

論文要旨

2 型糖尿病を有する歯周炎患者における
Porphyromonas gingivalis と MnSOD の関係

平成 29 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

渡邊 裕之

【諸言】

歯周炎は *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) などの歯周病原細菌が関与した慢性炎症性疾患であり，発症と進行には遺伝的，環境的リスクファクターが関与していると考えられている．とりわけ糖尿病は歯周炎のリスクファクターであり，血糖コントロールの不良が歯周炎のリスクを上昇させることが明らかとなっている．また歯周炎が血糖コントロールの不良をもたらすことも報告され，歯周炎と糖尿病が相互に影響を与えていることが注目されている．

Reactive oxygen species (ROS) のコントロールは生体の恒常性を維持する上で重要であり，ROS の上昇は生物の寿命を短縮することが知られている．生理的な状態において ROS は細胞がグルコースを取り込んでエネルギーとして利用する過程で産生される．しかし感染症では多量の ROS が産生され，殺菌のために用いられる．糖尿病を有する歯周炎患者では，グルコースの代謝異常に加えて歯周病原細菌の感染が存在するため，多量の ROS の産生が示唆されるが，生体内で発生する ROS を直接測定することは困難であり，これまで糖尿病を有する歯周炎患者に対する ROS が与える影響については十分に明らかになっていない．

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) は細胞内で発生する ROS を無毒化する主要な抗酸化酵素であり，生体の抗酸化システムのバランスの維持に寄与している．血清中の MnSOD は高齢者で上昇することが報告されており，老化による活性酸素の増加に伴い血清 MnSOD が上昇することが示唆されている．

本研究では糖尿病患者の血清 MnSOD と歯周炎の関係を明らかにすることを目的として糖尿病患者と非糖尿病患者を対象に血清 MnSOD 活性を検討した．さらに血清 MnSOD の産生細胞である単球系細胞の MnSOD 産生に対して，グルコース濃度と *P. gingivalis* 刺激が与える影響を明らかにす

ることを目的として、ヒト単球系細胞株を用いて *P. gingivalis* LPS 刺激による MnSOD 産生機構を検討した。

【材料と方法】

1. 糖尿病患者の血清 MnSOD と歯周炎の関係

被験者は北海道医療大学病院歯科に通院する糖尿病患者を糖尿病群 (n = 76) として、非糖尿病患者をコントロール群 (n = 78) とした。歯科検査として被験者の現在歯数、Probing pocket depth (PPD) , Bleeding on probing (BoP) を測定した。被験者の唾液を採取し、唾液中の DNA を抽出した。*P. gingivalis* に特異的なプライマーを用いて Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) を行った。既知の *P. gingivalis* 細菌数を陽性対象として段階希釈して測定し、標準曲線を作成し、検体の細菌数を算出した。また、血液検査として血清中の LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1c を利用した。被験者の血液を採取し、血清を分離して MnSOD を測定した。

2. 異なるグルコース濃度と *P. gingivalis* が ROS の産生細胞である単球系細胞の MnSOD 産生に対して与える影響

ヒト単球系細胞細胞 (THP-1 細胞) をグルコース濃度 (100, 200, 300mg/dl) の異なる 10%FBS 含有 RPMI で培養し、*P. gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) 刺激を行った。培養後、上清と細胞をそれぞれ回収した。細胞から RNA を抽出し、Reverse transcription によって cDNA を合成した。MnSOD, TNF- α , β -actin に特異的なプライマーを用いて qPCR を行った。未刺激時の THP-1 細胞の mRNA 発現を陽性対象として段階希釈して測定し、検体と陽性対象との発現比を求め、得られた MnSOD, TNF- α と β -actin の値の比を MnSOD mRNA と TNF- α mRNA 発現量とした。培養上清中の Tumor necrosis factor (TNF) - α 濃度は ELISA 法を用いて測定した。

統計解析には IBM SPSS Statistics 23 を使用した。2 群間の比較は Mann-Whitney U test または Pearson's's chi-square test で比較した。多群間の比較は ANOVA with Tukey's HSD Post Hoc Test で比較した。糖尿病群の血清

MnSOD を従属変数に設定し，血液検査・歯科検査および細菌検査項目を独立変数に設定して重回帰分析を行った．有意水準を $p < 0.05$ とした．

【結果と考察】

1. 糖尿病患者の血清 MnSOD と歯周炎の関係

糖尿病群ではコントロール群と比較して血清 MnSOD の値が有意に高かった．また糖尿病群はコントロール群と比べて空腹時血糖，BOP と PPD4 mm 以上の歯数の割合が有意に高く，HDL コレステロール，現在歯数は有意に低かった．糖尿病群の血清 MnSOD を従属変数，血液検査・歯科検査および細菌検査項目を独立変数に設定して重回帰分析を行ったところ，血清 MnSOD と唾液 *P. gingivalis* 細菌数との間に有意な正の相関が認められた．これらのことから，糖尿病を有する歯周病患者では *P. gingivalis* 感染が重度であるほど血清 MnSOD 産生が上昇することが示唆された．

2. 異なるグルコース濃度と *P. gingivalis* が ROS の産生細胞である単球系細胞の MnSOD 産生に対して与える影響

THP-1 細胞を *P. gingivalis* LPS で刺激したところ，MnSOD の mRNA は刺激後 12 時間まで上昇し，以降減少した．培地中のグルコース濃度を変えて *P. gingivalis* LPS で刺激して 12 時間後の MnSOD mRNA を検討したところ，グルコース濃度 300mg/dl で最も MnSOD mRNA 発現量が高かった．また，*P. gingivalis* LPS で刺激した培養上清中の TNF- α を測定したところ，刺激後に TNF- α 産生が認められた．TNF- α で細胞を刺激した 12 時間後の MnSOD mRNA を検討したところ，濃度依存性に MnSOD mRNA 発現が上昇した．これらのことから糖尿病を有する歯周炎患者では *P. gingivalis* 感染による直接刺激，あるいは感染に伴い誘導された TNF- α を介した間接刺激によって MnSOD 上昇が起こる可能性が示唆された．

【結論】

糖尿病を有する歯周炎患者において，血清 MnSOD は *P. gingivalis* 感染に伴い上昇することが示唆された．