
西野瑞穂歯科臨床医学奨励賞 受賞総説

最終糖化産物 (AGE) はラット培養歯髄細胞の石灰化物形成と炎症反応を進展させる

中島由紀子

キーワード：最終糖化産物 (AGE), 糖尿病, 歯髄, 石灰化, 炎症

Advanced Glycation End-product Affects Calcification and Inflammation in Rat Dental Pulp Tissues

Yukiko NAKAJIMA

Abstract : Amorphous calcification frequently appears in dental pulp tissues of diabetic patients. Diffuse calcifications and pulp stones may block access to canal orifices and alter the internal anatomy. It has been demonstrated that careful instrumentation is required to remove pulp stones for the successful endodontic therapy. Dental pulp pain often appears in diabetic patients and is referred to as diabetic odontalgia. Diabetic pulp is generally more likely to have impaired collateral circulation and reduced microbicidal polymorphonuclear leucocyte activity. These disorders increase the risk of ischemia, infection, and necrosis; therefore, pulpal infection may be considered as anachoresis. However, its pathologic process has not been fully elucidated. Advanced glycation end-products (AGE) have been found to play a role in the progression of diabetic vascular complications and inflammation. We examined AGE-effect on the expression of calcification and inflammation factors using rat dental pulp tissues and cell cultures. Expressions of RAGE, OPN, OCN, BSP, DSPP, S100A8, S100A9, IL-1 β , IL-6 and TNF- α mRNAs increased both in diabetic dental pulp tissues and in dental pulp cultures treated with AGE. ALPase activity and calcium deposition increased by the treatment with AGE in dental pulp cells. In the presence of anti-RAGE antibody or siRNA for RAGE, AGE did not increase in OPN, OCN, S100A8 or S100A9 expressions. The AGE-induced increases in OPN, OCN, S100A8 and S100A9 were inhibited by MAPK inhibitor. These results indicated that AGE may be a stimulatory factor of pathologic calcification and inflammation in diabetic dental pulp tissues and the effect is characteristic in dental pulp cells. Additionally, AGE may be associated with the RAGE-MAPK signaling pathway.

1. 糖尿病合併症における AGE の影響

糖尿病はインスリン作用不足に基づく慢性の高血糖状態を来す代謝疾患である。2012年の国民健康・栄養調査結果の推計では糖尿病と糖尿病予備軍の合計は2,050万人にもものぼり国民の5人に1人が該当する。その有病数は前回(2007年)の推計よりも約60万人増え、今や日本は糖尿病数世界第6位の糖尿病大国である。糖尿病は糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病神経障害、動脈硬化性疾患などの様々な合併症を引き起こし、生命予後を著しく損なう。現在、網膜症では年間約4,000人が失明、糖尿病性腎症により年間15,000人が透析を開始し、糖尿病患者の約40-50%が心筋梗塞や脳梗塞で亡くなっている。よって、糖尿病合併症の発症、進展のメカニズムの解明は急務であるが、近年、最終糖化産物(advanced glycation end-product: AGE)が大きく関係している可能性が報告され、注目が集まっている。

AGEはグルコースなどの還元糖とタンパク質との間の非酵素的糖化反応(Maillard反応)の後期段階で生成する構造体の総称である。Maillard反応は生体において普遍的に生じており、初期段階反応物質(アマドリ化合物)として生成するHbA1cなどは糖尿病患者の血糖コントロールの優れた指標となっている。そしてこの初期段階反応物質が不可逆的な糖化反応を経て生成したものがAGEである。すなわちAGEは健常者の血中にも存在するが、糖尿病患者において生成されやすく、また有意な増加がみとめられる。AGEの生物学的作用はその受容体であるreceptor for AGE(RAGE)を介して引き起こされることが報告されている。RAGEは細胞表面分子である免疫グロブリンスーパーファミリーのマルチリガンドリセプターメンバーであり、内皮細胞、平滑筋細胞、単核食細胞、周皮細胞、神経細胞、心筋細胞、メサンギウム細胞、肝細胞を含む多くの細胞株に発現しており全身に広く分布している。AGEがRAGEに結合するとサイトカインや成長因子の産生亢進など種々の細胞応答が引き起こされ、糖尿病血管合併症¹⁾やさらにはアルツハイマー病等の神経変性疾患^{2,4)}、骨粗鬆症、悪性腫瘍の発症・進展に関与するといわれている。特に糖尿病における動脈硬化症の分野ではAGE-RAGE相互作用について研究が進んでいる。血管平滑筋細胞にAGEを添加して培養を行うと、石灰化結節やアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、オステオポンチン(OPN)のmRNA発現の増加等の石灰化マーカーの亢進がみとめられた⁵⁾。さらに、骨芽細胞や軟骨細胞への分化に関与するRunx2やMsx2の発現の増加がみとめられた⁶⁾。また、この石灰化マーカーの増加はRAGE-MAPK(p38, ERK1/2)経路を介する⁵⁾ことが報告されている。このことからAGEはRAGE-MAPKを介して血管平滑筋細胞の骨芽細胞様細胞への分化を促進し、血管の能動的な石灰化を引き起こして糖尿病における動脈硬化症発症に寄与する可能性が示された。また、AGEの添加によ

り血管外膜線維芽細胞や神経膠細胞、骨芽細胞などでRAGE-MAPK-NF- κ Bを介してS100A8/A9, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α などの炎症性マーカーの発現が亢進することなども報告されている^{7,9)}。一方、ヒト骨芽細胞ではAGEの添加によりオステオカルシン(OCN), ALP, 石灰化結節の減少⁹⁻¹⁰⁾、さらに破骨細胞では骨吸収窩やTRAP陽性細胞の増加など石灰化を抑制する作用が報告されており¹¹⁾、骨粗鬆症や慢性歯周炎の分野で注目を集めている。これは血管平滑筋細胞への石灰化促進作用とは逆の作用であるが、シグナル経路としては両者ともにRAGE-MAPKが関与していることが報告されている¹²⁻¹³⁾。このようなAGEの組織特異的な作用の違いは依然解明されていないのが現状である。

2. 糖尿病歯髓の病態

糖尿病は口腔内の疾患とも密接に関わっている。糖尿病の第6の合併症である歯周病をはじめ、糖尿病患者の歯髓腔内には高頻度で石灰化物がみとめられることがわかっており、原因不明の歯痛と関連しているといわれている¹⁴⁾。歯髓組織の石灰化はよくみとめられる疾患で、全体の50%に存在するといわれている¹⁴⁾。332本の永久歯を組織学的に調べると歯髓結石の出現率は10-30歳で15%、31-51歳で44%、52-72歳で65%と、加齢に従ってその数を増す¹⁵⁾。また、歯髓結石の生成は加齢だけではなく糖尿病¹⁶⁾や血管疾患¹⁷⁾、Saethre-Chotzen症候群、Ehlers-Danlos症候群¹⁸⁾等の全身疾患とも関連しているといわれている。特に糖尿病患者では歯髓結石ばかりか、根尖性歯周炎の発現頻度が上昇することが報告されている^{16, 19-21)}。これは歯髓結石が根管内の解剖学的構造の物理的障壁になる^{15, 18)}ことで虚血状態を引き起こすことが関係していると考えられる。また、歯髓結石は歯内療法時の物理的障害となることで処置に困難をきたし¹⁸⁾、予後不良をひきおこす大きな要因となる。また、糖尿病歯髓では血管が障害された状態にあり、歯髓組織への栄養補給や創傷治癒が妨げられている¹⁶⁾。さらに多核白血球の機能が抑制される傾向にあるため、虚血や感染、壊死を起こしやすくなっている¹⁶⁾。これにより他の病変部から血中によって細菌やウイルスなどが歯髓に運ばれると、容易に感染を起こしてアナコレシスを引き起こす可能性がある¹⁶⁾。このように糖尿病における歯髓は易感染状態であり、感染後の処置も非常に困難であることが問題となっている。

我々の研究室ではこれまでに糖尿病ラットの歯髓組織に多数の歯髓結石や象牙前質の肥厚など石灰化が亢進していることを確認した。また、その周囲で骨基質タンパク質のひとつであるオステオポンチン(OPN)の発現が上昇していることを報告した¹⁹⁾。さらに60週齢の糖尿病ラットの歯髓組織には有意に炎症性細胞浸潤がみとめられた。しかしこのような糖尿病歯髓の病態やそのメカニズムについては、わかっていることが少ないのが現状

である。

3. 糖尿病歯髄における AGE の影響

以上のことから考えると糖尿病歯髄を解明するためには AGE が重要な物質であることがわかる。糖尿病歯髄組織を AGE との関連から検証した例は今までになく、もしこのメカニズムを解明できれば歯髄の病態解明の大きな知見となるばかりか、AGE が関連する他の全身疾患の治療創薬の一助となる可能性を秘めている。そこで、我々は AGE が歯髄の病的石灰化と炎症反応に影響を及ぼすかどうかを検証することを目的として *in vivo*, *in vitro* において実験を行った。まず、*in vivo* では糖尿病ラットと健常ラットの歯髄組織を用いて RAGE や石灰化関連マーカー、炎症反応関連マーカーの mRNA 発現を比較した。その結果、糖尿病ラットの歯髄組織において RAGE, OPN, OCN, 骨シアロタンパク質 (BSP), 象牙質シアロリン蛋白質 (DSPP) の mRNA 発現の有意な増加がみとめられた²⁰⁾。また、S100A8, S100A9, IL-1 β , IL-6, TNF- α 等の炎症反応関連マーカーの mRNA 発現の有意な増加をみとめた²¹⁾。このことから糖尿病ラットの歯髄組織では RAGE の発現量が増加するとともに、石灰化と炎症反応が引き起こされていることが示唆された。また、血漿中と歯髄組織内の AGE 量を ELISA にて定量したところ、健常ラットと比較して糖尿病ラットでは血漿中で 1.4 倍、歯髄組織内では 2.5 倍の値を示した²¹⁾。次にラット培養歯髄細胞の石灰化誘導能と炎症反応に及ぼす AGE の影響を *in vitro* で調べた。ラット培養歯髄細胞に AGE を添加して培養を継続すると、1-2 週目でアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の有意な上昇、3 週目では石灰化結節の形成量の有意な増加がみとめられた²⁰⁾。mRNA 発現においても、RAGE, OPN, OCN, BSP, DSPP や S100A8, S100A9, IL-1 β , IL-6, TNF- α の発現量の有意な増加をみとめた^{20,21)}。このことから AGE は歯髄細胞の RAGE の発現量を増加するとともに、石灰化と炎症反応を亢進させることが示された。さらにそのメカニズムを検証するために RAGE に対する siRNA や抗 RAGE 抗体、各種 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害剤 (PD98059, SB203580, SP600125) を用いて AGE の作用機序を *in vitro* で調べた。その結果 OPN と S100A8 は RAGE 及び MAPK 経路のうち p38 を介して、OCN と S100A9 は RAGE 及び MAPK 経路のうち ERK1/2 を介して発現が上昇することを示した²¹⁾。つまり AGE は歯髄細胞において RAGE-MAPK 経路を介して石灰化と炎症反応を亢進することが示された。以上の結果から、糖尿病の歯髄組織では AGE 誘導性に病的石灰化および炎症反応亢進が引き起こされており、さらにこれは RAGE-MAPK 経路を介している可能性が示された。

糖尿病歯髄における病態についてはいまだに不明な

点が多いが、今回 AGE との関連に注目することで新たな知見が得られた。今後は、病的石灰化を引き起こす由来細胞の同定や MAPK 経路の下流の転写因子の解析、AGE 阻害薬が病的石灰化や炎症反応を抑制しうるかなどを調べる必要があると考えられる。これらのアプローチを通して、糖尿病歯髄の病態を解明することができれば糖尿病歯髄のみならず AGE が関連する様々な糖尿病合併症の新しい予防・治療法の開発につながると期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始御指導と御校閲を賜りました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野 永田俊彦教授に甚大なる謝意を表します。また、本研究の実施に際し終始御指導と御協力を頂きました稲垣裕司助教、ならびに研究の円滑の発展のために数々の御教示と御援助頂いた徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Vlassara H, Bucala R and Striker L: Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70, 138-151 (1994)
- 2) Sasaki N, Toki S, Choei H, Saito T, Nakano N, Hayashi Y, Takeuchi M and Makita Z: Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res* 888, 256-262 (2001)
- 3) Sasaki N, Takeuchi M, Choei H, Kikuchi S, Hayashi Y, Nakano N, Ikeda H, Yamagishi S, Kitamoto T, Saito T and Makita Z: Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques. *Nurosci Lett* 326, 117-120, 2002
- 4) Kikuchi S, Shinpo K, Ogata A, Tsuji S, Takeuchi M, Makita Z and Tashiro K: Detection of N-(carboxymethyl) lysine (CML) and non-CML advanced glycation end-products in the anterior horn of amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 3, 63-68 (2002)
- 5) Ren X, Shao H, Wei Q, Sun Z and Liu N: Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells. *J Int Med Res* 37, 847-854 (2009)
- 6) Tanikawa T, Okada Y, Tanikawa R and Tanaka Y: Advanced glycation end products induce calcification through RAGE/p38 MAPK. *J Vasc Res* 46, 572-580 (2009)
- 7) Liu J, Zhao S, Tang J, Li Z, Zhong T, Liu Y, Chen D,

- Zhao M, Li Y, Gong X, Deng P, Wang JH and Jiang Y: Advanced glycation end products and lipopolysaccharide synergistically stimulate proinflammatory cytokine/chemokine production in endothelial cells via activation of both mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *FEBS J* 276, 4598-4606 (2009)
- 8) Zafar R, Nahid A and Tariq M.H: Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 product-mediated activation of mitogen-activated protein Kinases and nuclear factor- κ B in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology* 50, 838-851 (2011)
 - 9) Franke S, Ruster C, Pester J, Hofmann G, Oelzner P and Wolf G: Advanced glycation end products affect growth and function of osteoblasts. *Clin Exp Rheumatol* 29, 650-60 (2011)
 - 10) Sanguineti R, Storace D, Monacelli F, Federici A and Odetti P: Petosidine effects on human osteoblasts *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci* 1126, 166-172 (2008)
 - 11) Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K and Taketomi S: Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol* 8, 260-270 (1997)
 - 12) Mercer N, Ahmed H, Etcheverry SB, Vasta GR and Cortizo AM: Regulation of advanced glycation end product (AGE) receptors and apoptosis by AGEs in osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem* 306, 87-94 (2007)
 - 13) Alkhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, Pischon N, Trackman PC, Gerstenfeld L and Graves DT: Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 40, 345-353 (2007)
 - 14) Pashley DH and Lieweher FR. Structure and function of the dentin-pulp. Louis, MO, USA: Mosby Elsevier, 502-506 (2006)
 - 15) Hilmann G and Geurtsen W: Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell Tissue Res* 289, 145-154 (1997)
 - 16) Bender IB and Bender AB: Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* 29, 383-9 (2005)
 - 17) Nayak M, Kumar J and Prasad LK: A radiographic correlation between systemic disorders and pulp stones. *Ind Dent Res* 21, 369-73 (2010)
 - 18) Goga R, Chandler NP and Oginni AO: Pulp stones: a review. *Int Endod J* 41, 457-68 (2008)
 - 19) Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, Seto H, Kido J, Haneji T and Nagata T: High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues. *J Endod* 36, 1014-1020 (2010)
 - 20) Nakajima Y, Inagaki Y, Hiroshima Y, Kido J and Nagata T: Advanced glycation end-products enhance calcification in cultured rat dental pulp cells. *J Endod* 39, 873-878 (2013)
 - 21) Nakajima Y, Inagaki Y, Kido J and Nagata T: Advanced glycation end products increase expression of S100A8 and A9 via RAGE-MAPK in rat dental pulp cells. *Oral Dis* (in press) (2014)