

## 論文内容要旨

## 題 目

High Glucose-Mediated Cytokine Regulation in Gingival Fibroblasts and THP-1 Macrophage: a Possible Mechanism of Severe Periodontitis with Diabetes

(高グルコースによる歯肉線維芽細胞とTHP-1マクロファージのサイトカイン制御:糖尿病患者における歯周病重症化機序)

## 著 者

Jung-Hwan Lew, Koji Naruishi, Yukari Kajiura, Yasufumi Nishikawa, Takahisa Ikuta, Jun-ichi Kido, Toshihiko Nagata.

## 内容要旨

## 【背景・目的】

歯周病は慢性炎症性疾患であり、様々な細胞が相互に作用して病態が形成される。歯科領域では、以前から糖尿病患者の歯周病は重症化することが知られているが、その細胞生物学的な病態機序は不明である。そこで本研究では、糖尿病患者に見られる歯周病の重症化機序を探索することを目的とし、まず歯周病および糖尿病関連因子の統計学的関連性の有無を横断的に検討した(臨床研究)。さらに、歯肉線維芽細胞とマクロファージ(M $\phi$ )のクロストークにおける高グルコースの影響を調べた(基礎研究)。

## 【方法】

1. 対象 徳島大学病院歯周病科を受診した70名の慢性歯周炎患者(男35名,女35名)(糖尿病のため内科受診中の患者:男19名,女14名を含む)とした。なお,本研究は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会において承認された(受付番号2325)。
2. 臨床指標 歯周病関連の臨床指標は,歯の総数,プロービング時出血,歯周ポケット深さ,そして最深ポケット部位におけるGCF中のIL-1 $\beta$ ,可溶性IL-6レセプター(sIL-6R)およびカルプロテクチン(CPT)レベルとした。糖尿病関連の臨床指標は,随時血糖値,HbA1cとした。また皮下の推定AGEレベルであるSkin AF値をAGE Reader<sup>®</sup>(Neuroscience)を用いて測定した。
3. 統計解析 各群間の統計学的関連性は,Mann-Whitney U検定およびPearson's correlation coefficient検定を用いて検定した。P値が0.05未満の場合を有意差ありと判定した。
4. 細胞 ヒト末梢血単球THP-1(ATCC)を100 nM PMAでM $\phi$ 化したTHP-1 M $\phi$ およびヒト歯肉線維芽細胞CRL-2014<sup>TM</sup>(ATCC)を用いた。培養は,通常のグルコース濃度(5.5mM)をNormal glucose(NG),高グルコース濃度(25mM)をHigh glucose(HG)とした。なお,浸透圧コントロールとして,NGに19.5mMのマニトールを添加した調製した群をMN群として実験系に加えた。
5. 試薬 リコンビナントヒトCPT,IL-1 $\beta$ ,IL-6,sIL-6RおよびIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)はR&Dから購入した。TACE阻害剤TAPI-1はCalbiochemから購入した。
6. 炎症関連因子の産生性の検討 THP-1 M $\phi$ およびヒト歯肉線維芽細胞の炎症関連因子の産生レベルは,ELISAキット(R&D)を用いて測定した(標的:IL-1 $\beta$ ,IL-6,sIL-6R,MMP-1,TIMP-1およびVEGF)。
7. 細胞内シグナル伝達系の検討 ヒト歯肉線維芽細胞において,IL-1 $\beta$ およびIL-6+sIL-6R刺激によるI $\kappa$ B $\alpha$ ,p44/42 MAPKのリン酸化誘導の有無は,通法にしたがいウエスタンブロット法で検討した。

## 【結果】

1. 糖尿病患者群と非糖尿病患者群との間におけるSkin AF値に有意差はなかった(P=0.34)。
2. 最深ポケット部位におけるGCF中のIL-1 $\beta$ とsIL-6Rレベルは,糖尿病患者のHbA1c値と有意な相関が見られた(IL-1 $\beta$ :P=0.035,sIL-6R:P=0.040)。
3. HGとCPTは,THP-1 M $\phi$ のsIL-6R産生を有意に誘導した。
4. HGは,歯肉線維芽細胞のIL-1 $\beta$ およびIL-6+sIL-6RによるMMP-1の産生誘導を有意に促進した。このMMP-1産生の誘導はMAPKおよびNF- $\kappa$ B系を阻害することで有意に抑制された。
5. HGは,歯肉線維芽細胞のIL-1 $\beta$ およびIL-6+sIL-6RによるI $\kappa$ B $\alpha$ ,p44/42 MAPKのリン酸化を著しく増強した。
6. HG下で培養したTHP-1 M $\phi$ の培養上清によって,歯肉線維芽細胞のMMP-1産生は有意に誘導された。このMMP-1産生はIL-1raによって有意に抑制された。

## 【考察及び結論】

好中球などから産生されるCPTは,M $\phi$ に作用してIL-1 $\beta$ やsIL-6Rの産生を誘導し,それらの炎症関連分子の相互作用によって歯肉線維芽細胞のMMP-1産生が誘導され,歯周組織の破壊が起こること,そしてこの線維芽細胞とM $\phi$ のクロストークは,高グルコース状態にある歯周組織では,さらに増強され,結果的に糖尿病患者において歯周病の重症化が生じる可能性が示唆された。