

歯肉におけるインスリン抵抗性の発現に プロテインキナーゼCおよび酸化ストレスが及ぼす影響

水谷 幸嗣

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野

金田博夫研究助成基金により Joslin 糖尿病センターへの研究留学を御支援いただきありがとうございました。2010年4月から2012年6月までの2年余りを George L. King 教授のラボで過ごさせていただき、糖尿病合併症の基礎研究に従事させていただきました。

King ラボは、糖尿病合併症の病態である血管障害について研究を行っている。そこで、糖尿病の合併症としての側面も持つと認識され得る歯周病について、インスリン抵抗性という観点からのアプローチで研究を行った。

近年、糖尿病や肥満が歯周病のリスク因子であることが明らかにされ始めており、糖尿病と歯周病との関連メカニズムについては、免疫機能の低下や最終糖化産物 (AGE) の関与などが提唱されているが、肥満との関連については不明な点が多い。肥満は、疫学研究の分析から血糖コントロールや糖尿病とは関係なく、独立して歯周炎との関連が示されており、メタアナリシスでは肥満の成人は歯周炎の発症の確率が1.4倍と報告されている(1)。また、肥満型インスリン抵抗性モデル動物 (Zucker fatty ラット) に歯周炎を人工的に惹起すると、明らかな歯周炎の悪化が見られたことが報告されている(2)。

Genco らは糖尿病と歯周病の関連の疫学研究から、インスリン抵抗性の発現が歯周病の悪化と関連していることを示唆しているが(3)、肥満および糖尿状態にある歯周組織のインスリン抵抗性を定量的に分析した研究は報告されていない。そこで、本研究では前糖尿病段階としてインスリン発現性を生じている肥満モデルのラットを用いることで、歯肉におけるインスリン抵抗性発現の有無と、その発現機序を検討した。

実験には、肥満によるインスリン抵抗性モデルラットの Zucker Fatty (fa/fa : ZF) とその対照の Lean (+/+ : ZL) の12週齢・オスを各18頭用いた。12時間の絶食の後、血糖値、血清中のインスリン、遊離脂肪酸、C反応性タンパク (CRP)、マロンジアルデヒド (MDA) を測定し、腹腔内耐糖能テストを行った。また、下顎臼歯部の辺縁歯肉を採取し、歯槽骨高さをセメント-エナメル境からの距離で評価した。

	体重 (g)	血糖値 (mg/dL)	血清 インスリン (ng/mL)	遊離脂肪酸 (mEq/L)	血清 CRP (ug/ml)	血清マロンジ アルデヒド (uM)
対照ラット (ZL)	333.8 ± 15.0	87.0 ± 5.6	0.43 ± 0.06	0.28 ± 0.05	298.2 ± 45.6	0.78 ± 0.13
肥満ラット (ZF)	528.8 ± 12.2*	97.8 ± 5.0	2.41 ± 0.14*	0.83 ± 0.04*	385.4 ± 83.0*	1.12 ± 0.28*

表1：実験動物の検査結果

その結果、ZF群は有意に高い体重、および血中のインスリン濃度、遊離脂肪酸、CRPを示し、さらに耐糖能の有意な低下が示された(表1)。しかしながら、両群の歯槽骨吸収量に差は見られなかった(図1)。これは、ZFラットでは全体的にはインスリン抵抗性を生じているものの、プラークの蓄積のような歯周炎の原因がなければ歯槽骨吸収のような形態学的な病態が歯周組織に生じていないことを示している。

そこで、インスリン抵抗性を生じた状態での歯周組織局所でのインスリン抵抗性の発現の有無を確認するために、絶食後に採取した下顎臼歯部の辺縁歯肉を、ex vivoにてインスリン刺激(100nM)を行い、Akt、Erk、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の活性化レベルによってインスリンシグナリング阻害の評価をウェスタンブロット法に行った。

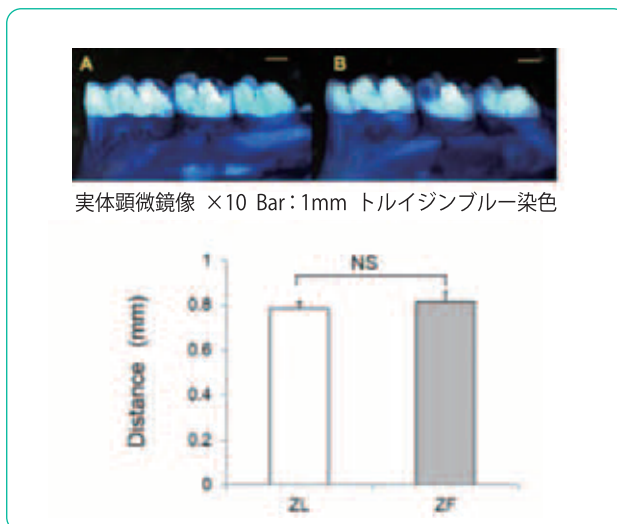


図1: 歯槽骨吸収の計測

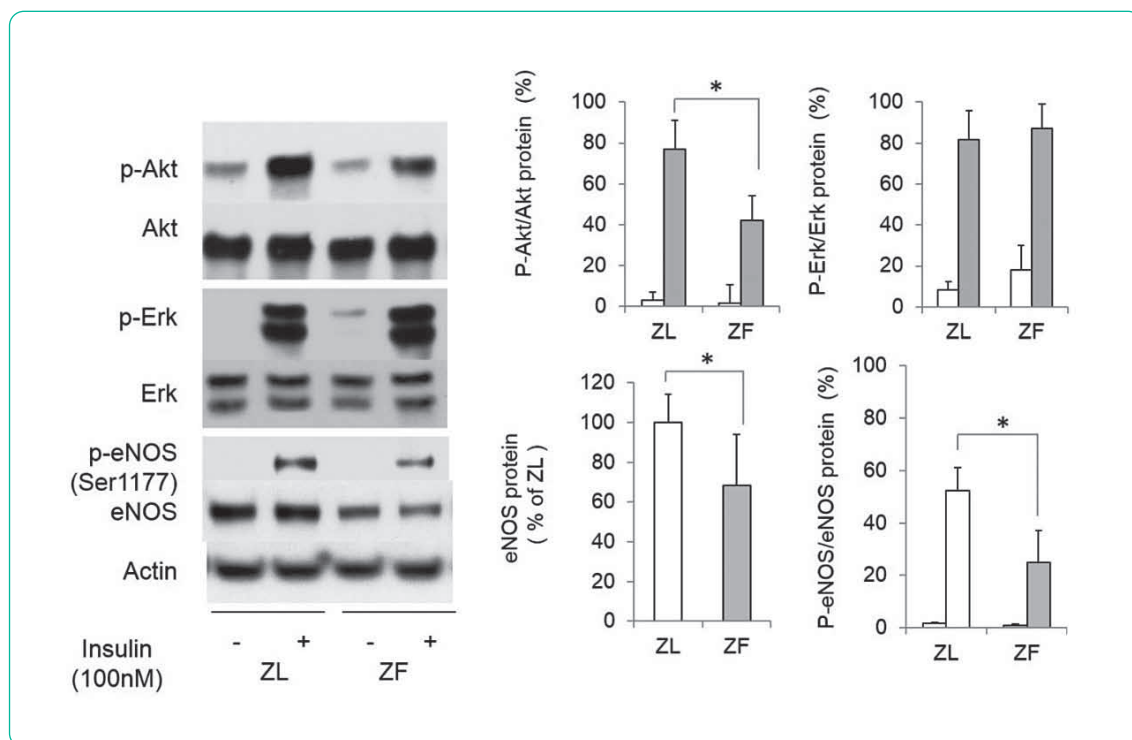


図2: 歯肉へのインスリン刺激によるAkt,Erk,eNOSの影響

すると非常に興味深いことに、eNOS発現量は、ZF歯肉においてZLに比べて有意に低下していた。これはZF群ラットの歯肉において血管透過性や血管新生能が低下していることが示唆される。さらにex vivoでのインスリン刺激により、eNOSとその上流に存在するAktのリン酸化は

ZFにおいて有意に低下していたもののErkは影響を受けていなかった(図2)。つまりインスリンシグナリングのうちPI3-Akt経路のみが選択的に阻害され、MAPK経路は阻害されていないことが示された。

これと同様のインスリンシグナリングの特異的な阻害は、糖尿病性腎症糸球体や糖尿病性網膜症が生じた網膜(4)、脂肪組織(5)内の内皮細胞など、糖尿病合併症による血管障害が起きている部位において示されている。そして、その阻害メカニズムとして局所での炎症やプロテインキナーゼC (PKC) の活性が報告されている(4; 5)。

そこで、採取した歯肉のPKCの活性、およびNF- κ Bの活性、炎症性サイトカイン・酸化ストレスマーカーのmRNA発現を比較した。その結果、歯肉におけるPKC α , $\beta 2$, δ , ϵ はZLに比べてZFにおいて有意な活性化が見られた(図3)。また、ウェスタンブロット法によりNF- κ Bの活性がZF群において有意に高まっていることが示されたため、炎症性サイトカインおよび酸化ストレスマーカーの発現を検索したところ、炎症性サイトカインの発現に差はないものの、酸化ストレスマーカーの発現はZF群で有意に高いレベルであった(図4)。歯肉局所でのPKC活性化および酸化ストレスマーカーの発現の上昇は、表1で示すような高血糖状態および遊離脂肪酸の上昇がもたらしていると過去の報告(5)などからも推測された。

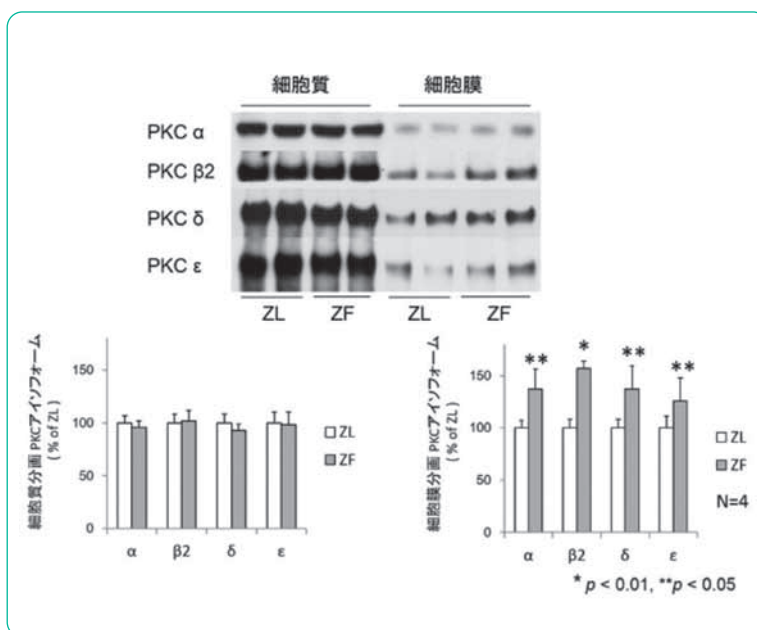


図3：歯肉におけるPKC活性化の比較

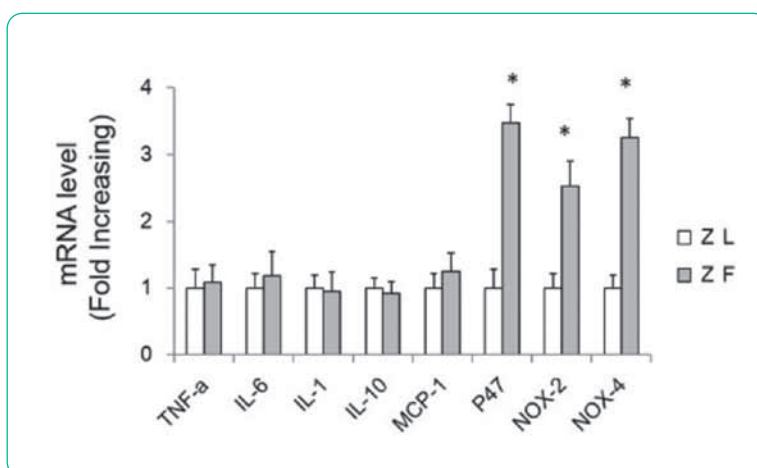


図4：歯肉における炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカーの発現

次に先に行った ex vivo 実験を PKC 阻害薬 (GFX)、抗酸化剤 (ACE) の存在下で再度行った。その結果、Akt、eNOS のリン酸化が一部回復をした。ZF 群で低下していた Akt および eNOS の活性化の改善が見られた (図5)。この一連の結果から肥満によるインスリン抵抗性を生じた前糖尿病段階にあると、PKC 活性化および酸化ストレス亢進が歯周組織局所で生じ、糖尿病合併症を生じる臓器等と同様にインスリン抵抗性が生じることが示された。

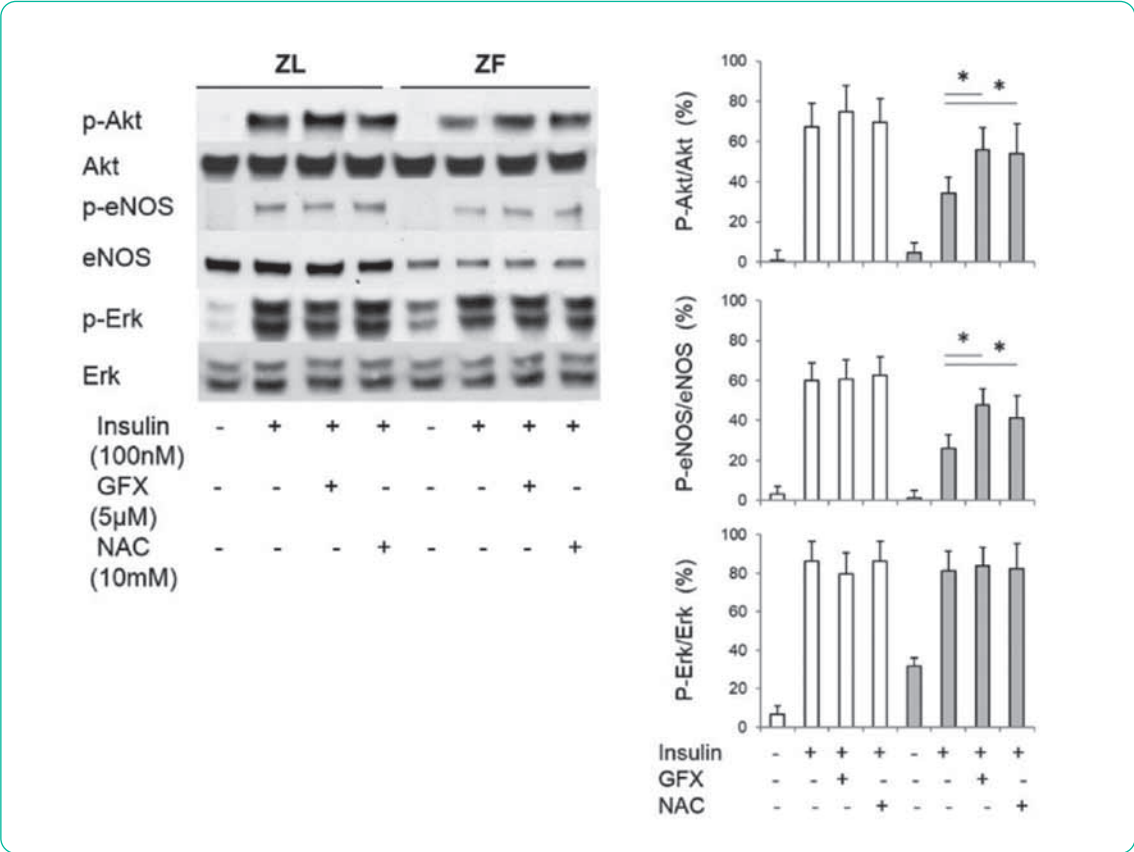


図5：PKC阻害薬 (GFX)、抗酸化剤 (NAC) 添加下におけるインスリン刺激による Akt、Erk、eNOS の影響

この歯周組織局所での炎症の発現を確認するために、さらに NF- κ B EGFP マウスに2か月間、高脂肪食を与え、歯周組織での NF- κ B 活性化部位の特定を行った。すると、CD31 を特異的に発現する血管内皮細胞と一致しており、この NF- κ B 活性化が血管において生じていることが明らかにできた (図6)。

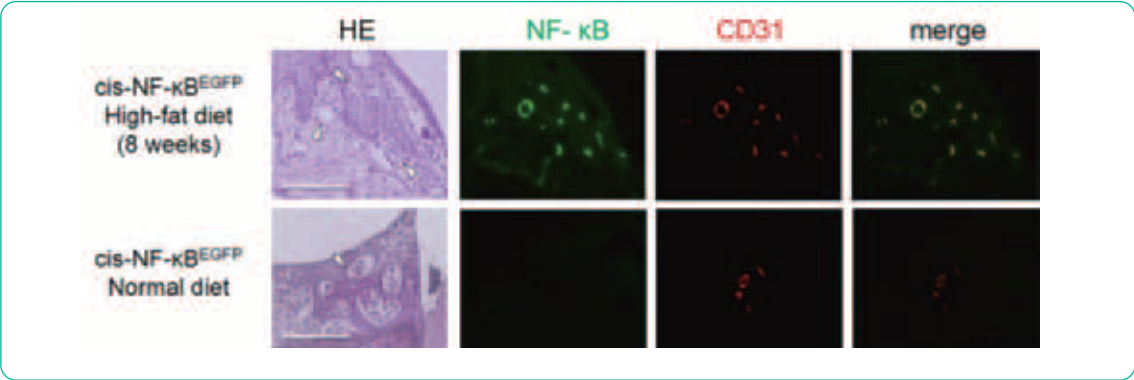
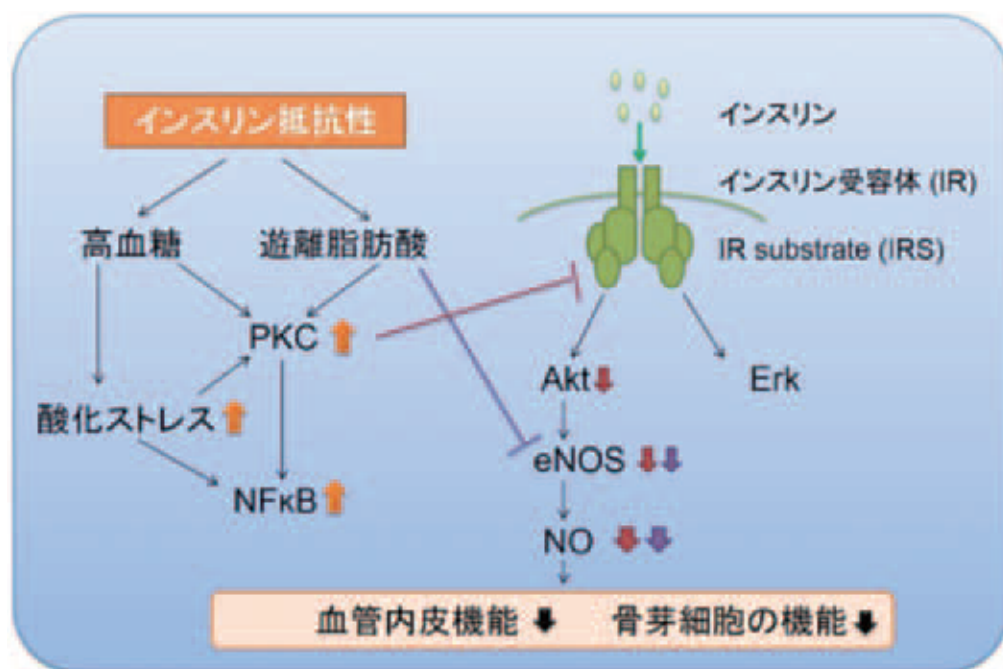


図6

本研究により、初めて歯肉におけるインスリン抵抗性が定量的に分析され、肥満状態での歯肉におけるインスリンシグナルの阻害は血管内皮も含めて生じていることが判明した。そして、その阻害にはPKC活性化および酸化ストレスが関与していることが示唆された。このことは、血管内皮細胞が関わる血管新生や、その後の線維芽細胞および骨芽細胞が関わる創傷治癒の遅延にも影響し得るものであると考察される(図7)。

これまで疫学的に、肥満による前糖尿病状態や糖尿病などで高血糖を呈し、インスリン抵抗性を生じていると、歯周炎が発症しやすく、また増悪しやすいことが示されてきたが、そのメカニズムは十分に解明されていない。本研究結果では、歯周組織破壊の進行や創傷治癒遅延に、他の糖尿病合併症を生じた臓器と同じように血管におけるインスリン抵抗性の発現が関与している可能性を明らかにできた。今後は歯周組織のインスリン抵抗性発現が歯周炎の進行や歯周治療後の組織治癒や再生にどのように影響を与えているかの検討が必要であろう。



最後に、本研究の実施において多大なご支援を頂いたサンスター財団の皆様、Joslin糖尿病センター King ラボの皆様、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野の皆様にご礼申し上げます。

※本報告は下記において出版されている

Obesity-associated Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance.

Mizutani K, Park K, Mima A, Katagiri S, King GL. J Dent Res.;93(6):596-601,2014.

参考文献

1. Chaffee BW, Weston SJ: Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2010;81:1708-1724
2. Pontes Andersen CC, Flyvbjerg A, Buschard K, Holmstrup P: Periodontitis is associated with aggravation of prediabetes in Zucker fatty rats. *J Periodontol* 2007;78:559-565
3. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y: A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol* 2005;76:2075-2084
4. Mima A, Qi W, Hiraoka-Yamamoto J, Park K, Matsumoto M, Kitada M, Li Q, Mizutani K, Yu E, Shimada T, Lee J, Shoelson SE, Jobin C, Rask-Madsen C, King GL: Retinal not systemic oxidative and inflammatory stress correlated with VEGF expression in rodent models of insulin resistance and diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;
5. Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha SW, Suzuma K, Way KJ, Jacobs JR, Clermont AC, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine AB, King GL: Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 2006;55:691-698