

論文の内容の要旨

氏名：加藤 駿一郎

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名： Glucose transporter 4 mediates LPS-induced IL-6 and IL-1 α expression under the high glucose condition on osteoblasts

（高濃度グルコースは Glucose transporter 4 を介して骨芽細胞における LPS 誘導性の IL-6 と IL-1 α 発現を促進する）

歯周病は、歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を誘引するグラム陰性菌由来のリポ多糖（LPS）によって引き起こされる代表的な慢性炎症性疾患であり、咀嚼機能を低下させる歯の喪失の主要な原因となる。糖尿病もまた高い有病率を示す慢性の疾患で、インスリンの作用が不足して慢性的な高血糖状態となり、糖代謝異常を引き起こす。糖尿病によって生じる慢性的な高血糖状態は、さまざまな合併症を引き起こすことが問題となっている。近年、糖尿病と歯周病の関係性について注目されており、歯周病患者は健康な人と比較して糖尿病の診断の指標の1つである HbA1c の値が高いことが疫学研究で示されている。しかしながら、細胞生物学的に糖尿病と歯周病の関係性を裏付ける報告は少ないのが現状である。

LPS は、骨芽細胞において受容体を介して NF- κ B を活性化し、IL-1 α 、IL-6、RANKL などの炎症性サイトカイン発現を誘導することで破骨細胞を分化および活性化する。つまり、骨芽細胞が産生する炎症性サイトカインは、慢性の炎症性骨疾患の進行に関与する重要な因子と考えられる。そこで、本研究では、高濃度グルコース刺激が骨芽細胞の LPS 誘導性の炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響を、細胞生物学的に検討した。

マウス頭蓋冠由来の株化骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1 細胞）を 2.0×10^4 cells/cm² の密度で 6 穴プレートに播種、生着を確認した後、血清および抗生物質を含む細胞培養用培地で 14 日間培養した。細胞を刺激する条件は、培地に 100 ng/ml LPS を添加（LPS 群）、100 ng/ml LPS と 22 mM グルコースを添加（LPS+グルコース群）、および LPS とグルコースを非添加（コントロール群）とした。培養 7 日目と 14 日目に細胞と細胞培養上清を回収し、real-time PCR 法にて mRNA 発現を、ELISA 法でタンパク発現を調べた。

LPS 群はコントロール群と比較して、培養 14 日目の IL-6 の mRNA 発現が有意に上昇した。また、LPS+グルコース群はコントロール群と LPS 群に比べて、培養 7 日目の IL-1 α と培養 14 日目の IL-6 の mRNA 発現が有意に上昇した。一方、RANKL の mRNA 発現は、コントロール群に比べて LPS 群と LPS+グルコース群で上昇したが、有意差は認められなかった。培養 14 日目の IL-6 のタンパク発現は、コントロール群と比較して LPS 群と LPS+グルコース群で有意に上昇し、さらに LPS 群と比較して LPS+グルコース群で有意に高かった。培養 14 日目の RANKL のタンパク発現は、LPS 群と LPS+グルコース群で上昇し、コントロール群と比較して LPS 群のみ有意差を認めた。これらの結果から、高濃度グルコースは、LPS 誘導性炎症性サイトカインの IL-1 α と IL-6 の発現を増加させることが示唆された。また、高濃度グルコースは、LPS 刺激を受けた骨芽細胞の RANKL 発現に影響しないと考えられた。

グルコース輸送体（glucose transporter; GLUT）は、細胞質中から細胞膜上に移動し濃度勾配に従い選択的にグルコースを細胞内に取り込む膜タンパクである。GLUT1、3 および 4 はグルコースと親和性の高いアイソフォームであり、なかでも GLUT4 はインスリン依存的に細胞内へグルコースを取り込む。GLUT4 は、主に横紋筋や脂肪組織などに発現し、血中のグルコース濃度を調節するが、骨芽細胞にも GLUT4 発現が認められる。そこで、GLUT4 阻害剤である 1.0 μ M WZB117 を培地に添加して、高濃度グルコースによる LPS 誘導性の IL-1 α と IL-6 の mRNA 発現増加への GLUT4 の関与を調べた。その結果、LPS+グルコース群における培養 14 日目の IL-6 と培養 7 日目の IL-1 α の mRNA 発現増加は、WZB117 によってコントロール群と同程度まで低下した。本結果から、高濃度グルコースは GLUT4 を介して骨芽細胞に作用し、LPS 誘導性 IL-1 α と IL-6 の発現を増加させることが示唆された。

成熟骨芽細胞により合成される非コラーゲン性の骨タンパク質である osteocalcin (OCN) は、糖脂質代謝の調節にも関与することが示唆されている。臨床疫学研究では、整形外科手術後に血漿中の IL-6 とグルコースの濃度の増加と OCN の濃度の減少が認められること、また、糖尿病患者の IL-6 の血漿濃度が上昇するのに対して OCN は減少することなどが明らかにされている。そこで、MC3T3-E1 細胞における OCN の mRNA 発現を調べた結果、コントロール群と比較して LPS+グルコース群で、培養 14 日目の OCN の mRNA 発現が有

意に減少したが、WZB117の影響は認められなかった。本結果から、グルコースとLPSは、GLUT4非依存的に骨芽細胞のOCNの発現を低下させることが示唆された。

以上、本研究で得られた結果から、高濃度グルコースはGLUT4を介してLPS誘導性のIL-1 α とIL-6の発現を上昇させることが示唆された。すなわち、糖尿病で認められる高血糖状態は、LPS刺激を受けた骨芽細胞の炎症性サイトカイン産生を誘導し、炎症性骨吸収を促進する可能性が考えられた。