

ふ り が な 氏 名	し お み け い 塩 見 慧
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	甲 第 877 号
学 位 授 与 の 日 付	令和 2 年 3 月 6 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学 位 論 文 題 目	Osteogenic Effects of Glucose Concentration for Human Bone Marrow Stromal Cells after Stimulation with <i>Porphyromonas gingivalis</i> lipopolysaccharide (ヒト骨髄間葉系細胞の硬組織分化における <i>Porphyromonas gingivalis</i> LPS 存在下での高グルコース環境の影響)
学 位 論 文 掲 載 誌	Journal of Hard Tissue Biology 第 29 巻 第 1 号 令和 2 年 1 月
論 文 調 査 委 員	主 査 梅 田 誠 教授 副 査 山 本 一 世 教授 副 査 前 田 博 史 教授

#### 論文内容要旨

糖尿病（DM）は、世界中で発生している一般的な生活習慣病である。DM 患者は、健康な人と比べて歯の喪失リスクが高くなっている。DM は歯槽骨吸収が起こる慢性歯周炎のリスクと重症度を高めると言われている。慢性炎症は DM および DM 関連の合併症の発症に関与する。高血糖は DM の特徴であり、炎症性サイトカインの発現を上昇させることにより持続的な炎症に関与する可能性がある。しかし、慢性歯周炎において *Porphyromonas gingivalis* lipopoly- saccharide (*P. gingivalis* LPS) による刺激中に DM が及ぼすメカニズムは不明のままである。ヒト骨芽細胞の骨分化に対する高グルコース濃度の効果を評価するために行われた研究の結果は、硬組織分化を促進するものもあれば、減退させるものもある。そこで、*P. gingivalis* LPS による刺激のもとで、ヒト骨髄間葉系細胞における硬組織分化および炎症性サイトカインに対する高グルコース濃度の影響を評価した。空腹時血糖値を参考に、通常グルコース群 (5.5 mM)、コントロールされた糖尿病患者群 (8.0 mM)、非コントロール糖尿病患者群 (12 mM, 24 mM) の 4 群に濃度調整した培養液に、*P. gingivalis* LPS (1.0 mg/mL) を添加し、硬組織分化誘導を行った。その後、細胞増殖、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン (OCN) 産生量、カルシウム (Ca) 析出量に対する影響を測定した。そして炎症性サイトカイン、および骨形成サイトカインの発現の検討を行った。結果は、12 mM と 24 mM の高濃度のグルコースは細胞増殖を増加させた。しかし、ALP 活性は 12 mM および 24 mM の高濃度のグルコースでは減少することを示した。さらに、OCN 産生量と Ca 析出量は 24 mM のグルコース濃度で減少した。炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-8) の発現量は 8.0 mM および 12 mM のグルコース濃度で減少し、24 mM のグルコース濃度では増加した。また、骨形成サイトカインである Runx2 の発現量は 12 mM のグルコース濃度では

著明に増加したが、24 mM のグルコース濃度になると急激に減少した。高濃度のグルコースでは、細胞増殖において *P. gingivalis* LPS による刺激のもと細胞増殖を促進した。ただし高グルコース濃度下で急激に酸化ストレスが上昇すると、細胞毒性が増加し、骨芽細胞の細胞内シグナル伝達を阻害されることによって、ALP 活性と OCN 産生量は 24 mM のグルコース濃度で低下したと考えられる。

OCN 産生量は、高濃度グルコースによって通常増加する。OCN 産生量が増加することで Ca の析出量を増加させる。しかし、今回の研究では、*P. gingivalis* LPS による刺激によって OCN 産生量が抑制されることで、高濃度のグルコースでは Ca 析出量が減少した。また Runx2 は、骨芽細胞へのグルコースの取り込みを促進し、さらに OCN を生成すると言われている。しかし、細胞周囲のグルコース濃度が高すぎたため、細胞へのグルコース取り込みが減少し、Runx2 の発現が減少したと考えられる。炎症性サイトカインの発現量は、8.0 mM および 12 mM のグルコース濃度で減少しました。BMMCs が 12 mM という高濃度のグルコースを摂取され、細胞活性を促進したが、24 mM のグルコースにより酸化ストレスが急激に上昇し、細胞毒性を高め、炎症性サイトカインが増加したと考えられる。以上から、高グルコース濃度は *P. gingivalis* LPS による刺激後の硬組織形成を減少させることがわかった。

### 論文審査結果要旨

慢性炎症は糖尿病(DM)および DM 関連の合併症の発症に寄与する。高血糖は DM の特徴であり、炎症性サイトカインの発現を上昇させることにより持続的な炎症に寄与する可能性がある。しかし、慢性歯周炎において *Porphyromonas gingivalis* lipopoly- saccharide (*P. gingivalis* LPS) による刺激中に DM が及ぼすメカニズムは不明のままである。ヒト骨芽細胞の骨分化に対する高グルコース濃度の効果を評価するために行われた研究の結果は、硬組織分化を促進するものもあれば、減退させるものもある。そこで本研究は *P. gingivalis* LPS による刺激のもとで、ヒト骨髓間葉系細胞(BMMCs)における硬組織分化および炎症性サイトカインに対する高グルコース濃度の影響を評価した。空腹時血糖値を参考に、通常グルコース群 (5.5 mM)、コントロールされた糖尿病患者群 (8.0 mM)、非コントロール糖尿病患者群 (12 mM, 24 mM) の 4 群に濃度調整した培養液に、*P. gingivalis* LPS (1.0 mg/mL) を添加し、硬組織分化誘導を行った。その後、細胞増殖、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、オステオカルシン (OCN) 産生量、カルシウム (Ca) 析出量に対する影響を測定した。そして炎症性サイトカイン、および骨形成サイトカインの発現の検討を行った。

その結果、BMMCs が 12 mM という高濃度のグルコースを摂取され、細胞活性を促進したが、24 mM のグルコースにより酸化ストレスが急激に上昇し、細胞毒性を高め、炎症性サイトカインが増加したと考えられ、高グルコース濃度は *P. gingivalis* LPS による刺激後の硬組織形成を減少させることが明らかになった。

以上、高グルコース濃度は *P. gingivalis* LPS 存在下において BMMCs の硬組織形成に悪影響を及ぼすが、糖尿病をコントロールしている状態では、正常に硬組織を形成することができると示唆された。このことから、歯周病患者に対し歯周病治療をおこなっていくにあたり、血糖値のコントロールがいかに重要であるかを証明した点において、本論文は博士(歯学)の学位を授与するに値すると判定した。