

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 号	論文提出者 澤田 憲孝
論文題目 Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の膵外作用を介した新規歯周炎治療法の検討	

I. 緒言

歯周炎は、歯周ポケット内に存在する細菌の持続的感染によって歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である。グラム陰性嫌気性菌である歯周病原細菌や、その代謝産物と生体細胞との相互作用により炎症反応が亢進し、歯肉の炎症が遷延化した結果、歯槽骨の吸収が引き起こされる。また、歯周炎の進展には炎症性因子や外傷性因子といった局所的要因のみでなく、種々の全身的要因、環境的要因などが関与している。

一方、世界的に増加の一途をたどる糖尿病は、インスリンの作用不足による慢性の高血糖状態を主徴とする代謝疾患群である。1型糖尿病は、インスリンを合成・分泌する膵ランゲルハンス島β細胞の破壊・消失によるインスリンの絶対的不足が病因である。2型糖尿病は、過食、肥満、運動不足、ストレスなどの環境因子及び加齢などによりインスリン分泌低下やインスリン抵抗性をきたし発症する。

歯周病は糖尿病の慢性合併症の1つであり、1型および2型糖尿病患者では健常人に比較し歯周病の発症率が高く、重症であることが示されている。その理由として、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、たんぱく質の糖化反応に伴って生成される終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) などの増加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が、詳細な部分では不明な点が多い。

近年、2型糖尿病のインスリン分泌障害に対する治療戦略としてインクレチンと呼ばれるホルモンが脚光を浴びている。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 insulinotropic polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) の2つが確認されている。インクレチンは膵β細胞からインスリン分泌を促進する作用以外に、GIPについては栄養素を脂肪細胞に蓄積する作用や、骨芽細胞の機能を高めて骨へカルシウムを蓄積する作用など、GLP-1についてはグルカゴン分泌抑制作用、食欲抑制作用、胃排泄遅延作用、抗炎症作用などの膵外作用が明らかにされている。GLP-1受容体作動薬は、心臓、脳、腎臓、肝臓、膵臓、皮膚、精巣を含む複数の臓器で抗炎症作用を有すると報告されているが口腔組織に関する報告はいまだ十分とはいえない。

本研究では、GLP-1の歯周炎に対する抗炎症効果を検討する目的で、実験的歯周炎を惹起させたラットにGLP-1受容体作動薬を投与し歯周炎の状態を解析するとともに、GLP-1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細胞を用いて実験を行った。

II. 対象および方法

1. 実験動物および実験方法

実験動物には5週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラット (Chubu Kagaku Shizai, Nagoya) を用いた。全てのラットは、温度 (24±1.0℃)、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: AGUD429号)。

2. 実験的歯周炎の誘導

三種混合麻酔(塩酸メデトミジン(Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo)、ミダゾラム(Astellas Pharma Inc., Tokyo)、酒石酸ブトルフェノール(Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo))下で、上顎両側第二臼歯の歯頸部全周に歯肉に損傷を与えないよう配慮しながら縫合用ナイロン糸(3-0 Surgilon, Tyco Healthcare, Princeton, NJ, USA)を巻き、近心口蓋で結紮し歯周炎を惹起させ歯周炎群(n=20)とした。また、無処置のラットを対照群(n=10)とした。

3. GLP-1 受容体作動薬の投与

ナイロン糸を留置した同日から、半数の歯周炎群に GLP-1 受容体作動薬であるリラグルチド(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark) (0.03 mg/kg/day) を浸透圧ポンプ(alzet; Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) (pumping rate 0.5 μ L/h) を用いてラットの背部皮下に埋入し、14日間持続投与した。なお、リラグルチドの希釈には生理食塩水を用いた。また、対照群には同様に浸透圧ポンプを用いて生理食塩水を投与した。

4. 組織採取

実験的歯周炎を惹起し14日後に対照群、歯周炎群ともにCO₂により屠殺した。両側上顎を採取し、病理組織学的解析およびmicro CTを用いた歯槽骨の形態学的解析に供した。また、遺伝子解析用に第二臼歯周囲の歯肉を採取し、液体窒素で急速凍結し、-80°Cで保存した。

5. 歯周組織における病理組織学的解析

両側上顎を4%パラホルムアルデヒド溶液で12時間固定し、その後水洗を行い、10%EDTA溶液で5週間脱灰後、パラフィン包埋を行った。上顎第二臼歯を前頭断方向に、厚さ5 μ 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iNOS抗体(Bioss, Boston, USA)を用いた免疫組織染色を施し、iNOS陽性細胞を計測した。また、同組織を用いてtartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色、alkaline phosphatase (ALP) 染色を施し、破骨細胞活性および骨芽細胞活性を評価した。TRAP染色では、3つ以上の核を有する多核細胞をTRAP陽性細胞として計測した。ALP染色では画像解析ソフトであるImageJ(National Institute of Health, Bethesda; NIH, MD, USA)を用いて定量化した。

6. 歯肉における遺伝子発現解析

歯肉のtotal RNAはRNeasy(Qiagen, Valencia, CA, USA)を用い抽出した。Total RNAより、ReverTra Ace(Toyobo, Osaka)を用いてcDNAを合成した。Real-time PCRは95°C1分、52°C1分、72°C30秒、50サイクルの反応をABI Prism 7000(Applied Biosystems; Foster City, CA, USA)を用いて解析した。iNOS(*Nos2*)、TNF- α (*Tnf*)、CD11c(*Itgax*)、CD206(*Mrc1*)に対する、TaqMan Gene Expression AssayプライマーとプローブはApplied Biosystemsから購入した。内在性コントロールとして β 2 microglobulinを用いて $\Delta\Delta$ Ct法で計算した。

7. Micro CTによる歯槽骨の撮影

Micro Computer Tomography (Cosmo Scan GX; Rigaku Corporation, Tokyo, Japan) を使用し、実験的歯周炎による歯槽骨の形態学的変化を確認した。撮影条件は管電流 88 mA、管電圧 90 kV、撮影時間は 2 分間とし、50 μ m の幅で断層撮影を行った。撮影した画像は画像解析ソフト (TRI/3D Bone, RATOC System Engineering, Tokyo, Japan) を用い、コンピューター上で三次元構築第二臼歯における矢状断像を作成後、最も骨欠損が生じた部分の歯槽骨頂からセメントエナメル境までの距離を計測した。

8. THP-1 細胞における遺伝子発現解析

ヒト単球系細胞である THP-1 細胞は fetal bovine serum (FBS; 10%, GIBCO-BRL, NY, USA) とペニシリン/ストレプトマイシン (50 IU/mL, GIBCO) を添加した RPMI1640 (GIBCO) 培地を使用し、37°C、5%CO₂ 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、GLP-1 (PEPTIDE, Osaka, Japan) を 10⁻⁹~10⁻¹¹ M で添加し 30 分後、lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich, Japan, Tokyo) を 100 ng/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、cDNA を合成し、real-time PCR 法にて TNF- α (*TNF*) 及び iNOS (*NOS2*) 遺伝子の発現解析を行った。TaqMan Gene Expression Assay プライマーとプローブは Applied Biosystems から購入した。内在性コントロールとして β 2 microglobulin を用いて $\Delta\Delta$ Ct 法で計算した。

9. 統計学的解析

全ての値は、平均値±標準誤差 (S. E.) で表し、統計学的解析は one-way ANOVA と Bonferroni multiple comparison test を用いて行い、 $P < 0.05$ をもって有意差とした。

III. 結果

1. 各群の体重および血糖値

処置前の体重、および歯周炎惹起 14 日後の体重と血糖値を比較した。ラットの体重、血糖値は、正常群、歯周炎群、リラグルチド投与歯周炎群において有意差は認められなかった (表 1)。

2. 歯周組織における病理組織学的所見

歯周炎惹起 2 週間後の歯肉における炎症の状態を解析した。ナイロン糸を留置した直下の歯周組織における炎症性細胞浸潤を H-E 染色を行い評価した。対照群と比較し歯周炎群では炎症性細胞浸潤の増加を認めたが、リラグルチドの投与により炎症性細胞浸潤の減少を認めた (図 1 b)。

炎症反応のマーカーとして抗 iNOS 抗体を用いた免疫組織染色を行い、陽性細胞数を測定した。対照群と比較し歯周炎群では iNOS 陽性細胞数が 3.3 倍増加したが、リラグルチドの投与により陽性細胞数が 40% 減少した (図 1 b、c)。

破骨細胞活性マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼの検出のため TRAP 染色を、骨芽細胞活性マーカーであるアルカリホスファターゼ検出のため ALP 染色をそれぞれ行い、歯槽骨の状態を解析した (図 2)。対照群と比較し歯周炎群では TRAP 陽性細胞数が 8.7 倍増加したが、リラグルチドの投与により陽性細胞数が 42.1% 減少した。一方 ALP 染色においては、対照群と比較し歯周炎群では ALP 活性が増強傾向であったが有意な差は認めなかった。歯周炎群とリラグル

チド投与歯周炎群の比較においても、リラグルチド投与により ALP 活性が減弱傾向であったものの有意差は認めなかった (図 2 b、c)。

3. 歯肉における遺伝子発現解析

歯肉における炎症性因子の産生を確認するため、iNOS (NO 合成酵素) 及び TNF- α の発現を確認した。第二臼歯周囲歯肉における遺伝子発現では、対照群と比較し歯周炎群において iNOS 遺伝子発現が 450 倍、TNF- α 遺伝子発現が 6 倍増加したが、リラグルチドの投与により iNOS 遺伝子発現が 92% 及び TNF- α 遺伝子発現が 72% 減少した (図 3 a、b)。

次に、歯肉におけるマクロファージの極性を確認する目的で炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) マーカーの CD11c と抗炎症性マクロファージ (M2 マクロファージ) マーカーの CD206 の遺伝子発現を確認したところ、CD11c 発現は対照群と比較し歯周炎群で有意に増加し、リラグルチドの投与により有意に減少した。一方で、CD206 発現には有意な差は認められなかった (図 3 c、d、e)。この結果より歯周炎におけるリラグルチドの投与は炎症性マクロファージである M1 マクロファージを減少させることで、M1 / M2 比が低下し炎症を抑制していることが示唆された。

4. 実験的歯周炎による歯槽骨吸収の評価

歯周炎による歯槽骨吸収に与えるリラグルチドの影響を検討する目的でナイロン糸を留置した第二臼歯部において、最も骨欠損が生じている部分の歯槽骨頂からセメントエナメル境までの距離を測定した。対照群と比較し歯周炎群では歯槽骨の吸収が 1.8 倍認められたが、リラグルチド投与群では歯槽骨吸収が 18% 抑制された (図 4 a、b)。

5. THP-1 細胞における遺伝子発現解析

LPS 刺激により、THP-1 細胞における TNF- α 及び iNOS の遺伝子発現は有意に増加した。GLP-1 の添加は、LPS 刺激により増加した TNF- α 及び iNOS 遺伝子発現を濃度依存的に抑制した (図 5)。

IV. 考 察

本研究では、歯周炎に対する GLP-1 の抗炎症作用について検討した。歯周炎群へのリラグルチド投与により、歯肉における炎症性細胞浸潤の減少と炎症性因子の発現低下、及び歯槽骨の吸収抑制が認められた。

歯周炎とインクレチンの関連については、GIP 受容体ノックアウトマウスにおける実験的歯周炎が野生型マウスと比較し、歯肉にマクロファージが集積し重症化していることが明らかになっている。GIP 受容体作動薬は現在臨床試験中であり、現時点では治療に用いられていない。一方、GLP-1 受容体作動薬は 2 型糖尿病患者の治療に広く用いられている。厚生労働省が行った 2017 年患者調査では、患者数第 1 位が高血圧性疾患、第 2 位が歯周病、第 3 位が糖尿病、第 4 位が脂質異常症と報告されている。これら上位の疾患の中でも糖尿病や肥満は歯周病の全身的な病因となり、直接的に歯周病の病態を修飾している。特に歯周病と糖尿病の関連は認知が広がってきており、双方向性の影響、両疾患の罹患率の高さ、糖尿病合併症の QOL に及ぼす影響、医療経済的観点からも、双方を治療できる薬剤が開発されることは大変意義のあるものと考えられる。

2018年にアメリカ糖尿病学会(ADA)とヨーロッパ糖尿病学会(EASD)が発表したコンセンサスガイドラインでは心血管疾患や慢性腎臓病といった合併症を考慮した薬剤選択が推奨されるようになった。GLP-1受容体作動薬は合併症を有している際に投与が推奨される薬剤の1つであり、心血管疾患に有効性が認められた他に、欧米では抗肥満薬としても適応がある。本研究では、GLP-1受容体作動薬であるリラグルチドが血糖降下作用とは無関係に実験的歯周炎の進行を抑制することを示した。このことから、リラグルチドを服用している患者の歯周炎治療の効果を向上させることが示唆された。現在、医科と比較し歯科は疾患に対する治療薬の開発が遅れているが、GLP-1の歯周炎に対する有益な効果は歯周炎に対する新たな治療戦略の可能性を示している。

炎症性細胞を活性化し、炎症性因子分泌を誘導する歯周病原細菌のLPSは歯周炎の発症や進行に深く関わっている。すでにGIPにおいては、LPS刺激を与えたTHP-1細胞の炎症性因子の発現がGIPの添加で抑制され抗炎症作用を示したことが報告されている。本研究においてもTHP-1細胞においてLPS刺激より増加した炎症性因子の遺伝子発現が、GLP-1により有意に抑制されたことから、グラム陰性細菌感染におけるGLP-1の抗炎症効果が示唆された。GLP-1受容体作動薬の抗炎症作用は、様々な細胞や疾患モデルで実証されている。リラグルチドでは血管内皮細胞および単球におけるLPS誘導TNF- α の発現を阻害したと報告されている。また、他のGLP-1受容体作動薬であるエキセナチドは脳の損傷時におけるTNF- α およびIL-1 β の過剰発現を有意に減少させ、高脂肪食誘発性肥満マウスの精巣におけるTNF- α およびMCP-1レベルとF4/80発現を抑制した。口腔組織においては、エキセナチドが歯肉におけるIL-1 β 、iNOSおよびMMP-9の遺伝子発現を減少させたことが報告されている。

マクロファージは、組織中において炎症促進に働くM1型と炎症抑制に働くM2型に分極して存在することが知られている。マクロファージは、単球がTNF- α 、IFN- γ 、細菌産物によって刺激されることでM1状態に分化し、IL-4、IL-3、IL-10によって刺激されることでM2状態に分化する。歯周組織におけるマクロファージの極性は動物モデルとヒトの歯周炎研究の多くで、歯周炎ではM1マクロファージが優勢であり、M1/M2比が増加することを示している。一方で、歯肉内のマクロファージの極性が健常者と歯周炎患者で類似しているとの報告も存在する。今回の研究では歯周炎ではM1マクロファージが有意に増加し、M2マクロファージにおいては有意な変化が認められないことを示した。また、M1/M2比も正常組織と比較して歯周炎の組織で有意に増加していた。リラグルチドの投与は、歯周炎組織におけるM1マクロファージを有意に減少させ、M1/M2比を低下させており、これは過去の報告と部分的に一致する結果であった。GLP-1はマクロファージ様細胞株であるRAW264.7細胞において、cAMP/PKA経路を介してM1の活性化を阻害し、M2の活性化を誘導することが報告されている。別のGLP-1受容体作動薬であるリキシセナチドは、アテローム中のM1マクロファージの減少とM2マクロファージの増加により抗動脈硬化作用を示した。これらの結果より、GLP-1受容体作動薬の抗炎症作用は、クラスエフェクトと考えられた。

炎症性サイトカインであるTNF- α は破骨細胞の分化・誘導にも関わることから、GLP-1の抗炎症作用は破骨細胞形成の低下にも重要な役割を果たしている可能性がある。実際、GLP-1受容体の発現はヒト骨芽細胞株だけでなく、マウスの骨芽細胞や破骨細胞においても確認されている。骨粗鬆症の動物モデルではGLP-1受容体作動薬は骨の微小構造を改善させ、骨吸収を抑制したと示されている。今回の結果では歯周炎群において歯槽骨の破骨細胞形成が亢進していた。また、

炎症性骨吸収が生じる病変部周辺では ALP の発現が増加するという報告が存在することから、炎症性病変部周辺の骨においては骨代謝が促進されている可能性がある。本実験では歯周炎によって破骨細胞形成が亢進したが、骨芽細胞形成の亢進は傾向を認める程度にとどまった。同様にリラグルチドの投与による変化として破骨細胞形成の低下は認めたが、骨芽細胞形成には有意な変化は認められなかった。このことから、歯周炎における歯槽骨に対するリラグルチドの影響は主に破骨細胞形成の低下によるものと示唆された。

本実験から、GLP-1 は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とは別に、歯周炎改善作用を有することにより、GLP-1 受容体作動薬が 2 型糖尿病に罹患した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。

V. まとめ

GLP-1 は、THP-1 細胞における LPS 誘導 TNF- α および iNOS 遺伝子発現を有意に抑制した。実験的歯周炎群に対するリラグルチド投与により、歯肉における炎症性細胞浸潤の減少と、TNF- α および iNOS 遺伝子発現の有意な減少を認めた。さらに、歯槽骨ではリラグルチド投与により炎症に伴う歯槽骨吸収が抑制され、破骨細胞活性の有意な減少を認めたが、骨芽細胞活性に有意な差は認めなかった。

以上より、GLP-1 受容体作動薬の腭外作用として歯周炎を抑制することが明らかとなり、今後、歯周炎に対する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。