

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

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

歯周病は糖尿病の慢性合併症の1つであり、1型及び2型糖尿病患者では健常人に比較し歯周病の発病率が高く、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、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治療戦略としてインクレチ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。GLP-1 はインスリン分泌促進作用、グルカゴン分泌抑制作用など膵内作用と、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を有することが明らかとなっている。中でも、抗炎症作用については GLP-1 受容体作動薬の使用により複数の臓器で確認されているが、口腔組織に関する報告はいまだ十分とは言えない。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5週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。

2. 実験的歯周炎の誘導

歯周炎を惹起させる目的で上顎両側第二臼歯の歯頸部全周に縫合用ナイロン糸 (3-0 Surgilon) を巻き、近心口蓋で結紮し歯周炎群 (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 (0.03mg/kg/day) を浸透圧ポンプ (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。

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 Computer Tomography (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

両側上顎を採取しパラフィン包埋を行った後、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 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 抗体を用いた免疫組織染色により、炎症性細胞を観察した。また、同組織を用いて tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) 染色、alkaline phosphatase (ALP) 染色を行い、破骨細胞および骨芽細胞活性を評価した。

6. 歯肉における遺伝子発現解析

歯肉の total RNA を RNeasy にて抽出し、ReverTra Ace を用いて cDNA を合成した後、real-time PCR 法にて iNOS、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、CD11c、CD206 遺伝子の発現について検討した。

7. Micro CT による歯槽骨の撮影

Micro CT 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。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 細胞を用いて GLP-1 を 10^{-9} ~ 10^{-11} M、lipopolysaccharide (LPS) を 100 ng/ml の濃度で添加・刺激し TNF- α 、iNOS 遺伝子の発現解析を行った。

9. 統計学的解析

全ての値は、平均値±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。

2. 歯周組織における病理組織学的所見

H-E 染色を行った結果、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、リラグルチド投与により歯周炎群と比較し炎症性細胞浸潤の減少を認めた。免疫組織染色を行い、iNOS 陽性細胞数を計測したところ、対照群と比較し歯周炎群では iNOS 陽性細胞数が有意に増加したが、リラグルチド投与により陽性細胞数が歯周炎群と比較し有意に減少した。

TRAP 染色を行った結果、対照群と比較し歯周炎群では TRAP 陽性細胞数が有意に増加したが、リラグルチド投与により陽性細胞数が歯周炎群と比較し有意に減少した。一方、ALP 染色においてはいずれの群間においても有意差は認めなかった。

3. 歯肉における遺伝子発現解析

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 および TNF- α の遺伝子発現が有意に増加したが、リラグルチド投与により歯周炎群と比較し有意に減少した。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マーカーの CD11c と抗炎症性マクロフ

アーマーカーの 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、リラグルチド投与により歯周炎群と比較し有意に減少した。一方で、CD206 発現には有意な差は認められなかった。

4. 実験的歯周炎による歯槽骨吸収の評価

対照群と比較し歯周炎群では歯槽骨の吸収が有意に増加したが、リラグルチド投与群では歯周炎群と比較し歯槽骨吸収が有意に抑制された。

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 および 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 および iNOS 遺伝子発現を濃度依存的に抑制した。

IV. 考察

本研究では、歯周炎に対する GLP-1 の抑制効果について検討した。歯周炎惹起とともにリラグルチドを投与することにより、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、および歯槽骨の吸収抑制が認められた。

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、同じインクレチンである GIP において、LPS 刺激による THP-1 細胞における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 刺激に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。

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。今回の研究において歯周炎で増加した M1 マクロファージはリラグルチドの投与により減少したが、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。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。

炎症性サイトカインである $\text{TNF-}\alpha$ 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。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、骨吸収を抑制したことが報告されている。今回の結果では歯周炎によって破骨細胞数が有意に増加したが骨芽細胞分化の亢進は傾向を認める程度にとどまった。リラグルチドの投与によって歯周炎により増加した破骨細胞数の減少を認めたが、骨芽細胞分化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であることが示唆された。

本研究から、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 受容体作動薬は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のみでなく、糖尿病を合併しない歯周病患者にも有効であ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。さらに歯槽骨において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、歯槽骨表面における破骨細胞数の有意な減少を認めた。

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、今後新たな治療戦略となる可能性が示唆された。