M, Takeda H, Sasa K, Noguchi T, Mitani A, IL-15 and RANKL play a synergistically important role in osteoclastogenesis、2016 Annual Meeting of American Academy of Periodontology、2016年
菊池毅、岡部猪一郎、相野誠、神谷洋介、藤村岳樹、後藤久嗣、岡田康佑、黒須康成、茂木眞希雄、三谷章雄、破骨細胞原性に対する IL-15 と RANKL の相乗効果について、第143回日本歯科保存学会秋季学術大会、2015年
大野祐、山本弦太、西田英作、後藤久嗣、神谷洋介、菊池毅、山田章三、茂木眞希雄、三谷章雄、*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS は歯肉上皮細胞のアンジオポエチン用タンパク質2産生を誘導する、第143回日本歯科保存学会秋季学術大会、2015年
Suzuki Y, Nakamura N, Miyabe M,

Miyajima S, Adachi K, Mizutani M, Kikuchi T, Miyazawa K, Goto S, Tsukiyama K, Yamada Y, Ohno N, Mitani A, Matsubara T, Naruse K, Examination of the periodontal disease suppressor pathway by GIP, 75th American Diabetes Association, 2015 年

鈴木佑基、成瀬桂子、中村信久、西川 徹、宮島真一、足立 圭、水谷 誠、菊池 毅、宮澤 健、後藤滋己、大野紀和、野口俊英、松原達昭、三谷章雄、glucose-dependent insulinotropic polypeptide(GIP)は歯周炎を抑制する、第 58 回日本歯周病学会春季学術大会、2015 年

鈴木佑基、中村信久、小林泰子、宮部愛、西川徹、宮島真一、足立圭、水谷誠、菊池毅、宮澤健、月山克史、山田祐一郎、後藤滋己、大野紀和、野口俊英、三谷章雄、松原達昭、成瀬桂子、GIP による歯周炎抑制経路の検討、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、2015 年

宮島真一、成瀬桂子、中村信久、西川徹、足立圭、鈴木佑基、水谷誠、菊池毅、野口俊英、大野紀和、松原達昭、三谷章雄、歯周炎によって活性化された単核球が大動脈の炎症を惹起する機序の検討、第 57 回日本歯周病学会秋季学術大会、2014 年

鈴木佑基、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川徹、宮島真一、足立圭、水谷誠、菊池毅、宮澤健、月山克史、山田祐一郎、後藤滋己、大野紀和、三谷章雄、松原達昭、GIP は歯周炎を抑制する、第 57 回日本糖尿病合併症学会、2014 年

足立 圭、成瀬圭子、小林泰子、中村信久、西川 徹、宮島真一、鈴木佑基、水谷 誠、菊池 毅、大野紀和、松原達昭、野口俊英、糖尿病ラット歯周炎に対する poly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の効果、第 57 回日本歯周病学会春季学術大会、2014 年

鈴木佑基、成瀬桂子、小林泰子、中村信久、西川徹、宮島真一、足立圭、水谷誠、菊池毅、宮澤健、月山克史、山田祐一郎、後藤滋己、大野紀和、三谷章雄、松原達昭、GIP は歯周炎を抑制する、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、2014 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菊池 毅 (KIKUCHI, Takeshi)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：4 0 4 2 1 2 4 2

(2)研究分担者

松原 達昭 (MATSUBARA, Tatsuaki)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：3 0 2 0 9 5 9 8

成瀬 桂子 (NARUSE, Keiko)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：3 0 3 8 7 5 7 6

三谷 章雄 (MITANI, Akio)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：5 0 3 2 9 6 1 1

相野 誠 (AINO, Makoto)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号：2 0 5 7 2 8 1 1

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし