

2 型糖尿病を有する歯周炎患者における *Porphyromonas gingivalis*とMnSODの関係

著者	渡邊 裕之
学位名	博士（歯学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成29年度
学位授与番号	30110甲第299号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00064594/

2 型糖尿病を有する歯周炎患者における
Porphyromonas gingivalis と MnSOD の関係

平成 29 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

渡邊 裕之

要旨

糖代謝や感染症による Reactive Oxygen Species (ROS) の上昇は組織障害を引き起こし、生物の寿命を短縮する。また、糖尿病や歯周炎によって生体内で発生する ROS を直接測定することは困難である。ROS を分解し、無毒化する抗酸化酵素の一つである Manganese Superoxide dismutase (MnSOD) は、ROS により発生する様々なストレスに対して誘導される。特に、血清中の MnSOD は体内の ROS の上昇を反映することが報告されている。

本研究では糖尿病患者の血清 MnSOD と歯周炎の関係を明らかにすることを目的として、糖尿病患者と非糖尿病患者を対象に血清 MnSOD 活性を検討した。さらに、単球系細胞の MnSOD 産生に対して異なるグルコース濃度と *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が与える影響を明らかにすることを目的として、ヒト単球系細胞株 (THP-1 細胞) を用いて MnSOD 産生機構を検討した。

北海道医療大学病院歯科に通院する糖尿病患者 76 名を糖尿病群、非糖尿病患者 78 名をコントロール群とした。糖尿病群ではコントロール群と比べて血清 MnSOD が有意に高かった。糖尿病群の血清 MnSOD を従属変数、血液検査・歯科検査および細菌検査項目を独立変数に設定して重回帰分析を行ったところ、血清 MnSOD は唾液 *P. gingivalis* 細菌数と有意な正の相関が認められた。このことから、糖尿病を有する歯周病患者では *P. gingivalis* 感染によって血清 MnSOD が上昇することが示唆された。

P. gingivalis lipopolysaccharide (LPS) 刺激によって THP-1 細胞の MnSOD mRNA は上昇した。異なるグルコース濃度下で *P. gingivalis* LPS 刺激を行ったところ、高いグルコース濃度 (300 mg/dl) で最も MnSOD mRNA 発現量が高かった。また、*P. gingivalis* LPS 刺激によって培養上清中の tumor necrosis factor (TNF) - α 産生が認められた。さらに、ヒト TNF- α 刺激によって THP-1 細胞の MnSOD mRNA 発現は上昇した。TNF- α converting enzyme inhibitor は *P. gingivalis* LPS 刺激による TNF- α 産生を完全に抑制したが、MnSOD mRNA 発現の上昇は完全に抑えられなかった。

これらのことから、糖尿病を有する歯周炎患者では *P. gingivalis* 感染による直接刺激、あるいは TNF- α を介した間接刺激によって血清 MnSOD 上昇が起こることが示唆された。糖尿病を有する歯周炎患者における *P. gingivalis* の除去は、ROS による様々な障害を抑制することが期待される。

目次

I. 緒言	1
II. 材料と方法	2
1. 実験材料	2
1) 被験者	2
2) 血液採取	2
3) 唾液採取	2
4) 細胞・培養培地	2
5) 試薬	3
2. 実験方法	3
1) 歯科検査と血液検査	3
2) 血清 MnSOD 活性の測定	3
3) 唾液細菌数の測定	3
(1) 唾液中の DNA 抽出	3
(2) 細菌 DNA の qPCR 解析	4
4) 細胞培養	4
5) MnSOD mRNA, TNF- α mRNA 発現	4
(1) 全 RNA の抽出	4
(2) cDNA の合成	4
(3) MnSOD mRNA, TNF- α mRNA の qPCR 解析	5
6) TNF- α の測定	5
7) 統計処理	5
III. 結果	6
1. 被験者の構成	6
2. 血清 MnSOD 活性	6
3. 細菌検査	6
4. 重回帰分析	7
5. <i>P. gingivalis</i> LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子の経時的発現変化	

-----	7
6. グルコースによる THP-1 細胞の MnSOD mRNA 発現変化 -----	7
7. グルコースと <i>P. gingivalis</i> LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現 -----	7
8. TNF- α 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現変化-----	7
9. TACE inhibitor と <i>P. gingivalis</i> LPS 刺激による THP-1 細胞の TNF- α 遺伝子発現 変化 -----	8
10. <i>P. gingivalis</i> LPS 刺激による THP-1 細胞の TNF- α 産生に対して TACE inhibitor が及ぼす影響 -----	8
11. <i>P. gingivalis</i> LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現に与える TACE inhibitor が及ぼす影響 -----	8
IV. 考察 -----	9
1. 糖尿病患者の血清 MnSOD と歯周炎の関係 -----	9
2. グルコースと <i>P. gingivalis</i> が ROS の産生細胞である単球系細胞の MnSOD 産 生に対して及ぼす影響 -----	10
3. 2型糖尿病を有する歯周炎患者における <i>P. gingivalis</i> による MnSOD の上昇 -----	11
V. 結論 -----	12
謝辞 -----	13
文献 -----	14
図表の説明 -----	19
表・付図	

I. 緒言

歯周炎は *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) などの歯周病原細菌が関与した慢性炎症性疾患であり、発症と進行には遺伝的、環境的リスクファクターが関与していると考えられている (Page & Kornman, 1997). とりわけ、糖尿病は歯周炎のリスクファクターであり、血糖コントロールの不良が歯周炎のリスクを上昇させることが明らかとなっている (Khader et al., 2006). 歯周炎による糖尿病患者の血糖コントロールの悪化も報告されていることから (Janket et al., 2005), 歯周炎と糖尿病が相互に影響を与えていることが知られている (Nagasawa et al., 2010).

Reactive Oxygen Species (ROS) は細胞の老化を促進し、様々な疾患を悪化させる分子として注目されており (Liochev, 2013), グルコース代謝や脂質代謝のような内因性の生理反応, または大気汚染や放射線のような外因性のストレスにより生じることが知られている (Bhattacharyya et al., 2014). 歯周炎と糖尿病は ROS を増加させる代表的な疾患であることが示唆されている (Buczko et al., 2015). しかし, 生体内で発生する ROS は直接測定することが困難であり, これまで ROS により糖尿病では病態が悪化すること (Kaneto et al., 2010), 歯周炎では組織破壊が亢進すること (Chapple & Matthews, 2007; Waddington et al., 2000) が明らかになっているが, 糖尿病を有する歯周炎患者に対する ROS の影響は十分に明らかになっていない.

Manganese superoxide dismutase (MnSOD) は細胞内で発生する ROS を無毒化する主要な抗酸化酵素である (Fridovich, 1995). MnSOD はヒト単球系細胞によって産生されること (Kamiya et al., 2011), ROS の上昇に伴って MnSOD も上昇することが報告されているが (Li et al., 2010), 歯周炎に伴って増加する単球が産生する ROS とその除去を行う MnSOD 産生についての関係は明らかになっていない.

本研究では糖尿病患者の血清 MnSOD と歯周炎の関係を明らかにすることを目的として糖尿病患者と非糖尿病患者を対象に血清 MnSOD 活性を検討した. さらに血清 MnSOD の産生細胞である単球系細胞の MnSOD 産生に対して, グルコース濃度および *P. gingivalis* 刺激が与える影響を明らかにすることを目的として, ヒト単球系細胞株を用いて *P. gingivalis* LPS 刺激による MnSOD 産生機構を検討した.

II. 材料と方法

本研究は北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得て、実施した (承認番号 2010004). 糖尿病患者と非糖尿病患者を対象に血清 MnSOD を検討し、さらに THP-1 細胞を用いて *P. gingivalis* LPS 刺激による MnSOD 産生機構を検討した.

1. 実験材料

1) 被験者

北海道医療大学病院歯科に通院する 76 名の 2 型糖尿病患者群と 78 名の糖尿病に罹患していないコントロール群を被験者とした. 2 型糖尿病患者群の平均年齢は 64.8 ± 12.6 歳で性別は男性が 41 人, 女性が 35 人であった. コントロール群の平均年齢は 57.0 ± 19.7 歳で性別は男性が 30 人, 女性が 48 人であった. 2 型糖尿病は糖尿病診療ガイドライン 2017 に従い内科医によって診断された. 歯周炎は歯周治療の指針 2015 に従い歯科医によって診断された.

2) 血液採取

血液は北海道医療大学病院臨床検査部で採取した. 前腕屈側の肘正中皮静脈を選択し, 採血を行い, 一部を血清 MnSOD 測定用に取り分けた. 血清は血液をバキュテイナ採血管 (Becton, Dickinson and Company) に採取し, 4°C で 15 分間, $1,500 \times g$ で検体を遠心分離し, 血清を -80°C で保管した.

3) 唾液採取

唾液は北海道医療大学病院歯科で初診時に採取した. 治療前の刺激時唾液を OMNIgene Discover (DNA Genotek) を用いて採取し, 常温で保管した.

4) 細胞・培養培地

THP-1 細胞は JCRB 細胞バンクより購入した. 培養培地はグルコース不添加の Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (和光純薬工業) に Fetal Bovine Serum (FBS) (Cambrex Corporation), ペニシリン-ストレプトマイシン (PS) (Sigma-Aldrich Co. LLC) およびグルコース (Sigma-Aldrich Co. LLC) を添加して使用した.

5) 試薬

lipopolysaccharide (LPS), from *P. gingivalis* ATCC 33277 (和光純薬工業), D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich Co. LLC), Human recombinant Tumor Necrosis Factor (TNF) - α (和光純薬工業), TNF - α converting enzyme (TACE) inhibitor (S-43077, N-Hydroxy-1-(1-isobutyl-4-piperidinyl)-[3-{4-(2-methyl-4-quinolinyl)methoxyphenyl}sulfonyl]-2-propanyl formamide) (科研製薬) を使用した. MnSOD 測定は Superoxide Dismutase Colorimetric Activity Kit (Arbor Assays) を用いた. TNF- α 測定は DuoSet ELISA Development System (RESEARCH AND DIAGNOSTIC SYSTEMS) を用いた.

2. 実験方法

1) 歯科検査と血液検査

歯科検査として現在歯数, Bleeding on probing (BoP), Probing pocket depth (PPD) を測定した. 血液検査から LDL コレステロール, HDL コレステロール, 中性脂肪, 空腹時血糖, HbA1c を利用した. 診療録から性別, 問診から喫煙の有無を利用した.

2) 血清 MnSOD 活性の測定

Superoxide Dismutase Colorimetric Activity Kit (Arbor Assays) を用いてプロトコールに従い, Xanthine Oxidase に対する阻害反応を定量することで MnSOD 活性を測定した. MnSOD 活性はマイクロプレート分光光度計 SPECTRA max 340PC (Molecular Devices) を用い 450 nm の吸光度で測定した. MnSOD 標準曲線を作成し, 検体の活性を算出した.

3) 唾液細菌数の測定

1) 唾液中の DNA 抽出

OMNIgene Discover (DNA Genotek) で採取した唾液は, キットのプロトコールに従って処理を行い, カラムに DNA を吸着させて洗浄後, 抽出バッファーで DNA を回収した.

2) 細菌 DNA の qPCR 解析

P. gingivalis の 16S rRNA に特異的なプライマー (表 1) と KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS) を用いて Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) を行った. 既知の *P. gingivalis* ATCC 33277 を陽性対象として段階希釈して測定して標準曲線を作成し, 検体の細菌数を算出した.

4) 細胞培養

THP-1 細胞は 1×10^6 cell/ml に調整して 37°C, 5%CO₂ 下で培養した. 培養条件は特に指定が無ければ 100 mg/dl のグルコース, 10% FBS, 1%PS を添加した RPMI1640 を用いた. *P. gingivalis* LPS は 1 µg/ml で刺激した. 高グルコース条件にする場合は 100 から 200 あるいは 300 mg/dl に変化させた. TNF-α は 1 ng/ml と TACE inhibitor は 40 µmol は培養開始時に添加した. 培養上清と細胞は一定時間培養後にそれぞれ回収し, 測定まで-80°Cで保管した.

5) MnSOD mRNA, TNF-α mRNA 発現の検討

(1) 全 RNA の抽出

培養が終了した THP-1 細胞の培養上清を取り除いた後に TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) を THP-1 細胞に加えた. クロロホルム添加後, 混和して 20°C で 3 分間静置した. 12,000 × g, 4°C で 15 分間遠心操作後, 水相の RNA を取り出し, イソプロピルアルコールを加えて混和した. 12,000 × g, 4°C で 10 分間遠心操作後, 上清を除去し, 75%エタノールで 2 回洗浄した後, RNase-free water で調整した.

(2) cDNA の合成

QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて抽出した RNA の逆転写を行った. 抽出した RNA に gDNA Wipeout Buffer を加えて 42°C, 2 分間反応させ Genomic DNA を除去した. その後, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix を加えて, 42°C, 15 分間, 95°C で 3 分間反応させ, cDNA を合成した.

(3) MnSOD mRNA, TNF- α mRNA の qPCR 解析

MnSOD, TNF- α , β -actin に特異的なプライマー (表 1) と KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPABIOSYSTEMS) を用いて qPCR の SYBR GREEN 法を行い, mRNA 発現量を定量した. サーマルサイクラーに LightCycler® Nano システム (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.) を使用した. 刺激時の THP-1 細胞の mRNA 発現を陽性対象とし, 段階希釈後に測定して検体と陽性対象との発現比を求め, 得られた MnSOD, TNF- α と β -actin の値の比を MnSOD mRNA 発現量として算出した.

6) TNF- α の測定

培養上清中の TNF- α 量の測定は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で行った. Coating buffer を 100 μ l 添加し, 室温で 12 時間静置して捕捉用抗体をコートした. その後, プレートを Wash Buffer で 3 回洗浄し乾燥した. Blocking buffer を添加し, 室温で 1 時間静置した. プレートを Wash buffer で 3 回洗浄し乾燥後, それぞれのウェルに Standard と検体を 100 μ l 添加し, 室温で 2 時間静置した. Wash buffer でプレートを 3 回洗浄し乾燥後, 一次抗体を 100 μ l 添加し, 室温で 2 時間静置した. Wash Buffer でプレートを 3 回洗浄し乾燥後, 二次抗体 100 μ l 添加し, 暗所に室温で 20 分間静置した. プレートを Wash Buffer で 3 回洗浄し乾燥後, Substrate solution を 100 μ l 添加し, 暗所に室温で 30 分間静置した. その後, Stop solution を 100 μ l 添加し, 反応を停止させた. TNF- α 量はマイクロプレート分光光度計 SPECTRA max 340PC (Molecular Devices) を用い 450 nm の吸光度で測定した. TNF- α 標準曲線を作成し, 検体の濃度を算出した.

7) 統計処理

統計解析は SPSS® (International Business Machines Corporation) を用い, 2 群間の比較は Mann-Whitney U test を用いた. 多群間の比較は ANOVA with Tukey's HSD Post Hoc Test を用いた. また, 糖尿病群の血清 MnSOD を従属変数に設定し, 血液検査・歯科検査および細菌検査項目 (年齢, 性別, 現在歯数, BoP 率, PPD4 mm 以上の歯数の割合, *P. gingivalis* 細菌数, 喫煙, HbA1c) を独立変数に設定して重回帰分析を行った. 有意水準を $p < 0.05$ とした.

III. 結果

1. 被験者の構成

2 型糖尿病群ではコントロール群と比較して空腹時血糖は有意に高く ($p < 0.001$), HDL コレステロールが有意に低かった ($p < 0.05$). 2 型糖尿病群の PPD4 mm 以上の割合, BoP はコントロール群と比較して有意に高く ($p < 0.001$), 現在歯数は有意に少なく ($p < 0.05$), 歯周炎の人数は有意に多かった ($p < 0.05$) (表 2).

2. 血清 MnSOD 活性

2 型糖尿病群ではコントロール群と比較して血清 MnSOD が有意に高かった ($p < 0.001$) (図 1).

2 型糖尿病群とコントロール群をさらに歯周炎の有無で分け, 4 群間で血清 MnSOD の比較を行った. 歯周炎の無いコントロール群は 32 人で, 歯周炎を有するコントロール群は 46 人であった. 歯周炎の無い 2 型糖尿病群は 9 人で, 歯周炎を有する 2 型糖尿病群は 67 人であった. 歯周炎を有するコントロール群では歯周炎の無いコントロール群よりも有意に血清 MnSOD が高かったが ($p < 0.001$), 歯周炎を有する 2 型糖尿病群と歯周炎の無い 2 型糖尿病群の血清 MnSOD には有意差が認められなかった. 歯周炎を有する 2 型糖尿病群の血清 MnSOD は歯周炎の無いコントロール群よりも有意に高かった ($p < 0.001$) (図 2).

3. 細菌検査

2 型糖尿病群とコントロール群をさらに歯周炎の有無で分け, 4 群間で唾液 *P. gingivalis* 細菌数の比較を行った. 歯周炎を有するコントロール群では歯周炎の無いコントロール群よりも有意に唾液 *P. gingivalis* 細菌数が多かったが ($p < 0.05$), 歯周炎を有する 2 型糖尿病群と歯周炎の無い 2 型糖尿病群の唾液 *P. gingivalis* 細菌数には有意差が認められなかった. 歯周炎を有する 2 型糖尿病群の唾液 *P. gingivalis* 細菌数は歯周炎の無いコントロール群よりも有意に多かった ($p < 0.001$) (図 3).

4. 重回帰分析

2型糖尿病群の血清 MnSOD と相関する因子を検討するために重回帰分析を行った。従属変数として血清 MnSOD, 独立変数として年齢, 性別, 現在歯数, BoP 率, 4 mm 以上の PPD を有する歯数の割合, *P. gingivalis* 細菌数, 喫煙, HbA1c を設定した。重回帰分析の結果 MnSOD に対して *P. gingivalis* 細菌数が有意な因子として選択された ($p < 0.05$) (表 3)。

5. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子の経時的発現変化

P. gingivalis LPS 刺激による経時的な MnSOD 発現を調べるために 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間後の MnSOD mRNA 発現を検討した。THP-1 細胞の MnSOD mRNA 発現は *P. gingivalis* LPS 刺激後に有意に増加して 12 時間でピークを迎え ($p < 0.001$), それ以降は低下した (図 4)。

6. グルコースによる THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現変化

高グルコース状態が MnSOD 発現に与える影響を調べるために, グルコース濃度を変化させて (100, 200, 300 mg/dl), 12 時間後の MnSOD mRNA 発現を検討した。グルコース濃度を増加させることによりわずかに MnSOD mRNA 発現は上昇したが, 有意差は認められなかった (図 5)。

7. グルコースと *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現

正常グルコース (100 mg/dl) および高グルコース (200, 300 mg/dl) 下における *P. gingivalis* LPS (1 μ g/ml) 刺激が MnSOD mRNA 発現に与える影響を検討した。

グルコース 300 mg/dl で *P. gingivalis* LPS 刺激した時の MnSOD mRNA 発現が最も高く, 全てのグルコース濃度 (100, 200, 300 mg/dl) で *P. gingivalis* LPS 刺激を行わない時の MnSOD mRNA 発現との間に有意差が認められた ($p < 0.001$) (図 6)。

8. TNF- α 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現変化

TNF- α 刺激が MnSOD 発現に与える影響を調べるために THP-1 細胞を TNF- α (0.01, 0.1, 1, 10 ng/ml) で刺激して 12 時間後の MnSOD mRNA 発現を検討した。MnSOD mRNA の発現は TNF- α 刺激によって有意に上昇した ($p < 0.05$) (図 7)。

9. TACE inhibitor と *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の TNF- α 遺伝子発現に及ぼす影響

P. gingivalis LPS 刺激による THP-1 細胞の TNF- α mRNA 発現に TACE inhibitor が与える影響を調べるために TACE inhibitor 存在・非存在下で THP-1 細胞を *P. gingivalis* LPS で刺激して TNF- α mRNA 発現を検討した。*P. gingivalis* LPS 刺激によって TNF- α mRNA 発現は上昇した。この *P. gingivalis* LPS 刺激による TNF- α mRNA 発現上昇は TACE inhibitor 存在下でも認められ、*P. gingivalis* LPS 刺激後の TNF- α mRNA は未刺激時よりも有意に高かった ($p < 0.001$) (図 8)。

10. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の TNF- α 産生に対して TACE inhibitor が及ぼす影響

P. gingivalis LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) 刺激による THP-1 細胞の TNF- α 産生に TACE inhibitor (40 $\mu\text{mol/l}$) が与える影響を調べるために 12 時間後の培養上清中の TNF- α 産生を検討した。*P. gingivalis* LPS 刺激によって TNF- α 産生は有意に上昇した ($p < 0.001$)。この *P. gingivalis* LPS 刺激による TNF- α 産生は TACE inhibitor によって完全に抑制された ($p < 0.001$) (図 9)。

11. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現に対して TACE inhibitor が及ぼす影響

P. gingivalis LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD mRNA 発現に TACE inhibitor が与える影響を調べるために TACE inhibitor 存在・非存在下で THP-1 細胞を *P. gingivalis* LPS で刺激して MnSOD mRNA 発現を検討した。*P. gingivalis* LPS 刺激によって MnSOD mRNA 発現は有意に上昇した ($p < 0.001$)。この *P. gingivalis* LPS 刺激による MnSOD mRNA 発現上昇は TACE inhibitor 存在下でも認められ、*P. gingivalis* LPS 刺激後の MnSOD mRNA は未刺激時よりも有意に高かった ($p < 0.001$) (図 10)。

IV. 考察

1. 糖尿病患者の血清 MnSOD と歯周炎の関係

本研究では糖尿病患者の血清 MnSOD が非糖尿病患者と比較して高く、糖尿病患者における MnSOD の過去の報告を支持する結果となった (沢木, 亀井, 1996). 歯周炎の有無を検討に加えたところ, コントロール群においては歯周炎患者の血清 MnSOD が非歯周炎患者よりも有意に高かったが, 2型糖尿病群では歯周炎患者と非歯周炎患者で有意差は認められなかった. 2型糖尿病を有する歯周炎患者で血清 MnSOD が最も高かったという結果は Thomas らの報告 (Thomas et al., 2014) と一致した. これは, 歯周炎と糖尿病は共に ROS を増加させ, その除去のために多量の MnSOD が産生された可能性が考えられる。

このことから, 非糖尿病患者においては歯周炎によって MnSOD は上昇するが, 糖尿病患者では異なる事が示唆された. MnSOD はミトコンドリアに局在しており, 肝臓などの代謝の活発な臓器において多く産生されていると考えられている (Indo et al., 2012). 肝疾患における MnSOD の上昇は肝臓における ROS 産生の亢進を反映すると考えられており, 肝疾患患者では血清 MnSOD が上昇することが報告されている (Takami et al., 2010). 血清 MnSOD の上昇は肝疾患と密接に関連し, 血清 MnSOD の上昇が認められる人では C 型肝炎における肝癌の発症リスクが高いことが明らかとなっている (Tamai et al., 2011). また非糖尿病群において歯周炎患者では非歯周炎患者と比較して *P. gingivalis* 細菌数が有意に多かったが, 糖尿病群においては歯周炎の有無で有意な差は認められず, MnSOD と同様な傾向が認められた. これは, 2型糖尿病群の非歯周炎患者は 9 人で, 2型糖尿病群の歯周炎患者は 67 人であったことから, 2型糖尿病群のほとんどは歯周炎に罹患しており, 2型糖尿病群の非歯周炎患者の人数が少ないために統計学的な差がみられなかった可能性も排除できない. さらに糖尿病患者の血清 MnSOD を従属変数とした重回帰分析によって *P. gingivalis* 細菌数との間に有意な正の相関が認められた. このことから糖尿病患者では *P. gingivalis* の感染に伴って血清 MnSOD が上昇することが示唆される. 本研究において, 2型糖尿病群ではコントロール群と比較して血清 MnSOD が高かったことから, 糖尿病群においては ROS の産生が高いことが示唆された. これは Rochette らの糖尿病では ROS 産生が亢進しているという報告 (Rochette et al., 2014) と一致した.

このように我々の行った臨床的検討から、血清 MnSOD 活性に影響を与える因子として糖尿病があること、さらに *P. gingivalis* に感染していることが重要であると確認された。

2. グルコースと *P. gingivalis* が ROS の産生細胞である単球系細胞の MnSOD 産生に対して及ぼす影響

肝臓における ROS の産生は主としてクッパー細胞や炎症性細胞によって担われることが報告されており (Jaeschke & Farhood, 1991), また THP-1 細胞は様々なストレスに対して MnSOD を産生することが報告されている。今回の研究において *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞における MnSOD mRNA の発現を経時的に調べたところ *P. gingivalis* 感染に伴い MnSOD 発現の増加がみられることが示された。グルコース濃度は正常グルコース濃度を 5.5 mM とし、高グルコース濃度を 15 mM としている報告 (Wu et al., 2009) をもとに mg/dl に換算し、また、ヒトの空腹時血糖は 100 mg/dl が正常であり、200, 300 mg/dl は高血糖状態であることから設定した。100 mg/dl から 300 mg/dl に上昇させて *P. gingivalis* LPS 刺激を行った場合、グルコース 100 mg/dl よりも 300 mg/dl における *P. gingivalis* LPS 刺激で最も MnSOD mRNA 発現の上昇が大きかった。*P. gingivalis* 感染は好中球の ROS 産生を促進すると報告されており (Al-Shibani et al., 2011), 糖尿病の高血糖状態は ROS の産生を招くことが報告されている (Yan, 2014)。

また、ROS により MnSOD が誘導されるという報告があり (White & Tsan, 2001), これらのことから歯周炎における *P. gingivalis* 感染と糖尿病による高血糖状態により ROS の産生が促進され、それに対して MnSOD 産生が亢進した可能性が示唆される。しかし、今回の研究では ROS については測定が困難であり *P. gingivalis* 感染と糖尿病による高血糖状態による ROS の産生が促進され、MnSOD がそれに対して産生される機構に関しては更なる検討が必要である。

単球による MnSOD 産生は、刺激の種類によって産生機構が異なる事が報告されている。X 線照射によっても単球から MnSOD が誘導されるが、その際の MnSOD 産生には TNF- α 産生が必要であり、X 線照射による MnSOD 産生誘導は TNF- α のオートクラインによって起こると考えられている (Hachiya et al., 1997)。また、大腸菌の LPS 刺激による MnSOD 産生では、TNF- α のオートクラインを介して MnSOD

産生が上昇するものの、大腸菌の変異株の LPS では TNF- α 産生を誘導せずに、MnSOD 産生を上昇させるものが報告されており、TNF- α のオートクラインを介さずに直接 MnSOD 産生を上昇させる経路が存在することも示されている (Tian et al., 1998). 本研究においても *P. gingivalis* LPS 刺激により TNF- α mRNA および MnSOD mRNA が誘導された。また、TNF- α による刺激でも MnSOD mRNA が誘導されたことから、*P. gingivalis* LPS 刺激においても TNF- α のオートクラインを介する MnSOD 産生経路が存在することが示唆された。

TNF- α の細胞外への分泌は、細胞内で産生された膜結合型 TNF- α が TACE によって切断されることで行われている (Black et al., 1997). このことから *P. gingivalis* LPS 刺激を行う際に、TACE inhibitor を加えることで TNF- α の産生を抑制すれば、TNF- α のオートクラインに依存しない経路による MnSOD mRNA の上昇が観察できると考えた。TACE inhibitor は *P. gingivalis* LPS 刺激による TNF- α mRNA 発現に影響を与えなかったが、培養上清への TNF- α 産生を完全に抑制したことから、TACE inhibitor は *P. gingivalis* LPS による TNF- α 産生を選択的に抑制することが確認された。本研究では TACE inhibitor 存在下の *P. gingivalis* LPS 刺激においても MnSOD mRNA の上昇が認められたことから、*P. gingivalis* LPS 刺激による MnSOD 産生の誘導には TNF- α 非依存性の経路が存在することが明らかとなった。

3. 2型糖尿病を有する歯周炎患者における *P. gingivalis* による MnSOD の上昇

糖尿病患者における血清 MnSOD と *P. gingivalis* 細菌数には有意な正の相関が認められ、糖尿病患者では *P. gingivalis* 感染によって血清 MnSOD が上昇することが示唆された。歯周炎では頻繁に菌血症が生じており、プラーク中の細菌に *P. gingivalis* が存在する場合には、その LPS が血流を介して単球に作用することは比較的高頻度で起こっていると考えられている (Suwatanapongched et al., 2010). 本研究で認められた血清 MnSOD の上昇がどこで起こるのかは明らかでない。*P. gingivalis* LPS が THP-1 細胞の MnSOD mRNA の上昇を誘導したことから、菌血症によって *P. gingivalis* LPS が作用する度に単球、あるいは肝臓などの遠隔臓器の炎症性細胞で ROS による MnSOD 産生が誘導される可能性がある。あるいは歯周炎局所の炎症性細胞が *P. gingivalis* 感染に伴って MnSOD を産生することが血清 MnSOD の上昇に寄与する可能性も考えられる。血清 MnSOD の上昇は ROS による障害を反映し

ていると考えられていることから (Tamai et al., 2011), その産生細胞がどこにあるとしても, 歯周治療による *P. gingivalis* の除去は, 糖尿病を有する歯周炎患者で ROS による様々な障害を抑制することが期待される.

本研究の限界としてコントロール群において HbA1c を測定していないことがあげられるが, 空腹時血糖と HbA1c の相関に関する既報 (Ito et al., 2000) を参考にコントロール群の平均 HbA1c を換算すると 5.26% であった. 糖尿病群は糖尿病治療を受けており, 非常に良好な血糖コントロールが行われていた. 0.8% の平均 HbA1c の差で血清 MnSOD 活性に有意差があった. 血糖コントロールが不良な治療前の糖尿病患者で検討した場合, 血清 MnSOD 活性はさらに高値である可能性が考えられる.

また, 本研究の被験者の中には複数の疾患に罹患している者もあり, 全ての血清 MnSOD 活性の上昇を, *P. gingivalis* 感染と糖尿病だけで説明するのは困難である. 本研究の 2 型糖尿病群の HDL コレステロールが有意に低いという結果はリポ蛋白代謝の異常により, 中性脂肪が上昇し, HDL コレステロールが低下しやすいという報告 (Betteridge, 1994) を支持しているが, 脂質代謝が MnSOD に与えるかについては明らかではない. 本研究は横断研究であるため, *P. gingivalis* 感染と血清 MnSOD の相関について, 直接的な因果関係を明らかにすることができないことがあげられる. 今後は歯周治療による *P. gingivalis* 感染の除去によって血清 MnSOD の濃度を低下するか検討し, *P. gingivalis* 感染が血清 MnSOD に与える影響を明らかにする必要がある.

V. 結論

結果から 2 型糖尿病を有する歯周炎患者における血清 MnSOD と *P. gingivalis* の関係とその機構について, 以下の結論を得た.

1. 2 型糖尿病群とコントロール群を比較した時, 2 型糖尿病群で血清 MnSOD が有意に高く, 歯周炎の重症度が重度だった.
2. 糖尿病患者の唾液中の *P. gingivalis* 細菌数は血清 MnSOD と有意な正の相関を示していた.
3. *P. gingivalis* LPS 刺激により THP-1 細胞は MnSOD mRNA 発現を増大させた.

4. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD mRNA 発現は血清中の正常とみなされるグルコース 100 mg/dl よりも高血糖状態であるグルコース 300 mg/dl で高い傾向がみられた.
5. TNF- α 刺激により THP-1 細胞は, MnSOD mRNA 発現を増大させた.
6. *P. gingivalis* LPS 刺激により THP-1 細胞は, TNF- α を産生した.
7. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の TNF- α 産生は, TACE inhibitor によって阻害された.
8. TACE inhibitor は, *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD mRNA 発現を抑制しなかった.

本研究では, 2 型糖尿病を有する歯周炎患者の血清 MnSOD は唾液中の *P. gingivalis* 細菌数と有意な正の相関を持つこと, 血清 MnSOD の産生細胞である単球系細胞は *P. gingivalis* LPS と反応して MnSOD 発現を上昇させることを初めて明らかにした. これらのことから, 糖尿病患者の歯周炎において *P. gingivalis* 感染は MnSOD の上昇を引き起こしており, これは ROS による障害が起こったことによる防御反応だと考えられる. また, *P. gingivalis* の除去は, ROS による様々な障害の抑制につながることを期待される.

謝辞

本論文は筆者が, 北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである. 本学歯学部口腔機能修復・再建学系歯周歯内治療学分野教授 古市保志先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き, その遂行にあたって終始, ご指導を戴いた. ここに深謝の意を表す. また, 本学歯学部総合教育学系臨床教育管理運営教授 長澤敏行先生にはご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた. ここに深謝の意を表す. さらに, 本学歯学部口腔機能修復・再建学系歯周歯内治療学分野の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言を戴いた. ここに感謝の意を表す.

文献

- Al-Shibani NK, Labban NY, Kowolik MJ, Ruby JD & Windsor LJ. Responses of human neutrophils to nicotine and/or Porphyromonas gingivalis. *J Periodontol* 82: 1504-1508, 2011.
- Betteridge DJ. Diabetic dyslipidemia. *Am J Med* 96: 25S-31S, 1994.
- Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S & Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 94: 329-354, 2014.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ & Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385: 729-733, 1997.
- Buczko P, Zalewska A & Szarmach I. Saliva and oxidative stress in oral cavity and in some systemic disorders. *J Physiol Pharmacol* 66: 3-9, 2015.
- Chapple IL & Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2000 43: 160-232, 2007.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112, 1995.
- Hachiya M, Shimizu S, Osawa Y & Akashi M. Endogenous production of tumour necrosis factor is required for manganese superoxide dismutase expression by irradiation in the human monocytic cell line THP-1. *Biochem J* 328 (Pt 2): 615-623, 1997.
- Indo HP, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, Yen HC, Kakinuma S, Matsumoto K, Nakanishi I, St Clair W, St Clair DK, Matsui H, Cornette R, Gusev O, Okuda T, Nakagawa Y, Ozawa T & Majima HJ. Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced

apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Radic Res* 46: 1029-1043, 2012.

Ito C, Maeda R, Ishida S, Sasaki H & Harada H. Correlation among fasting plasma glucose, two-hour plasma glucose levels in OGTT and HbA1c. *Diabetes Res Clin Pract* 50: 225-230, 2000.

Jaeschke H & Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260: G355-362, 1991.

Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE & Jones JA. Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies. *J Dent Res* 84: 1154-1159, 2005.

Kamiya T, Makino J, Hara H, Inagaki N & Adachi T. Extracellular-superoxide dismutase expression during monocytic differentiation of U937 cells. *J Cell Biochem* 112: 244-255, 2011.

Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M & Matsuoka TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010: 453892, 2010.

Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A & Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications* 20: 59-68, 2006.

Li Z, Shi K, Guan L, Cao T, Jiang Q, Yang Y & Xu C. ROS leads to MnSOD upregulation through ERK2 translocation and p53 activation in selenite-induced apoptosis of NB4 cells. *FEBS Lett* 584: 2291-2297, 2010.

Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* 60: 1-4, 2013.

Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Koikeguchi S, Petelin M, Arai H, Tanimoto I, Nishimura F & Takashiba S. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39: 81-86, 2003.

Nagasawa T, Noda M, Katagiri S, Takaichi M, Takahashi Y, Wara-Aswapati N, Kobayashi H, Ohara S, Kawaguchi Y, Tagami T, Furuichi Y & Izumi Y. Relationship between Periodontitis and Diabetes - Importance of a Clinical Study to Prove the Vicious Cycle. *Internal Medicine* 49: 881-885, 2010.

Murata H, Hattori T, Maeda H, Takashiba S, Takigawa M, Kido J & Nagata T. Identification of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 (TARDBP43; TDP-43) as a novel factor for TNF- α expression upon lipopolysaccharide stimulation in human monocytes. *J Periodontol Res* 50: 452-460, 2015.

Page RC & Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 14: 9-11, 1997.

Partridge J, Carlsen H, Enesa K, Chaudhury H, Zakkar M, Luong L, Kinderlerer A, Johns M, Blomhoff R, Mason JC, Haskard DO & Evans PC. Laminar shear stress acts as a switch to regulate divergent functions of NF- κ B in endothelial cells. *FASEB J* 21: 3553-3561, 2007.

Rochette L, Zeller M, Cottin Y & Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta* 1840: 2709-2729, 2014.

Suwatanapongched P, Surarit R, Srisatjaluk R & Offenbacher S. Translocation of *Porphyromonas gingivalis* infected monocytes and associated cellular responses. *Asian Pac J Allergy Immunol* 28: 192-199, 2010.

Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T & Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for

oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatol Res* 40: 438-445, 2010.

Tamai T, Uto H, Takami Y, Oda K, Saishoji A, Hashiguchi M, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A & Tsubouchi H. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 17: 4890-4898, 2011.

Thomas B, Rao A, Prasad BR & Kumari S. Serum levels of antioxidants and superoxide dismutase in periodontitis patients with diabetes type 2. *J Indian Soc Periodontol* 18: 451-455, 2014.

Tian L, White JE, Lin HY, Haran VS, Sacco J, Chikkappa G, Davis FB, Davis PJ & Tsan MF. Induction of Mn SOD in human monocytes without inflammatory cytokine production by a mutant endotoxin. *Am J Physiol* 275: C740-747, 1998.

Waddington RJ, Moseley R & Embery G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* 6: 138-151, 2000.

White JE & Tsan MF. Differential induction of TNF-alpha and MnSOD by endotoxin: role of reactive oxygen species and NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 164-169, 2001.

Wu CH, Wu CF, Huang HW, Jao YC & Yen GC. Naturally occurring flavonoids attenuate high glucose-induced expression of proinflammatory cytokines in human monocytic THP-1 cells. *Mol Nutr Food Res* 53: 984-995, 2009.

Yan LJ. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res* 2014: 137919, 2014.

日本歯周病学会. 歯周治療の指針 2015. 医歯薬出版:2016, 26-27.

日本糖尿病学会. 糖尿病診療ガイドライン 2016. 南江堂:2016, 5-6.

沢木椿二, 亀井泰. Superoxide dismutase. 日臨 44 夏季臨時増刊号 : 553-558, 1996.

図表の説明

表 1. qPCR に用いたプライマー

表 2. 被験者の構成

ND: Not done

* $p < 0.05$, Mann-Whitney U test, † $p < 0.05$, Pearsons's chi-square test

表 3. 2 型糖尿病における血清 MnSOD の重回帰分析

* $p < 0.05$, Multiple regression analysis

図 1. コントロール群と 2 型糖尿病群の血清 MnSOD

平均±標準偏差, 平均値の差は Mann-Whitney U test を行った. * $p < 0.05$.

図 2. 歯周炎を伴う/伴わない 2 型糖尿病群とコントロール群における血清 MnSOD

平均±標準偏差, 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行った. * $p < 0.05$.

図 3. 歯周炎を伴う/伴わない 2 型糖尿病群とコントロール群における *P. gingivalis* 細菌数

平均±標準偏差, 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行った. * $p < 0.05$.

図 4. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子の経時的発現変化

THP-1 細胞に *P. gingivalis* 由来の LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) を作用させ, 実験前 (0 時間), および 6, 12, 24, 72 時間の各時点で RNA を抽出し, qPCR 法にて MnSOD 遺伝子発現量を測定した ($n = 6$). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補

正した (平均 ± 標準偏差). 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行い, 有意差は * $p < 0.05$, vs. 0 時間とした.

図 5. グルコースによる THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現変化

THP-1 細胞にグルコース (100, 200, 300 mg/dl) と *P. gingivalis* 由来の LPS (0, 1 μ g/ml) を作用させ, 12 時間培養して RNA を抽出し, qPCR 法にて MnSOD 遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 ± 標準偏差). 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行い, 有意差は * $p < 0.05$ とした.

図 6. グルコースと *P.gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現

THP-1 細胞に対して、異なるグルコース濃度 (100, 200, 300 mg/dl) で 12 時間培養したのち RNA を抽出し, qPCR 法にて MnSOD 遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 ± 標準偏差). 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行い, 有意差は * $p < 0.05$ とした.

図 7. TNF- α 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現変化

THP-1 細胞に TNF- α (0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/ml) を作用させ, 12 時間培養したのち RNA を抽出し, qPCR 法にて MnSOD 遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 ± 標準偏差). 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行い, 有意差は * $p < 0.05$ とした.

図 8. TACE inhibitor と *P. gingivalis* LPS 刺激における THP-1 細胞の TNF- α 遺伝子発現変化

THP-1 細胞に TACE inhibitor (0, 40 μ mol/l) と *P. gingivalis* 由来の LPS (0, 1 μ g/ml) を作用させ, 12 時間培養したのち RNA を抽出し, qPCR 法にて TNF- α 遺伝子発現

量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 \pm 標準偏差). 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行い, 有意差は $*p < 0.05$ とした.

図 9. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の TNF- α 産生に対して TACE inhibitor が及ぼす影響

THP-1 細胞に TACE inhibitor (0, 40 μ mol/l) と *P. gingivalis* 由来の LPS (0, 1 μ g/ml) を作用させ, 12 時間培養しその後培養上清を回収し, ELISA 法にて TNF- α を測定した (n = 6). 結果は平均 \pm 標準偏差で示した. 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行い, 有意差は $*p < 0.05$ とした.

図 10. *P. gingivalis* LPS 刺激による THP-1 細胞の MnSOD 遺伝子発現に対して TACE inhibitor が及ぼす影響

THP-1 細胞に TACE inhibitor (0,40 μ mol/l) と *P. gingivalis* LPS (0, 1 μ g/ml) を作用させ, 12 時間培養したのち RNA を抽出し, qPCR 法にて MnSOD 遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 \pm 標準偏差). 平均値の差は分散分析後に Tukey's HSD test を行い, 有意差は $*p < 0.05$ とした.

表・付図

プライマーの名称	プライマーの配列 (5'-3')	参考文献
<i>P. gingivalis</i>	5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3'	Maeda et al., 2003
16S rRNA	5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3'	
MnSOD	5'-AAG GGAGAT GTT ACA GCC CAG ATA-3'	Partridge et al., 2007
	5'-TCC AGA AAA TGC TAT GAT TGA-3'	
TNF- α	5'-TGC TTG TTC CTC AGC CTC TT-3'	Murata et al., 2015
	5'-GGA AGA CCC CTC CCA GAT AG-3'	
β -Actin	5'-CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA-3'	Partridge et al., 2007
	5'-AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA-3'	

表1 qPCRに用いたプライマー

	コントロール群 (n = 78)	2型糖尿病群 (n = 76)	
年齢 (歳)	57.0 ± 19.7	64.8 ± 12.6	
性別 (男/女) (人)	30/48	41/35	
空腹時血糖値 (mg/dl)	97.3 ± 15.3	127 ± 40.7	*
HbA1c (%)	ND	6.07 ± 0.91	
HDLコレステロール (mg/dl)	69.6 ± 17.4	64.3 ± 20.4	*
LDLコレステロール (mg/dl)	113 ± 34.4	111 ± 32.0	
中性脂肪 (mg/dl)	105 ± 64.9	112 ± 74.2	
喫煙 (人)	18	25	
現在歯数 (本)	23.6 ± 5.49	20.4 ± 7.71	*
PPD4 mm以上の歯数の割合 (%)	17.9 ± 23.8	36.2 ± 29.3	*
BoP (%)	18.9 ± 17.9	29.9 ± 23.3	*
歯周炎 (人)	46	67	†

平均 ± 標準偏差

表2 被験者の構成

ND: Not done

*p < 0.05, Mann-Whitney U test, †p < 0.05, Pearsons chi-square test

	非標準化 係数	標準化係数	有意確率	偏相関係数	共線性の統計量
(定数)	0.358		0.044		
<i>P. gingivalis</i> 細菌数	0.058	0.29	0.046	0.29	1.00

従属変数:血清MnSOD

独立変数:年齢, 性別, 現在歯数, BoP, PPD4 mm以上の歯数の割合, *P. gingivalis*細菌数, 喫煙, HbA1c

重回帰式: $0.358 + 0.058 \times P. gingivalis$ 細菌数

表3 2型糖尿病における血清MnSODの重回帰分析

* $p < 0.05$, Multiple regression analysis

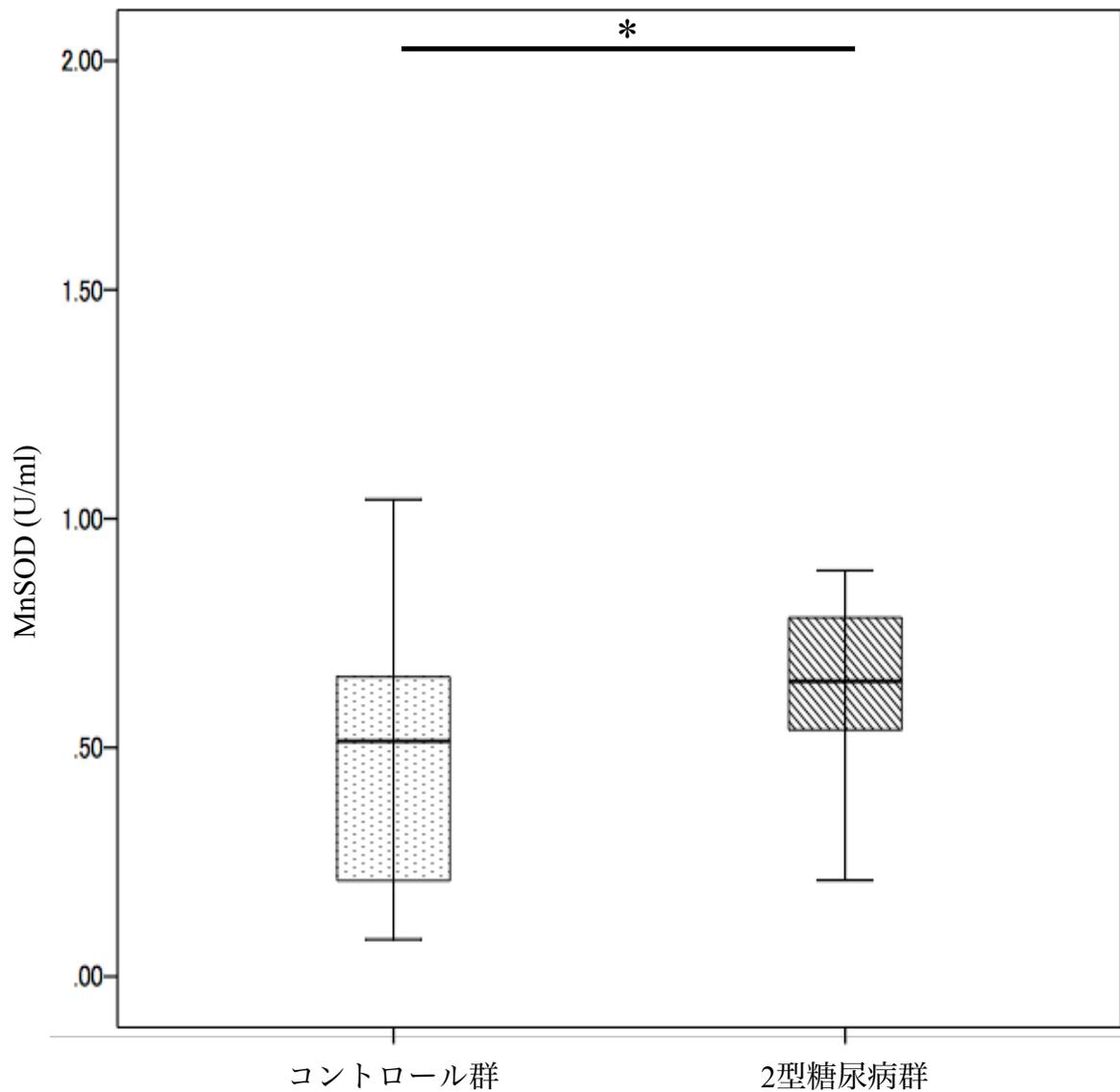


図1 コントロール群と2型糖尿病群の血清MnSOD

平均 ± 標準偏差, *p < 0.05, Mann-Whitney U test

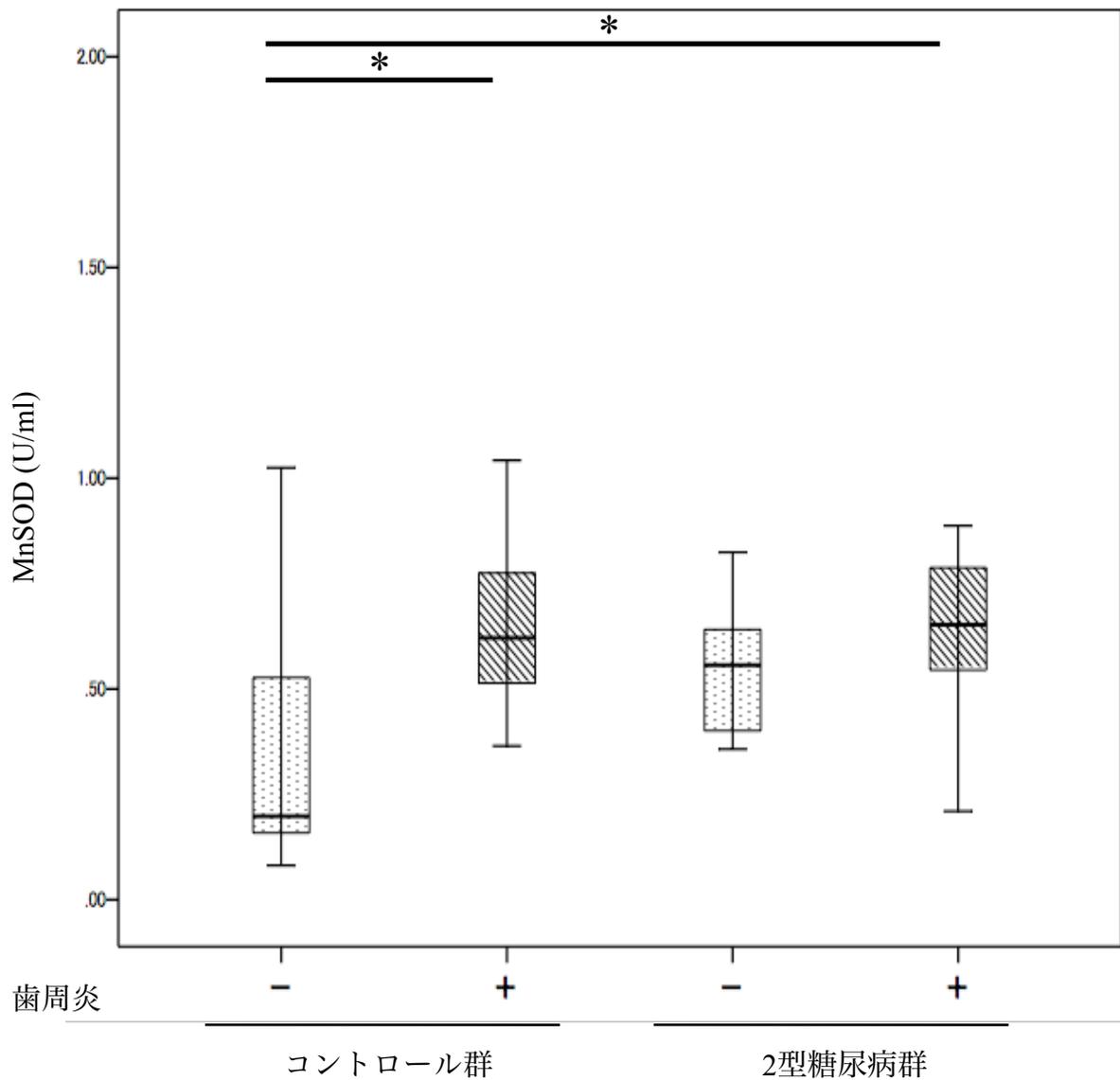


図2 歯周炎を伴う/伴わない2型糖尿病群およびコントロール群における血清MnSOD

平均 ± 標準偏差, *p < 0.05, ANOVA with Tukey's HSD Post Hoc Test

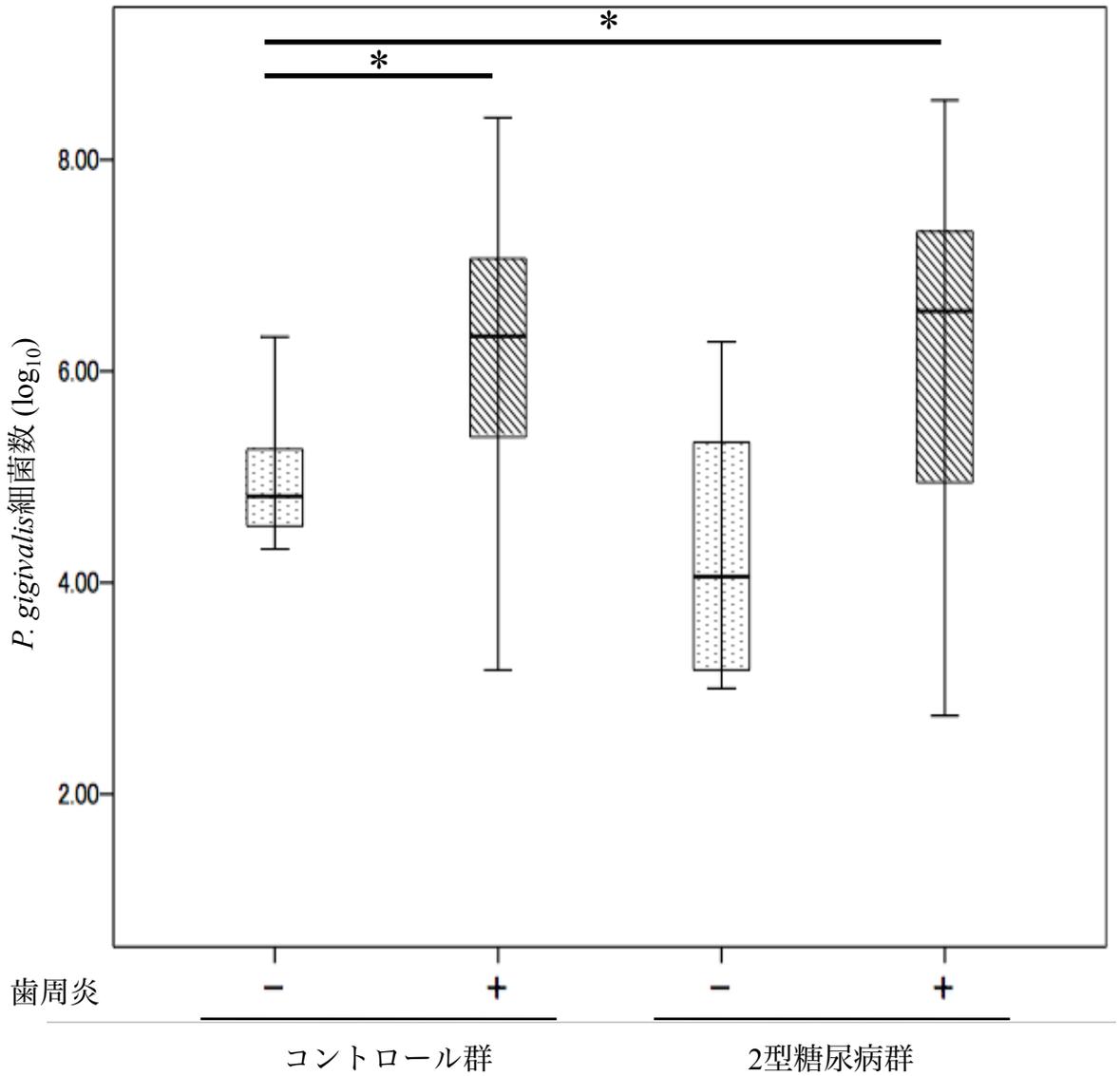


図3 歯周炎を伴う/伴わない2型糖尿病群およびコントロール群における *P. gingivalis*細菌数

平均 ± 標準偏差, *p < 0.05, ANOVA with Tukey's HSD Post Hoc Test

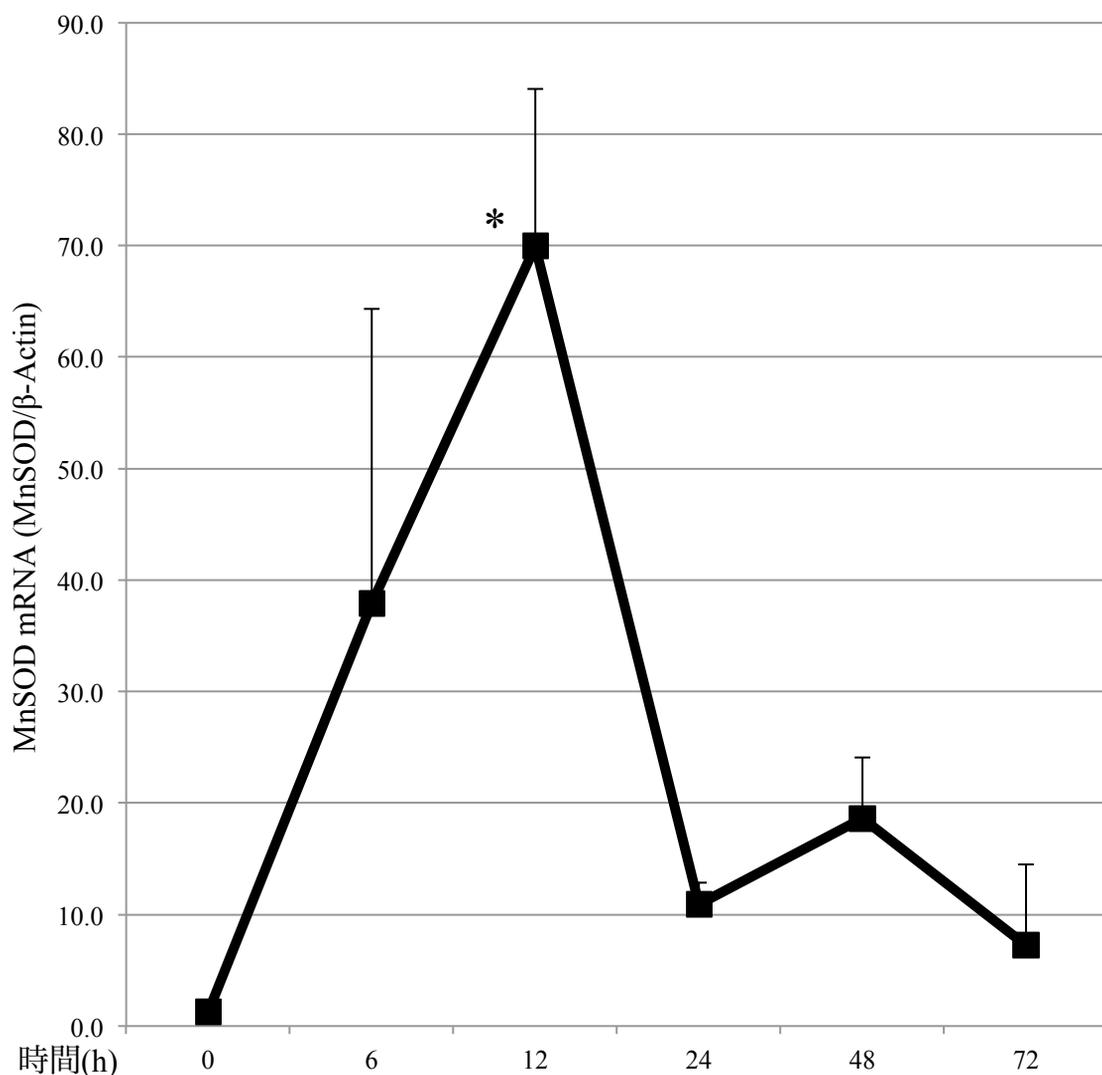


図4 *P. gingivalis* LPS刺激によるTHP-1細胞のMnSOD遺伝子の経時的発現変化

THP-1細胞に*P. gingivalis*由来のLPS (1 $\mu\text{g/ml}$) を作用させ、実験前(0時間), および6, 12, 24, 72時間の各時点でRNAを抽出し, qPCR法にてMnSOD遺伝子発現量を測定した ($n = 6$). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 \pm 標準偏差). 平均値の差は分散分析後にTukey's HSD検定を行い, 有意差は $*p < 0.05$, vs. 0時間とした.

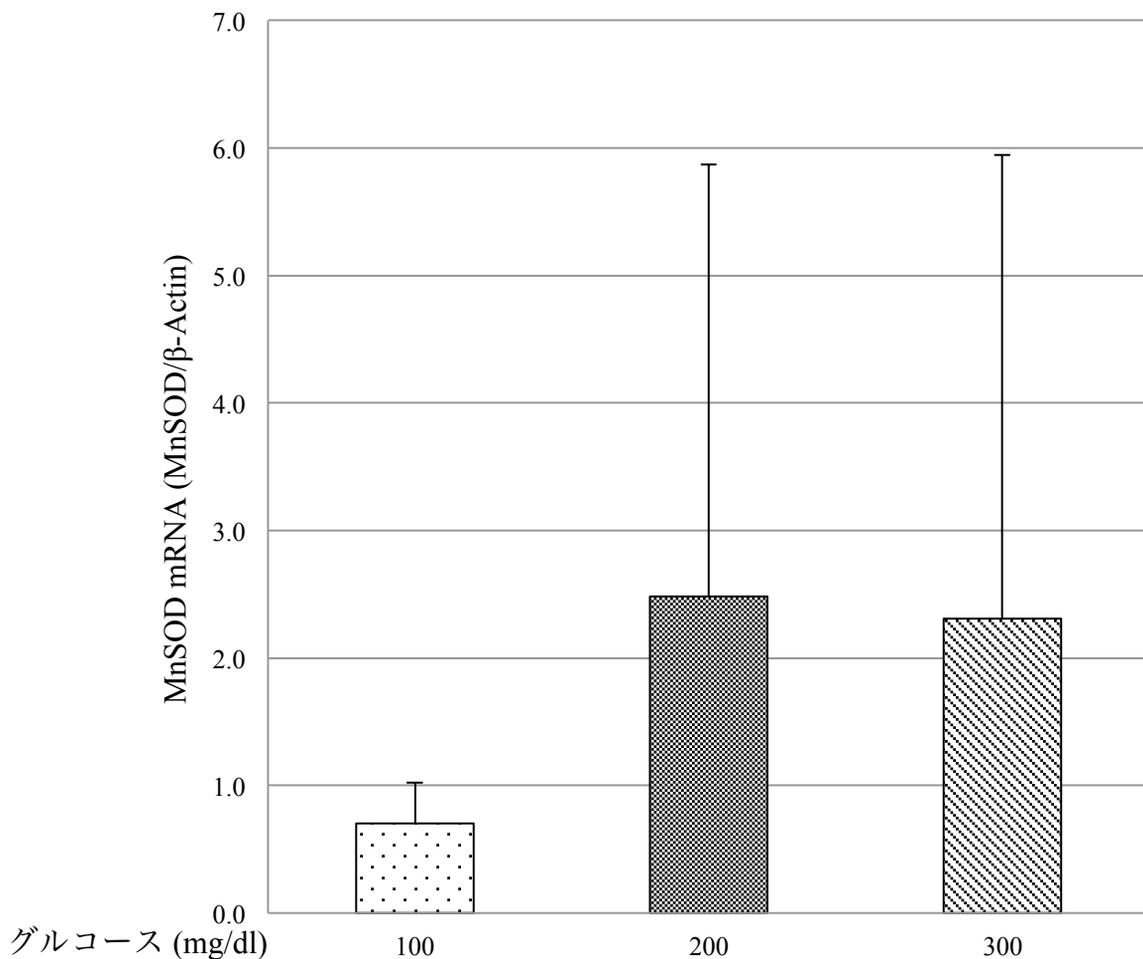


図5 グルコースによるTHP-1細胞のMnSOD遺伝子発現変化

THP-1細胞にグルコース (100, 200, 300 mg/dl) と *P. gingivalis*由来のLPS (0, 1 μg/ml)を作用させ、12時間培養してRNAを抽出し、qPCR法にてMnSOD遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β-actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 ± 標準偏差). 平均値の差は分散分析後にTukey's HSD検定を行い、有意差は *p < 0.05とした.

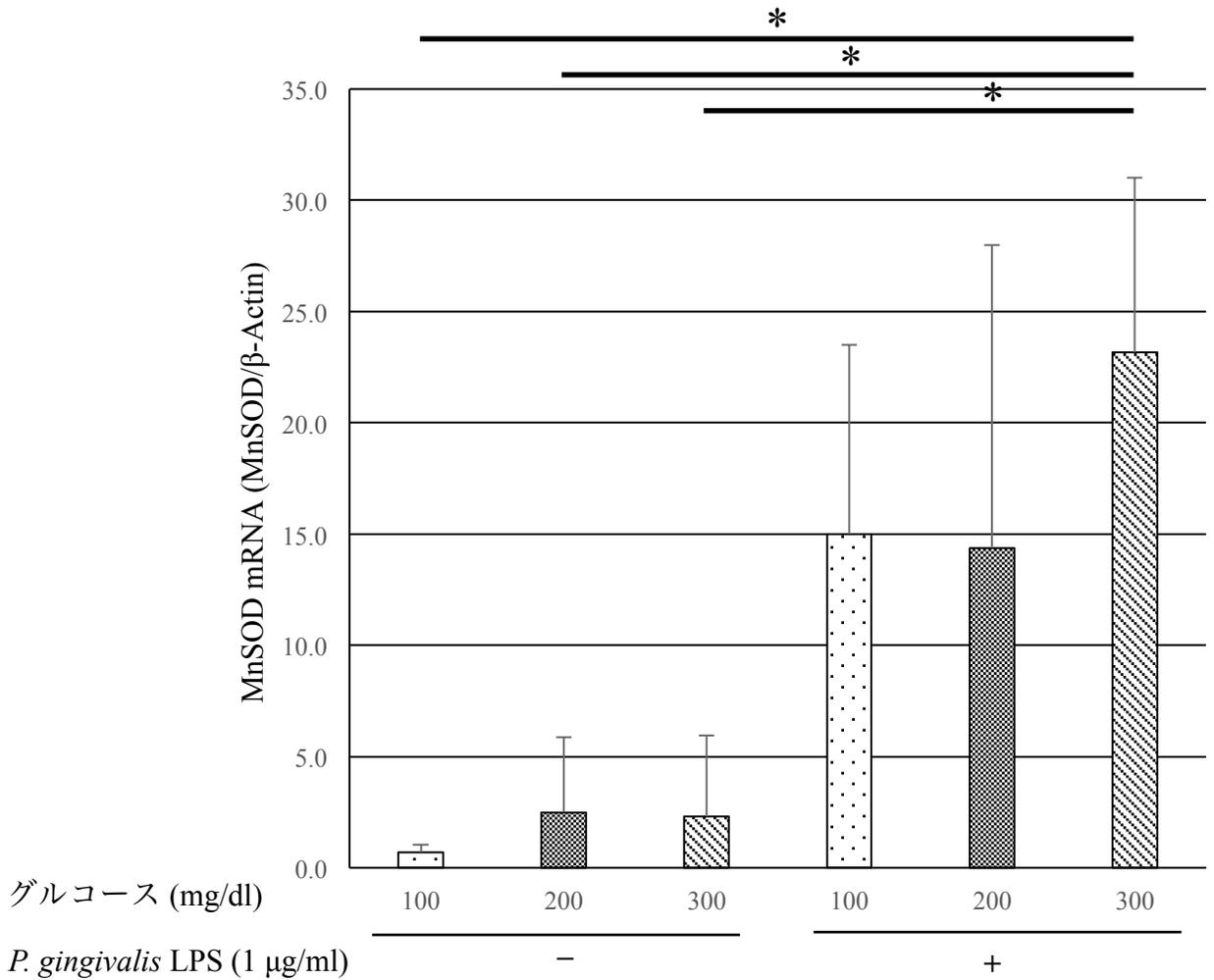


図6 グルコースと*P.gingivalis* LPS刺激によるTHP-1細胞のMnSOD遺伝子発現

THP-1細胞に対して、異なるグルコース濃度 (100, 200, 300 mg/dl) で12時間培養したのちRNAを抽出し、qPCR法にてMnSOD遺伝子発現量を測定した (n = 6) . 結果は内因性コントロール (β-actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 ± 標準偏差) . 平均値の差は分散分析後にTukey's HSD検定を行い、有意差は*p < 0.05とした.

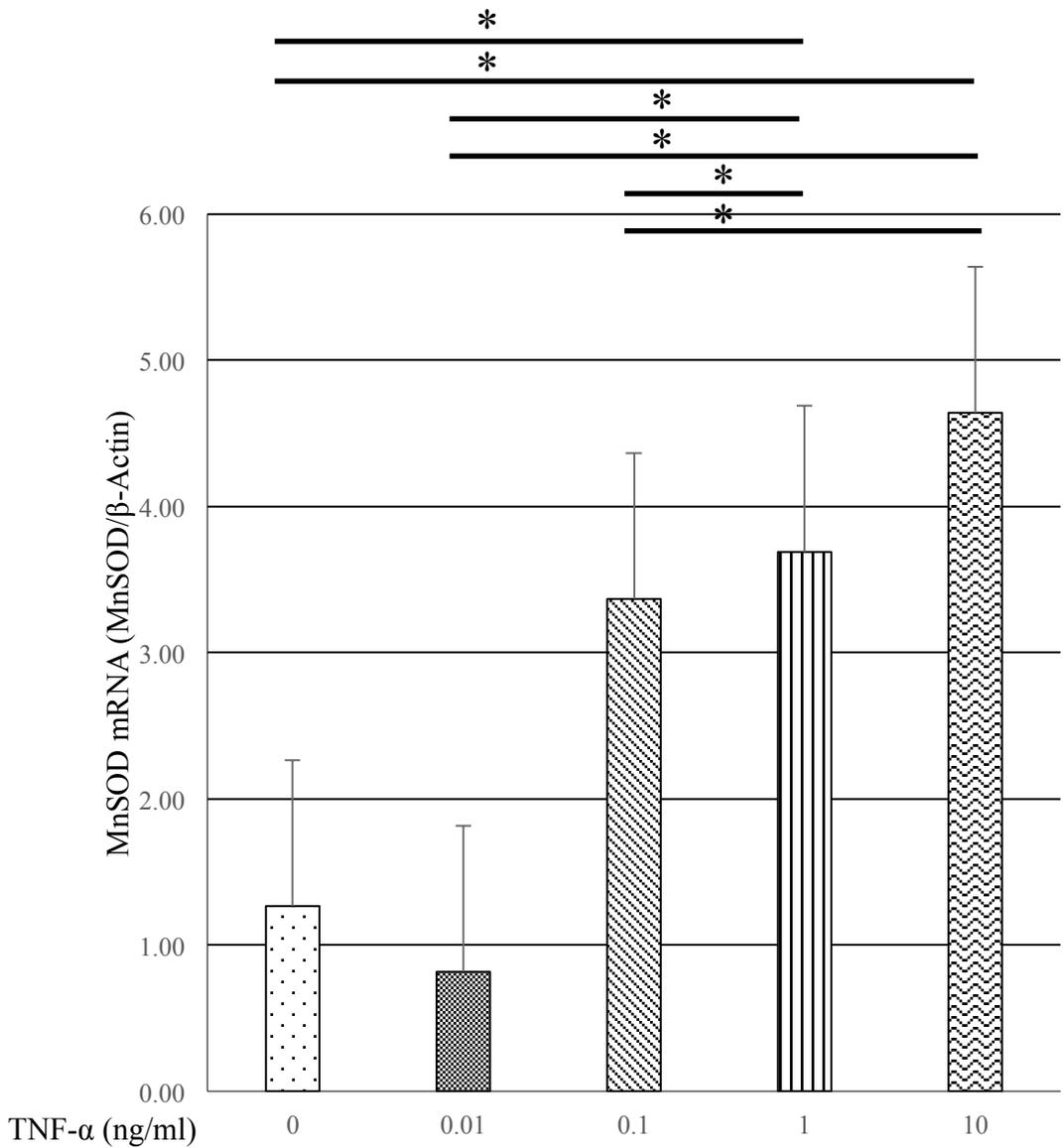


図7 TNF- α 刺激によるTHP-1細胞のMnSOD遺伝子発現変化

THP-1細胞に TNF- α (0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/ml)を作用させ、12時間培養したのち RNAを抽出し、qPCR法にてMnSOD遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 \pm 標準偏差). 平均値の差は分散分析後にTukey's HSD検定を行い、有意差は*p < 0.05とした.

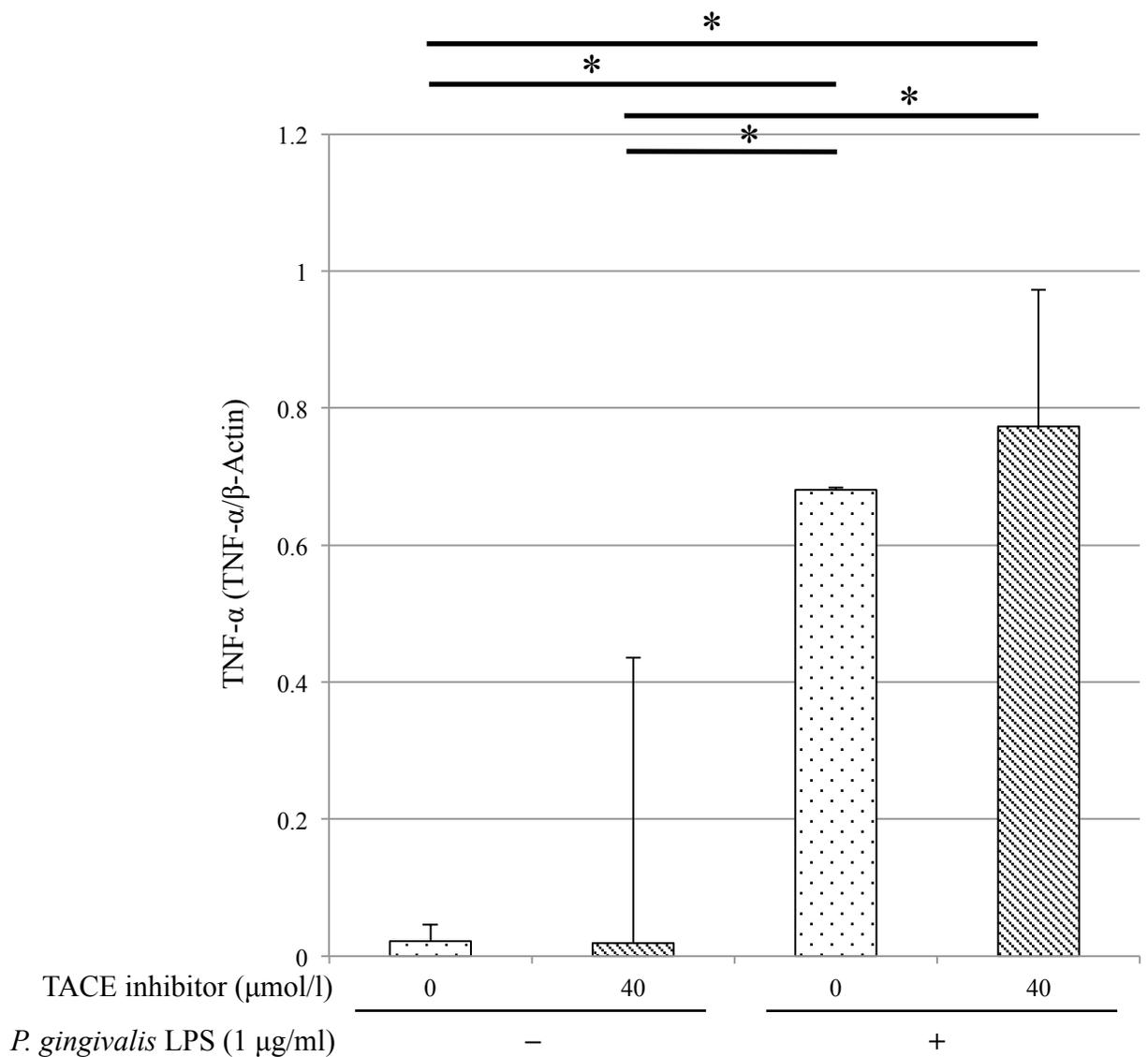


図8 TACE inhibitorと*P. gingivalis* LPS刺激におけるTHP-1細胞のTNF- α 遺伝子発現変化

THP-1細胞にTACE inhibitor (0, 40 $\mu\text{mol/l}$) と*P. gingivalis*由来のLPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$)を作用させ、12時間培養したのちRNAを抽出し、qPCR法にてTNF- α 遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β -actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 \pm 標準偏差). 平均値の差は分散分析後にTukey's HSD検定を行い、有意差は*p < 0.05とした.

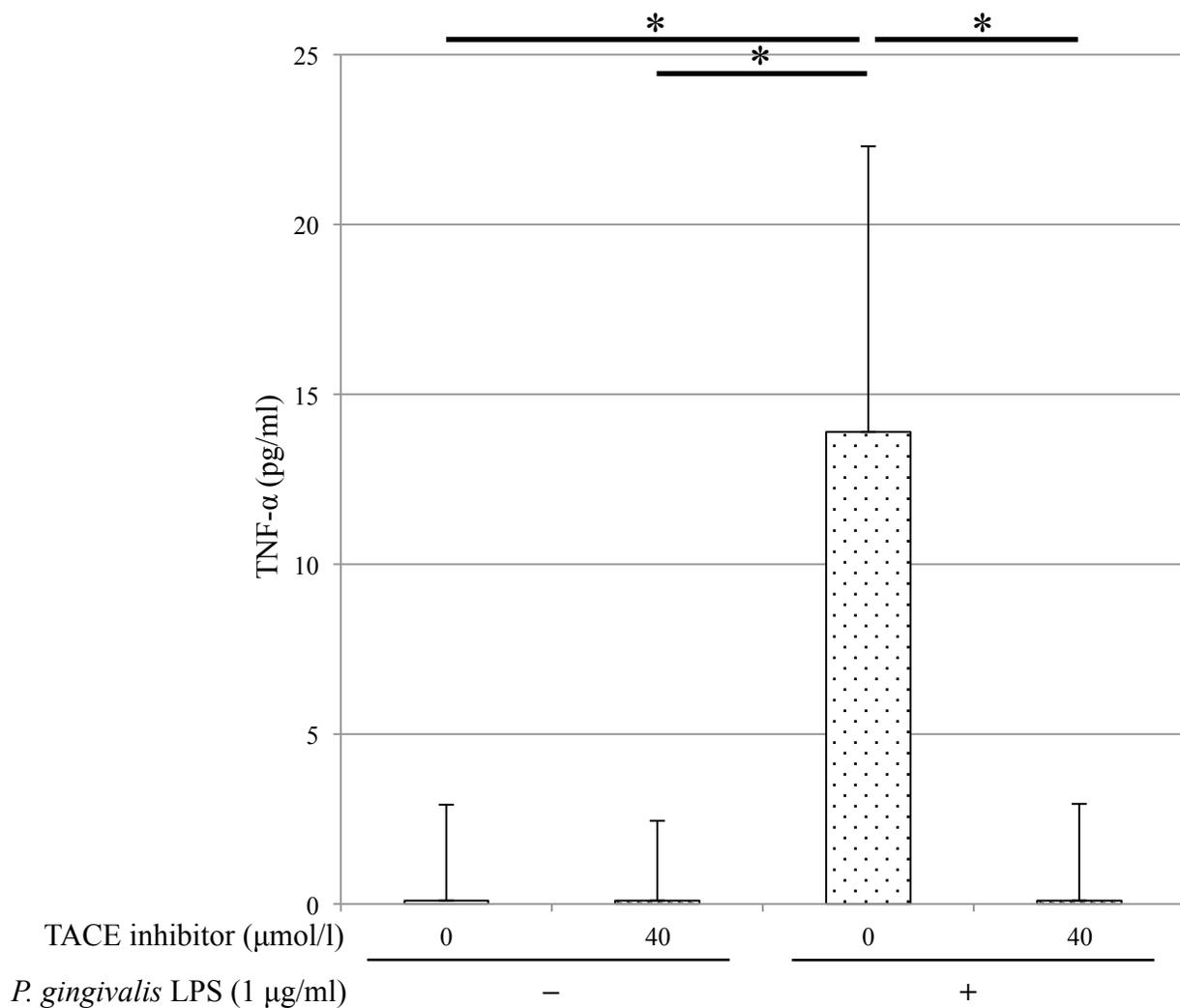


図9 *P. gingivalis* LPS刺激によるTHP-1細胞のTNF- α 産生に対してTACE inhibitorが及ぼす影響

THP-1細胞にTACE inhibitor (0, 40 $\mu\text{mol/l}$) と *P. gingivalis*由来のLPS (0, 1 $\mu\text{g/ml}$)を作用させ、12時間培養し、のち培養上清を回収し、ELISA法にてTNF- α を測定した (n = 6). 結果は平均 \pm 標準偏差で示した. 平均値の差は分散分析後にTukey's HSD検定を行い、有意差は $*p < 0.05$ とした.

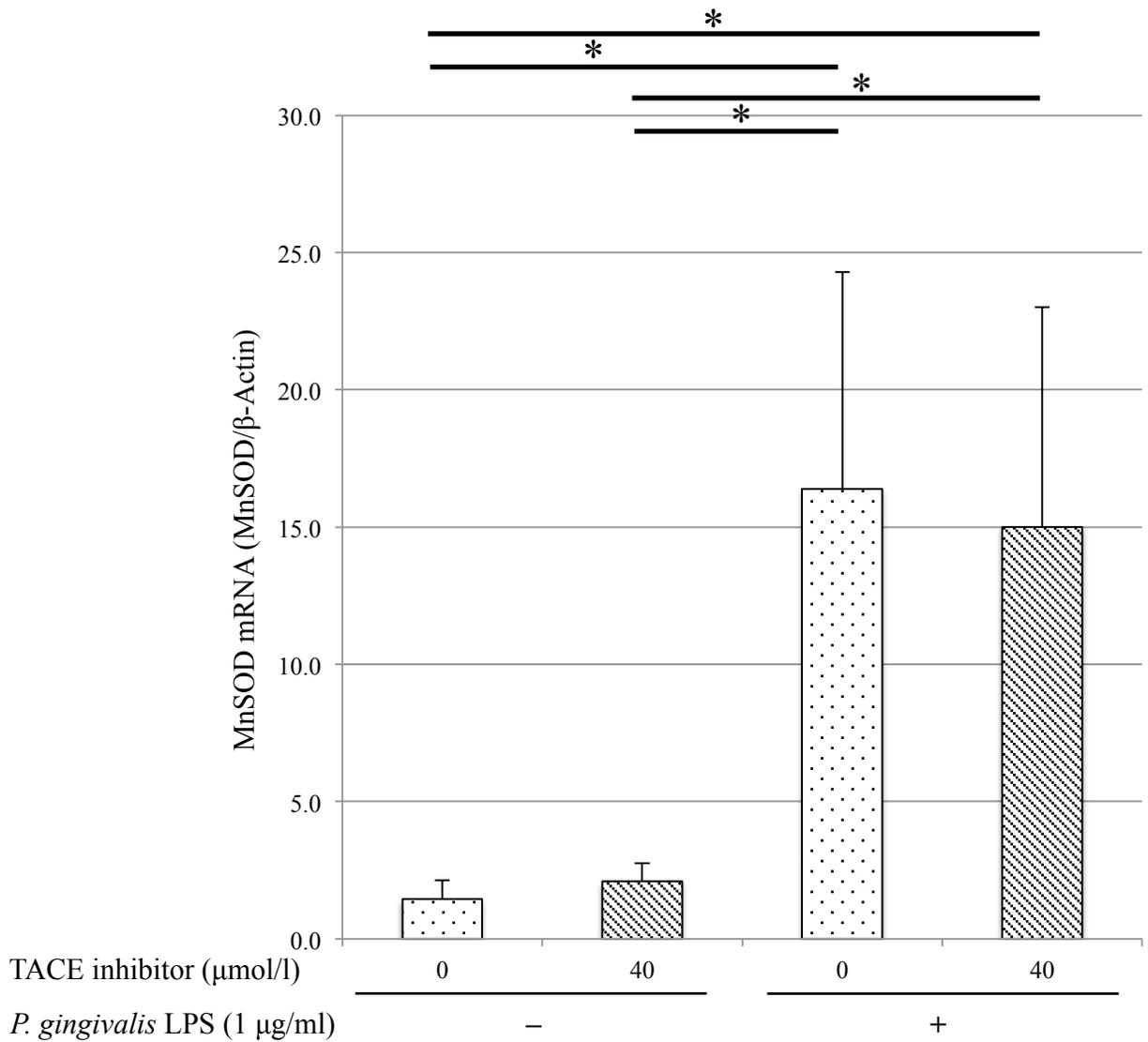


図10 *P. gingivalis* LPS刺激によるTHP-1細胞のMnSOD遺伝子発現に対してTACE inhibitorが及ぼす影響

THP-1細胞にTACE inhibitor (0,40 μmol/l) と *P. gingivalis* LPS (0, 1 μg/ml)を作用させ、12時間培養したのちRNAを抽出し、qPCR法にてMnSOD遺伝子発現量を測定した (n = 6). 結果は内因性コントロール (β-actin) の遺伝子発現量で補正した (平均 ± 標準偏差). 平均値の差は分散分析後にTukey's HSD検定を行い、有意差は*p < 0.05とした.