

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者	足立 圭
論文題目	糖尿病ラット歯周炎に対する poly (ADP-ribose) polymerase 阻害薬の効果

## I. 緒言

う蝕とともに歯科における 2 大疾患とされる歯周病は、歯周ポケット内に存在する細菌の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、炎症反応が亢進する結果、歯肉の炎症や歯槽骨の吸収が進行する。症状が重篤化すると歯は動揺し、支持を失った歯は脱落する。歯周病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。全身的要因の 1 つと考えられる糖尿病は、疫学的研究を中心に検討され、歯周病と密接に関係していることが明らかにされつつある。

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。糖尿病合併症は、高度のインスリン作用不足によって起こる急性合併症と、長年の高血糖によって起こる慢性合併症に分類され、糖尿病の慢性合併症の一つに歯周病がある。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組織に影響を与え、歯周病を増悪させると考えられている。

核内酵素である poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) は DNA 傷害の際に活性化され、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) を基質とし、その

ADP リボースユニットを種々のタンパク質に転移させるとともに、この転移された ADP リボースユニットに新たな ADP リボースユニットを転移させる反応を触媒する酵素で、転移反応に伴いニコチンアミドを遊離させる。PARP は傷害部 DNA に接着し、DNA 修復を促進する。しかしながら、高血糖状態の持続や歯周病原細菌による細菌感染によって引き起こされる酸化ストレスにより、過度の DNA 傷害が起こると、PARP が過剰に活性化され、 $\text{NAD}^+$  の過剰消費によりレドックスサイクルが円滑に稼働できなくなる。そのため、細胞内エネルギーの枯渇が起こり、細胞死を引き起こし、さらなる合併症の悪化がもたらされると考えられている。糖尿病ラットにおいては、PARP の活性化による組織障害が、網膜症、神経障害、腎症などの発症・進展に影響することが報告されている。

今回、糖尿病状態が歯周炎を増悪させるメカニズムとして想定される、PARP 活性亢進の関与を明らかにする目的で、糖尿病ラットに歯周炎を惹起し、PARP 阻害薬投与による歯周炎抑制効果について検討した。その結果、正常ラット歯周炎側に比較し、糖尿病ラット歯周炎側において、炎症反応の亢進および有意な歯槽骨吸収が認められた。PARP 阻害薬の投与は歯周炎を改善し、その効果は糖尿病ラットにおいてより顕著であった。こうした事実は、糖尿病における歯周炎の悪化に、PARP の活性化が関与していることを示唆するものである。

## 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5週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。

### 2. 糖尿病の誘導

糖尿病は streptozotocin (STZ) を腹腔内投与し、誘導した。STZ 投与1週間後に血糖値を測定し、10 mmol/l 以上のラットを糖尿病ラットとして用いた。

### 3. 歯周炎の誘導

糖尿病誘導 2週間後に歯周炎を惹起させる目的で、上顎右側第二臼歯 (M2) の歯頸部に歯肉に損傷を与えないように縫合用ナイロン糸を全周に巻いて、近心口蓋側で結紮し、実験側とした。また、反対側の M2 は無処置で対照側とした。

### 4. PARP 阻害薬の投与

ナイロン糸を留置した翌日から、半数の正常ラットおよび糖尿病ラットに PARP 阻害薬 (1,5-Isoquinolinediol; ISO) を腹腔内に2週間連日投与した。ISO は疎水性のため Dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解し、生理食塩水で20倍希釈した。対照群には DMSO を20倍希釈した生理食塩水を投与した。

### 5. 歯肉における組織血流の測定

歯肉組織における血流は Laser Doppler Blood Flow Meter を用いて測定した。レーザープローブを実験側および対照側 M2 の頬側歯肉の直上に固定

し、測定した。全ての計測は直腸温を 37 °C に維持するために室温 25 °C、ヒートパッド上で行った。

## 6. 組織採取

実験的歯周炎誘導 2 週間後に、正常ラット、糖尿病ラットともにペントバルビタール腹腔内投与により屠殺した。両側上顎を採取し病理学的解析および micro CT を用いて解析をした。

## 7. 歯肉における病理組織学的解析

川本法(未脱灰凍結切片作成法)に従い専用の包埋剤 (SCEM) で包埋し、切片支持用粘着フィルム (Cryofilm type I)、専用封入剤 (SCMM-R2) を使用し、M2 を頬舌方向に、厚さ 5  $\mu\text{m}$  で連続凍結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) 染色を施し、炎症性細胞浸潤を観察した。

## 8. Micro CT による歯槽骨の撮影

Micro Computer Tomography 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、M2 について 50  $\mu\text{m}$  の幅で断層撮影を行った。画像再構成ソフトには、i-view タイプ R を使用した。得られたデータは ATLAS volume tiff converter を用いて CT 値を校正した。校正は air が -1000 HU、使用したテフロン棒の CT 値が 20 HU であることから、この 2 点を基準とした。撮影した画像は、画像解析ソフトを用い、コンピューター上で三次元構築し、

M2 近心根における矢状断像を作成後、セメントエナメル境から近心頬側根における歯槽骨頂までの距離を計測した。

## 9. 統計学的解析

全ての値は、平均値±標準誤差で表した。統計学的解析は one-way ANOVA と Bonferroni's multiple comparison test に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

糖尿病ラットは正常ラットに比較し有意な体重減少と血糖値の上昇を認めた。しかしながら、PARP 阻害薬の投与は正常ラットおよび糖尿病ラットとも体重および血糖値に影響を与えなかった。

### 2. 歯肉における組織血流

糖尿病ラット対照側における歯肉組織内血流は正常ラットの対照側に比較し、有意に低下していた。PARP 阻害薬の投与は低下した糖尿病ラット対照側の歯肉組織内血流を正常ラットレベルにまで改善した。正常ラット、糖尿病ラットともに歯周炎の惹起は、対照側に比較し、有意に歯肉組織内血流を増加させた。歯周炎側においては、正常ラットおよび糖尿病ラットともに PARP 阻害薬投与の影響は認められなかった。

### 3. 歯肉における病理組織学的所見

歯肉上皮下結合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。正常ラットの対照側では、炎症性細胞浸潤は認められないが、歯周炎の惹起により炎症性細胞浸潤を認めた。糖尿病ラットでは、歯周炎を惹起することにより、対照側に比べ、著明な炎症性細胞浸潤の増加を認めた。PARP 阻害薬を投与することにより、正常ラットおよび糖尿病ラットともに炎症性細胞浸潤の減少が認められたが、糖尿病ラットにおいては顕著に減少した。

#### 4. 実験的歯周炎による歯槽骨吸収

正常ラットおよび糖尿病ラットともに歯周炎側は対照側と比較して有意な歯槽骨の吸収がみられた。さらに、正常ラットの歯周炎側と比較し、糖尿病ラット歯周炎側において歯槽骨吸収の有意な増加が認められた。PARP 阻害薬の投与は、正常ラットおよび糖尿病ラットともに歯槽骨吸収を有意に抑制したが、その程度は糖尿病ラットにおいてより減少していた。

#### IV. 考察

本研究により、糖尿病ラットでは正常ラットに比較し、歯周炎誘導による炎症性細胞浸潤が亢進しており、有意な歯槽骨吸収の増加が認められた。PARP 阻害薬は、歯周炎誘導による炎症性細胞浸潤や歯槽骨吸収を抑制し、その抑制効果は糖尿病ラットにおいてより顕著であった。

歯周病原細菌の感染は酸化ストレスを増大し、PARP を活性化すると考えられている。PARP 活性の過剰亢進は  $\text{NAD}^+$  を消費し、細胞内エネルギー

を枯渇させ細胞死を誘導する。これまでに PARP 阻害薬の投与は、ラット歯周炎において血管内皮細胞の細胞死や、血管透過性の亢進を減少させ、歯肉における炎症および歯槽骨吸収を抑制することが報告されている。すなわち、PARP の活性化は歯周炎の増悪において大きな役割を果たしていると考えられる。

一方で、高血糖に起因する酸化ストレスの亢進を介した PARP の活性化は、網膜症、神経障害、腎症など糖尿病合併症の発症・進展と密接に関連することが報告されている。PARP 活性化による NAD<sup>+</sup> の過剰消費は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の機能の低下を介して、ポリオール経路、AGE 経路、プロテインキナーゼ C、ヘキサミン経路を活性化し、糖尿病合併症の発症・進展に関与すると考えられている。

Nishikawa らは、糖尿病ラットにおいて歯肉組織内血流が減少することを報告した。今回の検討においても、糖尿病ラット対照側における歯肉組織内血流は、正常ラット対照側に比較し有意に低下していた。本研究において PARP 阻害薬の投与は、糖尿病ラットで低下した歯肉組織内血流を正常ラットレベルにまで改善させており、糖尿病における歯肉の血流低下に PARP の活性亢進が関与していることを示唆した。歯周炎の誘導は、正常ラットおよび糖尿病ラットにおける歯肉組織内血流を増加させた。血流の増加は炎症に関連していると考えられるが、PARP 阻害薬は歯周炎による歯肉組織内血流の増加には影響を与えなかった。その機序については、今後さ



らなる検討が必要と考えられる。

本研究において、糖尿病ラットにおける歯周炎は、正常ラット歯周炎と比較すると、有意に歯周炎が増悪していた。PARP 阻害薬の投与は、正常ラット歯周炎、糖尿病ラット歯周炎いずれに対しても改善効果を認めたが、糖尿病ラット歯周炎においてその効果はより大きく、糖尿病における歯周炎の増悪に対し、PARP 阻害薬が有効であることが明らかとなった。

#### V.まとめ

本研究は、糖尿病における歯周炎に対し、PARP 阻害薬が有効であることを示した最初の報告である。糖尿病ラット歯周炎では、正常ラット歯周炎と比較し著明な炎症性細胞浸潤と有意な歯槽骨吸収の増大を観察した。PARP 阻害薬の投与は、歯周炎を改善するが、その効果は糖尿病ラットにおいてより顕著であり、糖尿病状態における歯周炎の悪化に PARP の活性化が大きな役割を果たしている可能性を示唆した。本研究により、PARP 活性化の抑制が、糖尿病における歯周炎の治療戦略となる可能性が示唆された。