

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 718 号	論文提出者 鈴木 佑基
論文題目 Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)は歯周炎を抑制する	

I. 緒言

歯周病は糖尿病の慢性合併症の1つであり、健常人に比較し、1型および2型糖尿病患者では歯周病の発症率が高く、重症であることが示されている。糖尿病による高血糖状態の持続に起因する好中球の機能不全、コラーゲン合成阻害、歯根膜線維芽細胞の機能異常、終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) などによる炎症性組織破壊、微小循環障害、過剰な免疫反応などが、歯周病を増悪させると考えられている。近年、2型糖尿病のインスリン分泌障害に対する新たな治療戦略としてインクレチンと呼ばれるホルモンが注目されている。インクレチンとは、食事摂取に伴い消化管から分泌され、膵β細胞に作用してインスリン分泌を促進するホルモンの総称で、これまでにGIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) の2つのホルモンが確認されている。また、インクレチンは血中のブドウ糖濃度に依存して働くため、低血糖になるリスクが低く安全に食後高血糖を改善する事ができる。GIPは、インスリン分泌促進作用、膵β細胞容積の増加作用、グルカゴン分泌促進作用など膵内作用と、脂肪蓄積促進作用などの膵外作用が知られている。さらに脂肪細胞に対する抗炎症作用も報告されているが、他の組織に対しての抗炎症効果は明らかではない。本研究では、GIPの歯周炎に対する効果を検討する目的で、GIP受容体欠損マウス(KO)に実験的歯周炎を惹起し、歯周炎の状態を解析するとともに、GIPの抗炎症作用についてヒト急性単球性白血病細胞株であるTHP-1細胞を用いて検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物および実験方法

実験動物には8週齢雄性、C57BL/6J マウス (WT) (Chubu Kagaku Shizai, Nagoya, Japan) およびKOを用いた。すべてのマウスは、温度 (23±1.0 °C)、湿度 (45±10 %) とともに一定の恒温動物室で、12時間の明暗周期の環境下で飼育し、飲料水は水道水を自動供給装置によって与えた。

なお、全ての研究は、愛知学院大学動物実験委員会での動物実験倫理審査規定により承認され、愛知学院大学歯学部動物実験実施規程に従って行われた (動物実験計画承認番号: AGUD 190 号)。

2. 実験的歯周炎の誘導

歯周炎を惹起させる目的で、ジエチルエーテル全身麻酔下で、上顎右側第一臼歯 (M1) と上顎右側第二臼歯 (M2) 歯間部に出来るだけ歯肉に損傷を与えないようにリガチャーワイヤー (Nilaco Corporation Tokyo, Japan) を巻いて結紮し、歯周炎群 (n=9) とした。また、無処置のマウスを対照群 (n=9) とした。

3. 組織採取

実験的歯周炎を作製2週間後に、WT、KOともにペントバルビタール (Kyouritu Seiyaku, Tokyo, Japan) 投与 (1.5 mg/kg) により屠殺した。遺伝子解析用にM1-M2歯間部の歯周組織を採取し、液体窒素で急速に-80°C凍結保存した。

4. 歯周組織における病理組織学的解析

両側上顎を5%パラホルムアルデヒド溶液に24時間固定し、その後水洗を行い、液体窒素とイソペンタンを用いて、川本法 (未脱灰凍結切片作成法) に従い専用の包埋剤 (SCEM, Leica Microsystems, Tokyo, Japan) で包埋し、切片支持用粘着フィルム (Cryofilm type I, Leica Microsystems) と専用封入剤 (SCMM-R2, Leica Microsystems) を使用し、上顎第二臼歯を矢状断

方向に、厚さ $5\mu\text{m}$ で連続組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色および抗 Mac-1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を用いた免疫染色を施し、炎症性細胞を観察した。

5. 歯肉における遺伝子発現解析

歯間部歯肉の total RNA は、RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用い抽出した。Total RNA より、Superscript III RNase H-Reverse Transcriptase (Toyobo, Osaka Japan) を用いて cDNA を合成後、real-time PCR 法にて解析した。TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) および TaqMan probe (Applied Biosystems) を用い、 95°C 1 分、 52°C 1 分、 72°C 30 秒、40 サイクルの反応を ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) にて行った。データ解析は Ct 値の差から相対定量を行う $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により施行した。内在性コントロールとして β -actin 特異的プローブを用い、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、interleukin (IL)-1 α および IL-1 β 遺伝子の発現について検討した。

6. 細胞培養

ヒト単球系細胞である THP-1 細胞は、FBS (10% GIBCO-BRL, NY, USA) とペニシリン/ストレプトマイシン (50IU/mL GIBCO) を添加した RPMI1640 (GIBCO) 培地を使用し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーターにて培養した。無血清培地で 24 時間培養後、GIP (PEPTIDE, Osaka, Japan) を 10^{-7} ~ 10^{-9}M で添加し、30 分後、lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, Japan Tokyo) を 100ng/ml の濃度で添加・刺激した。刺激 4 時間後、PBS にて洗浄し、RNeasy (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、TNF- α および iNOS 遺伝子の発現解析を行った。また、THP-1 における LPS 誘導炎症性サイトカイン発現の GIP による抑制メカニズムを検討する目的で、cyclic AMP (cAMP)、protein kinase A (PKA) の阻害剤である MDL-12330A (Sigma-Aldrich) と PKI14-22 (Sigma-Aldrich) をそれぞれ使用した。阻害剤は、GIP を添加する 30 分前に添加した。

7. 統計学的解析

全ての値は、平均値 \pm 標準誤差で表し、統計学的解析は one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用いて統計学的に検討し、危険率は $P < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. 体重、血糖値

マウスの体重、血糖値はすべての群で有意差は認められなかったが、KO において、対照群に対し歯周炎群では白血球数の有意な増加 (KO 対照群; $4700 \pm 520 / \mu\text{l}$, KO 歯周炎群; $6770 \pm 470 / \mu\text{l}$, $P < 0.05$) を認めた。WT 歯周炎群と KO 歯周炎群間における白血球数の有意差は認めなかった。

2. 歯周組織における病理組織学的所見

歯肉における炎症性細胞浸潤を H-E 染色を行い評価した。WT 群および KO 群ともに対照群に比べて歯周炎群では炎症性細胞浸潤の増加を認め、KO 歯周炎群ではさらに顕著な炎症性細胞浸潤を認めた。

マクロファージの表面抗原のマーカーである Mac-1 を用いた免疫染色の結果から、WT 対照群における Mac-1 陽性細胞は観察されなかったが、WT 歯周炎群において留置したワイヤー周囲に陽性細胞 (WT 対照群; $25.0 \pm 7.3 / \text{mm}^2$, WT 歯周炎群; $159.4 \pm 21.7 / \text{mm}^2$, $P < 0.05$) が確認された。一方、KO 対照群では、歯周組織において少数の陽性細胞 (KO 対照群; $113.2 \pm 13.9 / \text{mm}^2$, $P < 0.01$ vs.

WT対照群)が確認され、KO歯周炎群では、ワイヤー周囲を中心に最も多くの陽性細胞(KO歯周炎群; $291.2 \pm 29.7 /\text{mm}^2$, $P < 0.01$)が確認された。

3. 歯肉における遺伝子発現

歯間部歯肉における遺伝子発現では、WT、KOともに歯周炎群でTNF- α およびiNOSの遺伝子発現が有意に増加した。また、WT歯周炎群と比較して、KO歯周炎群で有意にTNF- α およびiNOSの遺伝子発現の増加が認められた。IL-1 β の発現は、KOの対照群と比較して歯周炎群で有意に増加した。IL-1 α の発現は、いずれの群間においても有意差は認めなかった。

4. THP-1細胞における遺伝子発現

THP-1の遺伝子発現において、LPSを添加することでTNF- α 、iNOSの遺伝子発現が有意に増加した。LPSの刺激により増加したTNF- α 、iNOS遺伝子発現は、GIPの添加において濃度依存的に抑制された。この炎症性サイトカイン発現に対するGIPの抑制効果はcAMP阻害薬(MDL-12330A)およびPKA阻害薬(PKI14-22)の添加により阻害された。

IV. 考察

本研究では、歯周炎に対するGIPの抑制効果を明らかにする目的で、KOに歯周炎を惹起して検討した。KOでは、WTと比較して、歯周炎群における炎症性細胞浸潤の増加と炎症性サイトカインの発現増強が認められた。またTHP-1細胞を用いた*in vitro*の実験において、GIPがcAMPおよびPKA経路を介してLPSが誘導する炎症性サイトカインの発現を抑制することを確認した。

歯周病と糖尿病の関連については、疫学調査を中心とした多くの研究が行われている。歯周病は、細小血管症および大血管症に次ぐ注目すべき糖尿病合併症であると考えられている。血糖管理状態と歯周病の重症度に関する調査から、歯周病が重症であるオッズ比は、非糖尿病患者に対してHbA1c(NGSP)9.0%以上の2型糖尿病患者では2.90、9.0%未満の糖尿病患者では1.56である事が報告されている。また歯周病原細菌の感染に起因する歯周炎により、インスリン抵抗性が惹起され、血糖値が上昇すると考えられており、多くのコホート研究により、歯周病が糖尿病発症や血糖コントロールに影響を与える事が示されている。これらの事から、歯周病と糖尿病は互いに影響を及ぼす双方向性の関係にあることが示唆されているが、詳細なメカニズムは不明な点が多く、多くの課題が残されている。

本実験では、歯間部のワイヤー結紮により実験的歯周炎を惹起させた。このリガチャーワイヤー誘導性歯周炎モデルはヒトの歯周炎の病態に近い歯周炎モデルとして報告されている。このモデルを用いて、GIPシグナルの欠損によって歯周炎が悪化することを明らかにした。実験的歯周炎を惹起したKOにおいて、ワイヤー周囲の歯周組織で、炎症性細胞浸潤の増加を伴う重度の歯周炎が観察された。歯肉の炎症性サイトカイン発現に関しては、WT歯周炎群と比較してKO歯周炎群で有意に増加した。

炎症細胞を活性化し、炎症性サイトカイン分泌を誘導する歯周病原細菌のLPSが歯周炎の発症や進行に深くかかわっている。本研究では、GIP濃度依存性にTHP-1細胞にLPS刺激を与えると、炎症性サイトカインの遺伝子発現が抑制されたことから、グラム陰性細菌感染におけるGIPの抗炎症効果が示唆された。さらに、GIPは、cAMPおよびPKAを介して、LPS誘導性のTNF- α およびiNOSの発現を抑制していることが認められた。これらの結果から、歯周炎におけるGIPの抗炎

症作用が示唆された。

GIP は前述した通り脂肪蓄積促進作用があり、脂肪蓄積はアディポサイトカインの産生を促し、慢性炎症を引き起こすと考えられている。実際、GIP の投与により、肥満群の皮下脂肪組織における炎症性ケモカインおよびサイトカイン、特に MCP-1 の遺伝子発現を増加させ、また、*in vitro* の実験においても、GIP がヒトマクロファージおよび脂肪細胞との共培養条件下で MCP-1 転写因子の発現を増加させると報告されている。一方、動脈硬化症モデルマウスである ApoE 欠損マウスに GIP を投与する事で、コレステロールエステル蓄積の減少等を介して、慢性炎症性病変である動脈硬化が抑制された結果や、食餌誘導性肥満マウスに長期間 GIP を投与すると脂肪組織における単球浸潤や炎症性サイトカインの発現が抑制され、炎症の改善が認められた研究が報告されている。これらの過去の報告において、GIP の炎症/抗炎症作用には相反する報告もあるが、本研究の結果は、歯周組織において GIP が炎症を抑制する可能性が示唆された。

本実験から、GIP の本来のインクレチン作用であるインスリン分泌促進による糖尿病改善効果だけではなく、GIP が歯周炎に対して抗炎症作用を有する事により、2 型糖尿病を罹患する歯周炎患者に対し有効な治療戦略となる可能性が示唆された。しかし、その炎症抑制メカニズムの詳細は未だ不明な点も多く、さらなる研究が必要であると考えている。

V. まとめ

KO における歯周炎は、WT 歯周炎と比較し、歯肉における TNF- α および iNOS 遺伝子発現の有意な増加と炎症性細胞浸潤、Mac-1 陽性細胞の増加を認めた。また、GIP は LPS 刺激により増加した TNF- α 、iNOS の遺伝子発現を濃度依存性に抑制した。その抑制のメカニズムとして cAMP および PKA の関与が示唆された。

GIP は歯周炎に対する抗炎症作用を有することが明らかとなり、新たな治療戦略となる可能性が示唆された。