

論文の内容の要旨

氏名：富田景子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：終末糖化産物と LPS が骨芽細胞の PGE₂ 産生に及ぼす影響

終末糖化産物（advanced glycation end products: AGEs）は、タンパクと還元糖（グルコースなど）が結合するメイラード反応によって非酵素的に生成される。AGEs は、生体内では高血糖状態で増加し、糖尿病とその合併症の発症に関連すると報告されている。AGEs は生体内に蓄積することが知られており、歯肉組織中の AGEs は、健常者と比較して糖尿病患者で多いことが示されている。これらの知見から、糖尿病における AGEs の蓄積は、歯周炎の進行に関与する可能性が考えられる。

歯周組織の炎症は、歯周病原菌によって惹起される。歯周病原菌内毒素の 1 つであるリポ多糖 (LPS) は、歯周組織における炎症性サイトカイン産生を誘導し、歯槽骨吸収を促進する。また、歯周組織の破壊は、prostaglandin E₂ (PGE₂) によっても進行する。PGE₂ は、cyclooxygenase (COX) によって、アラキドン酸から産生されるケミカルメディエーターの 1 つであり、COX のアイソザイムである COX-2 は炎症時に増加する。一方、COX-1 の発現は恒常的に認められ、血圧の調整や胃粘膜保護などの作用に関与している。

これまでの先行研究では、AGEs 単独刺激や AGEs と LPS の共刺激によって骨芽細胞の石灰化物形成能が抑制されることが示されている。しかし、AGEs と LPS の刺激が骨芽細胞のケミカルメディエーター産生に及ぼす影響については、不明な点が多い。そこで、本研究では、LPS と AGEs の共刺激が骨芽細胞における PGE₂ 産生に及ぼす影響を調べることを目的とした。具体的には、マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を AGEs と LPS を加えた細胞培養液で培養し、AGEs の受容体 receptor of advanced glycation end products (RAGE)、COX-1 および COX-2 の発現、ならびに PGE₂ 産生量を調べた。

MC3T3-E1 細胞を 6-well プレートに 2.0×10^4 cells/cm² の密度で播種し、10% ウシ胎児血清 (FBS)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシン B を添加した alpha modified Eagle's medium を細胞培養液として用い、37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養した。細胞の生着を確認した後、100 ng/mL LPS (*Escherichia. coli* 由来) および 100 µg/mL AGEs を添加して 3、7 および 14 日間、培養した。なお、細胞培養液の交換は 3 日ごとに行った。AGEs は先行研究に準じて作成した。すなわち、50 mg/mL ウシ血清アルブミン、0.1 MDL-グリセルアルデヒド、および 5 mM ジエチレントリアミンペンタメトリック酸を含む 0.2 M リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) を濾過滅菌後、37°C で 7 日間振盪し、PD-10 カラムを用いて、低分子量反応物とアルデヒドを除去したものを AGEs として実験に使用した。3、7 および 14 日目にそれぞれの細胞をサンプルとして回収し、RAGE、COX-1 および COX-2 の遺伝子発現を real-time PCR 法で、培養 14 日目の COX-2 のタンパク発現を Western Blotting 法を用いて調べた。次に、培養 14 日目に 24 時間 FBS を取り除いた培養上清を回収し、PGE₂ 産生量を ELISA kit を用いて調べた。

RAGE の遺伝子発現は、刺激の有無にかかわらず、すべての培養日数で認められた。また、培養 3 日目では、control と比較して LPS と AGEs の共刺激で RAGE の遺伝子発現は有意に増加した。COX-1 と COX-2 の遺伝子発現は、刺激の有無にかかわらずすべての培養日数で認められた。COX-1 の遺伝子発現に LPS と AGEs の影響は認められなかった一方で、培養 14 日目の COX-2 の遺伝子発現は、control と LPS 単独刺激に比べて LPS と AGEs の共刺激で有意に増加した。COX-2 のタンパク発現は、control と LPS 単独刺激に比べて LPS と AGEs の共刺激で有意に増加した。さらに、PGE₂ は、control と LPS 単独刺激に比べて LPS と AGEs の共刺激で有意に増加した。これらの結果から、COX-2 発現に影響しない低濃度の LPS も AGEs の存在下ではその発現を誘導し、PGE₂ 産生を増強すると考えられた。

以上、本研究によって、LPS と AGEs は COX-2 発現と PGE₂ 産生を増加させることで、歯周病における歯槽骨の破壊に関与する可能性が示唆された。