OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	高血糖状態が歯肉上皮の細胞接着に及ぼす影響
Author(s)	生川, 由貴
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82169
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

高血糖状態が歯肉上皮の細胞接着に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

口腔分子免疫制御学講座　歯周病分子病態学

生川　由貴

（指導教員：村上 伸也 教授）

緒言

歯周病はデンタルプラークの蓄積により歯周組織の破壊が進行する慢性炎症性疾患であり、国民の 8 割が罹患していると報告されている[1]。さらに、喫煙や服薬等による環境因子や様々な全身状態等の宿主因子が歯周病のリスク因子となり、その発症と進行に影響を及ぼしている。とりわけ、歯周病は糖尿病の第 6 番目の合併症として位置づけられており、糖尿病は歯周病増悪の重大なリスク因子として認知されている。糖尿病は代謝異常による慢性疾患であり、その病態として生活習慣や遺伝などにより膵臓からのインスリン分泌の低下や、肥満などが原因でインスリンの働きが低下するインスリン抵抗性によって、血糖コントロールが不良になり慢性的な高血糖状態が引き起こされ、種々の臨床症状を呈すると考えられている[2]。糖尿病と歯周病の関係については、ピマインディアンを対象とした疫学研究以来、多くの臨床研究報告がなされており、糖尿病は歯周病のリスクを約 3 倍増加させること、高血糖になることで歯周病の発生率の上昇や歯槽骨欠損が進行することなどが報告されている[3]。さらに、高血糖が歯周組織破壊を起こすメカニズムとしては、他の糖尿病合併症の機序と同様に、高血糖が免疫担当細胞の機能低下やコラーゲンの代謝障害などを引き起こすことで、微小血管障害や創傷治癒障害、免疫機能障害が惹起され、組織の破壊につながると報告がなされている[4]。また、慢性的な高血糖の状態では、一般的な酵素による可逆的なタンパクのリン酸化やアセチル化とは異なり、糖によるタンパクの非酵素的で不可逆的な縮合反応である Maillard 反応が引き起こされることで、糖化タンパクである AGEs (Advanced Glycation End Products：終末糖化産物) として組織内や循環血液中に蓄積する。AGEs は老化を促進する原因物質として注目され、血管に蓄積すると心筋梗塞や脳梗塞、骨に蓄積すると骨粗鬆症、目に蓄積すると網膜症の一因となるなど、全身の健康に影響を及ぼす事が報告されている[5–7]。

一方で、歯周病の病態は歯周ポケット内に蓄積したデンタルプラークに対する宿主応答の結果として形成される。いわゆる歯周病菌と生体が直接対峙する部位は歯肉上皮である。歯周組織における歯肉上皮の役割としては、①細菌等の外来異物の刺激に対してサイトカイン・ケモカインを産生することで、歯周組織の免疫反応や炎症反応に寄与する、というものと②歯周病菌の侵襲に対して物理的なバリアーとなる、という 2 つが挙げられる。1 つ目に挙げた上皮の生体応答に対する高血糖の影響に関しては、当研究室において既に研究が進められており、*in vitro* の実験系にてヒト歯肉上皮細胞を高血糖状態で培養することによ

り、組織への好中球の遊走を促す IL-8 の産生が亢進し、代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) を認識する細胞表面レセプターである Toll like receptor (TLR) 2 発現が上昇することにより、免疫応答に異常をきたすと報告している [8]。一方、2 つ目に挙げた歯肉上皮の物理的なバリア機能は、他の組織の上皮組織と同様に、上皮細胞間の接着分子により維持されている。その主な構成は、Claudin、Occludin、ZO-1 などで構成される Tight Junction と、E-cadherin により構成される Adherens Junction が知られている。近年、興味深いことに、高血糖状態が腸管上皮等の物理的バリアに負の影響を及ぼし得るとの報告がなされているが [9]、歯肉上皮のバリア機能に対する高血糖の影響については、未だ研究報告がなされていない。

インスリンは体内で唯一血糖を直接的に下げる作用のあるホルモンである。全身の各種組織と糖の取り込みの関係において、筋肉や脂肪組織では、インスリン依存性の糖輸送担体である GLUT4 が主として糖の取り込みを担っており、取り込みが進むことで、血糖の降下作用に関与している。糖尿病が進行したインスリン抵抗性を示す病態の場合、抵抗性自体が同上組織細胞への糖の取り込み不良とその細胞の機能不全つながるとともに、糖の消費先である同上組織の糖の取り込み不足により、全身の高血糖へとつながる。これに対し、いわゆる糖尿病合併症を引き起こす組織である、腎臓や神経などの細胞では、インスリン非依存性の糖輸送担体である GLUT1、2、3 を主に発現しており、細胞内への糖の流入は周囲の糖濃度に依存している。つまり、高血糖の状態が細胞内の糖代謝異常を誘導し、様々な糖尿病合併症を引き起こすと考えられている [10]。また、一般的に細胞に取り込まれた糖は解糖系からクエン酸回路に入り、ATP の産生に利用されるが、高血糖に伴い取り込まれる糖の量が増えると、解糖系経路だけでは処理しきれなくなり、解糖系の迂回経路であるポリオール代謝の亢進 [11] や AGEs の組織内での蓄積 [5-7]、プロテインキナーゼ C (PKC) シグナルの異常な活性化 [12]、細胞内に取り込まれた酸素 (O_2) の代謝過程で、スーパーオキサイド (O_2^-)、ヒドロキシラジカル (OH) のようなフリーラジカルや過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素 (Reactive Oxygen Species : ROS) が異常に産生される酸化ストレスの亢進 [13] などが報告されている。しかしながら、これらの病態生理学的機序が歯肉上皮のバリア機能に影響を及ぼし得るのか否かについては明らかにされていない。

そこで本研究では、糖尿病による歯周炎増悪のメカニズムの一端を明らかにすることを目的として、歯肉上皮組織のバリア機能に対する高血糖の影響に着目し、検討することとした。

材料および方法

1. マウス

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した（承認番号：動歯-27-022-0）。12 週齢の糖尿病マウスである+*Lepr*^{db}/+*Lepr*^{db}マウス（db/db マウス）と control マウスである C57BL/6 マウスを用いた。db/db マウスは肥満・過食・高インスリン血症など顕著な糖尿病症状を自然発症する突然変異のマウスであり、生後 4−5 週齢頃より肥満が始まり、体重の増加に伴い血糖値は上昇し、尿糖陽性率は生後 10 週齢を過ぎる頃には、ほぼ 100%に到達する糖尿病モデルマウスである。それぞれのマウスの尾静脈より血液を採取し、グルコース分析装置であるグルテストミント（三和化学研究所、愛知、日本）にて血糖値を測定した。また、歯槽骨吸収量の定量解析については、control マウスおよび db/db マウスの上顎を採取し、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2（リガク、東京、日本）により断層撮影を行った。得られた 3 次元画像は、3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON（ラトックシステムエンシジニアリング、東京、日本）により 2 次元化し、画像解析ソフトウェア WinROOF（三谷商事、福井、日本）を用いて 2 次元化した画像におけるセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定し、第 1 臼歯（M1）遠心根、第 2 臼歯（M2）近心および遠心根、第 3 臼歯（M3）近心および遠心根における測定値の合計を同上マウスの歯槽骨吸収量とした。さらに、CO_2 ガスにて安楽死させ、灌流脱血後、上顎 M1 近心から M3 遠心まで 3.0 mm×1.5 mm の歯肉組織片を切開剥離し、採取した。採取した組織を T-PER (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) と直径 5 mm のジルコニアビーズ（ニッカトー、大阪、日本）を用いて 60 秒振盪後、遠心（1000 rpm、常温、10 分）し、上清を回収することで組織よりタンパク抽出を行い Western Blot 法にて解析した。また、ジルコニアビーズを用いて組織をホモジナイズし、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN、Hilden、Germany）にて全 RNA を抽出した後、RNA 解析を行った。

2. 細胞培養

本研究の主旨を理解し実験に参加することを同意した歯周炎患者より、歯周外科時に歯肉組織片を採取し、Oda らの方法に準じて上皮細胞層を剥離した[14]。その上皮層を細切後、表皮角化細胞増殖用培地（倉敷紡績株式会社、大阪、日本）(Humedia-KG2®) を用いて培養し、増殖した細胞をヒト歯肉上皮細胞（HGEC）とした。HGEC は継代数 4、5 代までしか培養できないため、2 代継代培養した

ものに、国立感染症研究所遺伝子資源室より恵与された Simian Virus 40 T 抗原（SV40T）を組み込んだプラスミドベクター（μMT10D）を用い、リン酸カルシウム法にて遺伝子導入した。得られた細胞を Humedia-KG2®を用いて培養を続け、長期継代可能なヒト歯肉上皮細胞株（epi 4）として実験に供した[15]。また、他の二種の歯肉上皮細胞の細胞株も実験に供した。一方は、歯肉上皮組織を採取した患者は異なるが、epi 4 と同様の方法で採取、不死化した細胞株（OBA-9）である[16]。他方は、上記らとは異なる患者より採取した歯肉組織より単離し、SV40T 抗原を Tfx™-20（Promega、Madison、WI、USA）試薬を用いて遺伝子導入し、不死化した細胞株（Tfx）である。

3. 歯肉上皮細胞の刺激

セルカルチャーディッシュにて Humedia-KG2®培地（5.5 mM D-glucose）(NG) を用いてサブコンフルエントになるように歯肉上皮細胞を培養した。刺激条件として、30 mM D-glucose（分子量:180.16、和光純薬工業、大阪、日本）(HG)、30 mM D-Mannitol（分子量:182.17、和光純薬工業）(Man) を Humedia-KG2® 培地に添加し、細胞を培養した。

4. デキストラン透過性の検討

蛍光色素である Fluorescein isothiocyanate（FITC）にて標識したデキストラン（SIGMA-ALDRICH Inc.、St. Louis、MO、USA）(FITC-dextran) は細胞間隙を透過することが知られている。そこで、多孔性メンブレンである Transwell® Permeable Supports（12mm Insert、0.4 μm pore size ; Corning Inc.、Corning、NY、USA）のメンブレン上に epi 4 を播種し、NG もしくは HG にて 14 日間培養を行った。14 日目にインサート内へ FITC-dextran（分子量:40,000）を 5 mg/mL の濃度で添加し、インサート外には FITC-dextran 非添加のメディウムを添加した状態で CO_2 インキュベーター内にて 2 時間静置し（図 1）、インサート外へと透過したデキストランの濃度を蛍光高度計である FLUOROSKAN ASCENT (Thermo Fisher Scientific)（励起波長 485 nm、蛍光波長 538 nm）にて測定した。

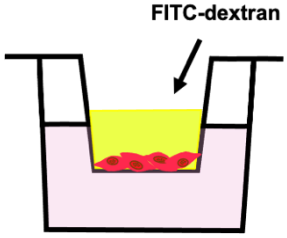


図 1. デキストラン透過実験模式図

5. 全 RNA の抽出および相補鎖 DNA（cDNA）の作製

12 穴用培養プレート（Corning Inc.）にてサブコンフルエントになるように培養した epi 4 を NG もしくは HG の条件で 14 日間培養を行った。また、全 RNA の分離は Pure Link® RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。精製した全 RNA を鋳型として、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行い、1 本鎖 cDNA を作製した。

6. Real time PCR 解析

Real time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として、表 1 に示す各遺伝子特異的な Real time PCR 用プライマーを用いて行った。FastSYBR® Green PCR Master Mix（Applied Biosystems、Foster City、CA、USA）を用いて、StepOnePlus™ Real-time PCR System（Applied Biosystems）にて PCR 反応を行った。次いで、ΔΔCt 法にて各遺伝子の発現量の定量化を行った。各 mRNA 発現は、ハウスキーピング遺伝子の 1 つである *hypoxanthine phosphoribosyltransferase1*（*HPRT1*）を内在性コントロール遺伝子として算出し、定量化した。また、細胞同士の接着に関連する分子や、細胞と細胞外基質との接着に関連する分子について 84 種類がパネル化された PCR アレイである RT² Profiler PCR Primer Array (Human Cell Junction PathwayFinder) を用いて、同上分子群について準網羅的に解析した。PCR アレイの分子群の詳細については表 2 に示す。

	Terget		Primer sequence
Mouse	*Claudin1*	F	5'-GAATTCTATGACCCCTTGACCC-3'
		R	5'-TGGTGTTGGGTAAGAGGTTG-3'
	Occludin	F	5'-ACTATGCGGAAAGAGTTGACAG-3'
		R	5'-GTCATCCACACTCAAGGTCAG-3'
	Zo-1	F	5'-AGCGAATGTCTAAACCTGGG-3'
		R	5'-TCCAACTTGAGCATACACAGG-3'
	Tricellulin	F	5'-TGAGGAAGTTTGACGAGCTG-3'
		R	5'-TCCAGAAACGAAGGGTCATTC-3'
	E-cadherin	F	5'-AGAGAAGCCATTGCCAAGTAC-3'
		R	5'-AACGAATCCCTCAAAGACCG-3'
	Hprt	F	5'-TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA-3'
		R	5'-AGGCAGATGGCCACAGGACTA-3'
Human	*CLAUDIN1*	F	5'-CAGCTGGCTGAGACACTGAAGA-3'
		R	5'-AAGGCACTGAACCACATGAAGGTA-3'
	OCCLUDIN	F	5'-AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATAC-3'
		R	5'-ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG-3'
	ZO-1	F	5'-CGAGGCATCATCCCTAATAAGAACA-3'
		R	5'-GGAGCTGCGAAGACCTCTGAA-3'
	TRICELLULIN	F	5'-ATGAGCCATCATTGTCATCGAA-3'
		R	5'-GTCGGGCATCACGATAGGTTTA-3'
	E-CADHERIN	F	5'-CGCCGAGAGCTACACGTTCA-3'
		R	5'-TGTCGACCGGTGCAATCTTC-3'
	RAGE	F	5'-GCTGTCAGCATCAGCATCATC-3'
		R	5'-GGGCTATCTTCTGCTTCCCTGAC-3'
	HPRT	F	5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3'
		R	5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'

表 1. 本研究で使用した Real time PCR 用プライマーの一覧

7. タンパク質の抽出

培養細胞に cOmplete, Mini™ (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA) と Pierce™ RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え、−80°C で冷凍した後、CELL LIFTER (Corning Inc.) を用いて回収し、遠心 (10000rpm、4°C、10 分) 後、全細胞画分を含む上清を回収した。

8. Western Blot 法による解析

得られた全細胞画分に対して、2-メルカプトエタノール (和光純薬工業、大阪、日本) 含有 Laemmli[17] の 2x サンプルバッファーを用いてタンパク濃度が同値となるようサンプルを調整し、熱処理 (95°C、5 分) した。Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (BioRad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用いて電気泳動を行った。その後、Trans-Blot Turbo Transfer

Pack（BioRad Laboratories）と Trans-Blot Turbo Transfer System（BioRad Laboratories）を用いて、転写を行った。Blocking Buffer（ナカライテスク、京都、日本）にてメンブレンのブロッキングを行った（室温、30 分）。1 次抗体にはウサギ抗マウス Claudin1 抗体（1:2500；51-9000、Thermo Fisher Scientific）、ウサギ抗マウス Occludin 抗体（1:5000；91131、Cell Signaling、Danvers、MA、USA）、ウサギ抗マウス E-cadherin 抗体（1:500；3195、Cell Signaling）、ウサギ抗マウス Tricellulin 抗体（1:1000；48-8400、Thermo Fisher Scientific）、マウス抗マウスβ-actin 抗体（1:10000；A5416、SIGMA-ALDRICH Inc.）を用いた（室温にて 1−2 時間または 4°C にて 12 時間）。2 次抗体に Horseradish peroxidase（HRP）標識ヤギ抗-ウサギ IgG 抗体（1:10000；NA934、GE Healthcare、Chicago、IL、USA）あるいは HRP 標識ヒツジ抗-マウス IgG 抗体（1:10000；NA931、GE Healthcare）を用いた（室温、30 分）。1 次抗体、2 次抗体はそれぞれシグナル増強剤 HIKARI（ナカライテスク、京都、日本）にて希釈して使用した。次いで、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate（Thermo Fisher Scientific）を反応（室温、5 分）させた後、ImageQuant LAS 4000（GE Healthcare）にて化学発光させたシグナルを検出した。また、画像処理インテグレーションソフトウエア WinROOF（三谷商事株式会社、福井、日本）を用いて画像解析を行った。それぞれの標的とする抗体の発現量をβ-actin の発現量にて除し、対照群の平均値を 1 としたときの相対値として各分子の発現量をグラフ化した。

9. epi 4 における細胞免疫染色法による Claudin1、E-cadherin 発現の検出

ガラスボトムディッシュ（松浪硝子工、大阪、日本）にてサブコンフルエントになるように培養した epi 4 に対して、NG あるいは HG で 14 日間培養を行った。培養終了後、epi 4 を PBS にて洗浄し、3% Formaldehyde（室温、10 分）にて固定した。その後、非特異的染色を防ぐため 1% Bovine Serum Albumin（SIGMA-ALDRICH Inc.）含有 PBS にてブロッキング操作を行なった（室温、60 分）。ブロッキング後、1 次抗体にはウサギ抗マウス Claudin1 抗体（1:250；51-9000、Thermo Fisher Scientific）、ウサギ抗マウス E-cadherin 抗体（1:200；3195、Cell Signaling）を用いた（室温、60 分）。PBS で洗浄後、2 次抗体として、Alexa Fluor 488 標識ヒツジ抗-ウサギ IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific）を用いた（室温、30 分）。さらに PBS にて洗浄し、その後 DAPI（SIGMA-ALDRICH Inc.）を含む PBS 溶液にて核染色を行い（室温、5 分）、共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8（Leica Microsystems、Wetzlar、Germany）を用いて画像を取得した。

10. 歯肉上皮細胞の立体培養

立体培養にて歯肉上皮細胞の立体培養を行った。具体的には、epi 4 を Transwell® (Corning Inc.) のインサート内のメンブレン上に 0.5 mL の細胞培養液と共に播種した。37°C および 5%CO_2 で 2 日間培養した後、ウェルおよび細胞培養インサート内からすべての培地を吸引し、下部ウェルのインサート外に 1.5 mL の培地を加えることにより、気相−液相界面を確立し、30 日間培養を行った。

11. 立体培養した細胞の HE 染色

立体培養 30 日目に、インサート内およびインサート外へ 4% Paraformaldehyde を添加し浸漬固定した（4°C、12 時間）。固定後洗浄し、メスにてメンブレンを切り出し、メンブレンごと細胞を包埋用カセットに入れ、包埋を行った。LEICA RM2245 (Leica) を用いて厚さ 4.0 μm の薄切切片を作製し、マイヤー・ヘマトキシリン（武藤化学、東京、日本）および 1%エオシン Y 液（和光純薬工業）を用いて、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色を行った。その後、光学顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon、東京、日本）にて観察および写真撮影を行った。

12. 立体培養した細胞の透過型電子顕微鏡を用いた観察

立体培養した epi 4 を培養 30 日目にメンブレンごと回収し、2%パラホルムアルデヒドと 2.5%グルタルアルデヒドにて固定処理を行い、アルコール脱水後エポキシ樹脂（Quetol812：日新 EM、東京、日本）にて包埋を行った。ミクロトーム（UltrotomeV：LKB Instruments Inc.、Stockholm、Sweden）およびダイヤモンドナイフ（ナノトームシック：酒井電子顕微鏡応用研究所、岡崎、愛知）にて約 2.0 μm の切片を薄切し、トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察した。ブロックのトリミングを行った後、70 nm の超薄切片を作製し、EM ステイナー（日新 EM、東京、日本）および 0.4%クエン酸鉛により電子染色を行った。その後、加速電圧 200 kV にて透過型電子顕微鏡（H800：株式会社日立製作所、東京、日本 ）により観察を行った。

13. 細胞生存能の検討

epi 4 を NG もしくは HG にて 14 日間培養後、CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Promega) の試薬を添加し、10 分後に生細胞の ATP 量を発光強度にて測定した。測定には GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega) を使用した。

14. 浸透圧の影響の検討

高血糖状態で細胞を培養すると、浸透圧の影響があることが知られている。そこで、今回の実験系においても細胞間接着分子の発現低下に対する浸透圧の及ぼす影響について検討を行った。NG もしくは HG、浸透圧のコントロールとして Man (5.5 mM D-glucose + 24.5 mM D-Mannitol) を用いて epi 4 を 14 日間培養した。通法に従いタンパクの抽出を行い、Western Blot 法にて検討した。

15. 高血糖刺激を中止した場合の細胞間接着分子の発現変化についての検討

高血糖状態が細胞間接着分子の発現に及ぼす影響を検討するため、高血糖刺激を中止し、正常血糖での細胞間接着分子の発現変化を以下の 4 条件にて検討した（図 2）。

条件

1. NG：NG にて 3 週間培養した。
2. HG：HG にて 3 週間培養した。
3. HG (1W) → NG (2W)：1 週間 HG (30 mM D-glucose) で培養後、高血糖刺激を中止し 2 週間 NG (5.5 mM D-glucose) で培養した。
4. HG (2W) → NG (1W)：2 週間 HG (30 mM D-glucose) で培養後、高血糖刺激を中止し 1 週間 NG (5.5 mM D-glucose) で培養した。

培養終了後、通法に従い全細胞画分のタンパクを抽出し精製後、Western Blot 法にて Claudin1 のタンパク発現の検討を行った。

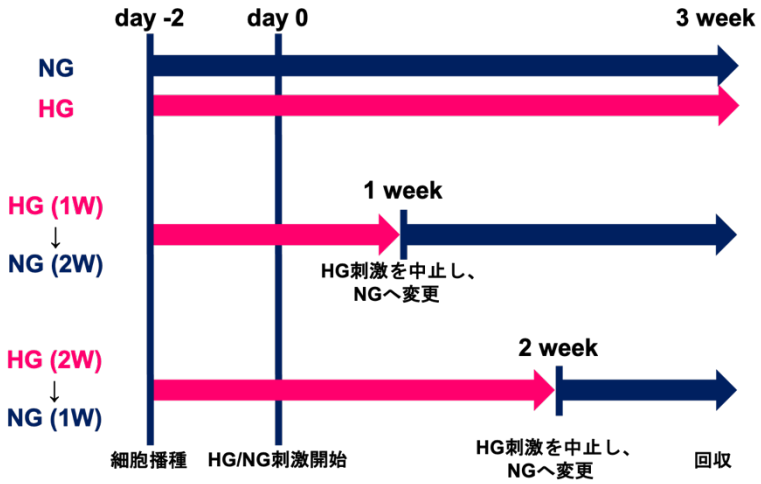


図 2. 高血糖刺激のタイムコース

16. 高血糖が歯肉上皮細胞における AGEs シグナルに及ぼす影響の検討

epi 4 を NG および HG にて 14 日間培養後 RNA を回収し、AGEs を特異的に認識する細胞表面レセプターの一種である receptor of advanced glycation end products (RAGE) の mRNA 発現について Real time PCR 法にて検討した。さらに、D-glucose の代わりに RAGE に作用する AGEs の一種である Carboxymethyl Lysine (CML) を 1 ng/mL の濃度で培養液中に添加し、14 日間刺激を行った後、通法に従い全 RNA の抽出および cDNA の作製を行い、Claudin1 の mRNA 発現について Real time PCR 法にて検討した。

17. 高血糖状態の歯肉上皮細胞における酸化ストレスの影響についての検討

epi 4 を NG および HG にて 14 日間培養後、OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs, Inc.、San Diego、CA、USA) を使用し、酸化ストレスの関与について検討を行った。測定には FLUOROSKAN ASCENT (Thermo Fisher Scientific) (励起波長 480 nm、蛍光波長 530 nm) を用い、活性酸素種である ROS の量を蛍光強度にて検出した。

18. 高血糖に対する抗酸化剤を用いた阻害効果の検討

抗酸化剤である 1 mM N-acetyl-cysteine (SIGMA-ALDRICH Inc.) (NAC) を添加し、NG のみ、HG のみ、NG と NAC、HG と NAC の 4 条件にて epi 4 を 14 日間培養した。14 日後、通法に従い全 RNA の抽出および cDNA の作製を行い、Real time PCR 法にて Claudin1 の mRNA 発現検討を行った。

19. 統計処理

実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定については、2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は二元配置分散分析 (two way ANOVA) を行ったあと、post-hoc として Tukey 検定を行い、$p < 0.05$ を有意差があるものとした。

結果

1. マウス歯肉組織における高血糖の影響

糖尿病に罹患し、高血糖の状態が長期的に持続すると、全身の様々な臓器に合併症を起こすことが知られている。そこで歯肉上皮組織においてもその影響が及ぶと仮説を立て、高血糖のモデル動物である db/db マウスの歯周組織を解析した。db/db マウスは 10−11 週齢で高血糖の病態が完成するとされている [18]。そこで、本研究では 12 週齢の db/db マウスとその対照群としての野生型マウスについて検討した。まず、それぞれのマウスについてその生理的な表現型を確認するために、尾静脈より血液を採取し、血糖値を測定し、体重を計測した。その結果、7 週齢および 12 週齢の control マウスと比較し、db/db マウスにおいて有意な血糖値と体重の上昇を確認した（図 3. a、b）。また、長期間高血糖状態に暴露した歯周組織に変化が認められるか否かを検討するために、12 週齢にて屠殺した同上マウスの上顎骨をμCT にて撮影し、上顎歯槽骨の吸収状態を比較した。マウス臼歯 M1−M3 のセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離を画像上にて 5 箇所計測し、合計したものを歯槽骨の吸収量として用いて検討した結果、control マウスと比較し、db/db マウスにおいて、有意な歯槽骨の吸収が認められた（図 3. c、d）。このことより、高血糖マウスにおいて歯槽骨の吸収が進行することが示唆された。

次に、同上マウスの歯肉上皮に着目し、細胞間接着分子の発現に影響があるか、Real time PCR 法と Western Blot 法にて検討した。その結果、Claudin1、ZO-1、Tricellulin の mRNA 発現の有意な低下（図 4. a−c）と、Occludin、E-cadherin の低下傾向（図 4. d、e）が認められた。また、Claudin1 についてはタンパク発現量を Western Blot 法にて検討した結果、有意な発現低下が認められた（図 4. f、g）。

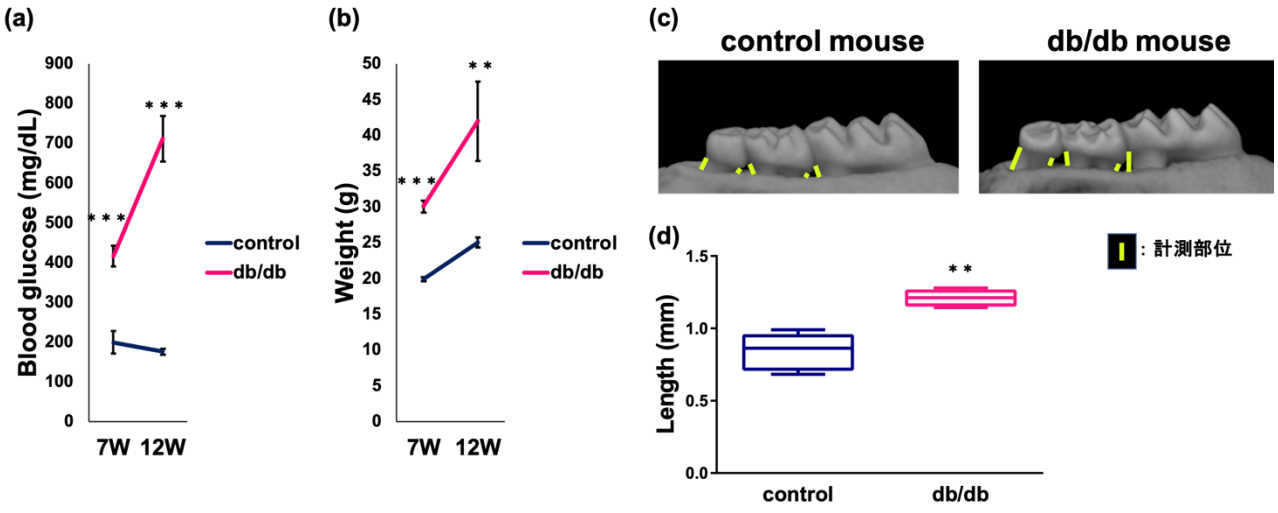


図 3. 糖尿病モデルマウスにおける歯周組織の解析

(a) 7 週齢と 12 週齢におけるマウスの血液を尾静脈より採取し、血糖値を計測した（n = 3、＊＊＊：$p < 0.001$）。

(b) 7 週齢と 12 週齢におけるマウスの体重を測定した（n = 3、＊＊＊：$p < 0.001$、＊＊：$p < 0.01$）。

(c) 12 週齢におけるマウスの上顎骨の歯槽骨をμCT にて観察した。

(d) セメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂のまでの距離を 5 点測定し、その総和を比較した（n = 5、＊＊：$p < 0.01$）。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

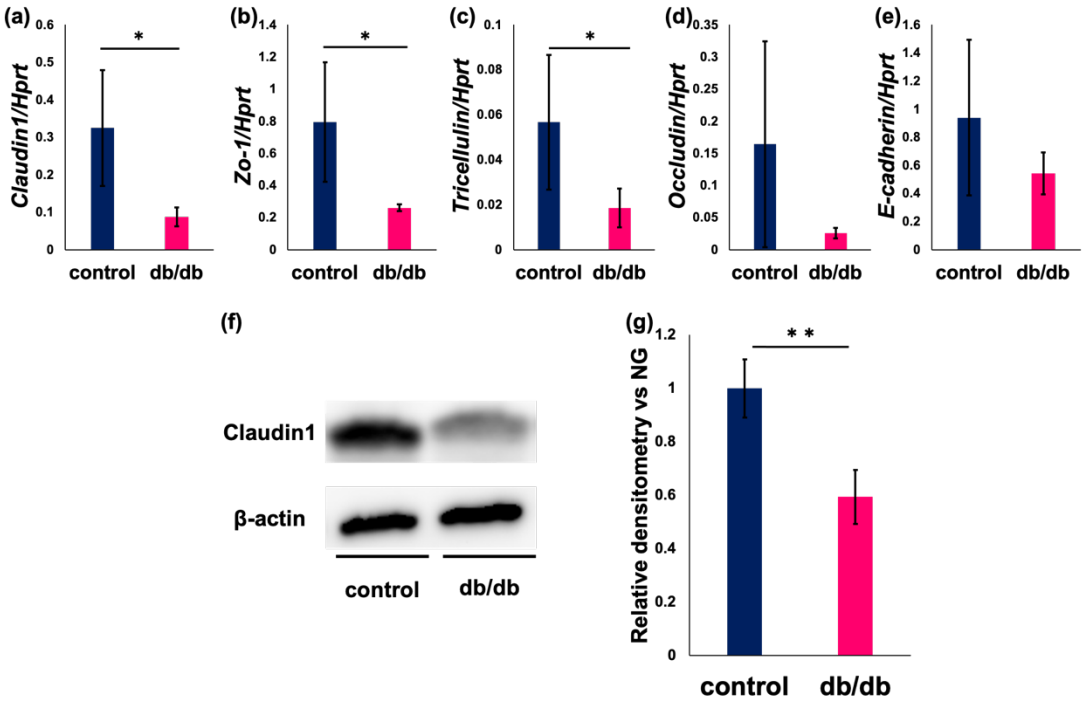


図 4. マウス歯肉組織における細胞間接着分子の mRNA およびタンパク発現の検討

Control マウスと db/db マウスより歯肉組織を採取し、RNA およびタンパクを回収後、Real time PCR 法（a−e）と Western Blot 法（f、g）にて検討を行った。

(a) Claudin1 (b) ZO-1 (c) Tricellulin (d) Occludin (e) E-cadherin の発現変化について Real time PCR 法にて検討を行った（n = 4、＊：$p < 0.05$）。

(f) Claudin1 の発現を Western Blot 法にて解析した。

(g) Western Blot 法の結果について画像解析を行った（n = 3、＊＊：$p < 0.01$）。Claudin1 の発現量は、Control マウスの発現量を 1 としたときの相対値として示す。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

2. 高血糖状態が歯肉上皮細胞のデキストラン透過性に及ぼす影響

上皮組織を構成する上皮細胞同士は細胞間接着分子機構にて接着しており、細胞間接着分子の発現が低下することで細胞同士の接着が減弱し、それにより細胞間の透過性が亢進する事が知られている[19]。そこで、細胞間の透過性に対する高血糖の影響を検討するために、Transwell®のメンブレン上に epi 4 を播種し、NG、HG の条件にて 14 日間培養後、FITC-dextran を 2.5 mg/mL の濃度にてインサート内に添加し、インサート外へ透過したデキストランの濃度を FITC の蛍光強度にて測定することで、細胞間の透過性の変化を検討した。その結果、高血糖状態の epi 4 において、有意なデキストラン透過性の亢進が認められた（図 5）。この結果より、高血糖が上皮細胞の細胞間透過性を亢進させることが明らかとなった。

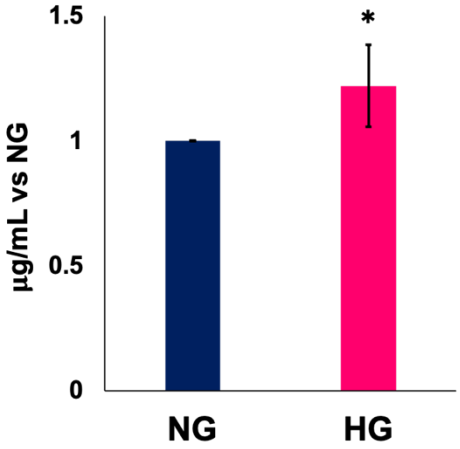


図 5. 高血糖状態が歯肉上皮細胞におけるデキストラン透過性に及ぼす影響

epi 4 を Transwell®のメンブレン上へ播種し、NG (5.5 mM D-glucose) 、HG (30 mM D-glucose) にて 14 日間培養後、上槽のインサート内へ FITC-dextran を 2.5 mg/mL の濃度にて添加し、2 時間インキュベート後、下槽のデキストランの量を FITC 蛍光強度にて測定した (n = 5、＊：$p < 0.05$) 。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

蛍光強度は、NG を 1 としたときの相対値として示す。

同様の実験を 3 回行い、得られた結果のうち代表的なものを示す。

3. 高血糖状態が歯肉上皮細胞における細胞生存能に及ぼす影響

高血糖状態になることで、細胞増殖に影響があることが報告されている[20, 21]。そこで、歯肉上皮細胞において、細胞生存能に対する高血糖の影響について検討した。epi 4 を NG、HG 条件下にてそれぞれ 14 日間培養した後、生細胞の ATP 量を発光強度にて測定し、それぞれの群での細胞の生存数を比較した。その結果、NG 群と HG 群で発光強度に有意な差は認められず、歯肉上皮細胞において高血糖が細胞生存能には影響しないことが明らかとなった（図 6）。

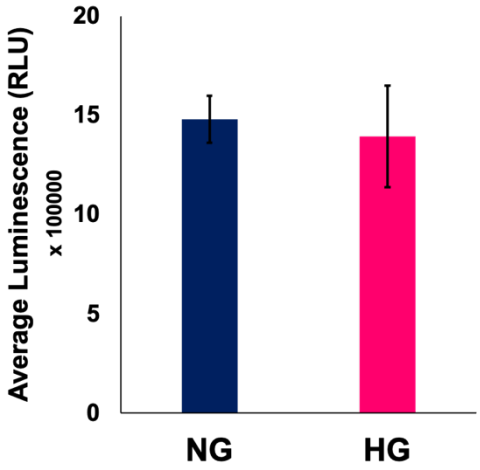


図 6. 高血糖状態の歯肉上皮細胞（epi 4）における細胞生存能の検討

epi 4 を NG (5.5 mM D-glucose) 、HG (30 mM D-glucose) にて培養し、14 日後 CellTiter-Glo® 2.0 Assay を用いて、生細胞の ATP 量を発光強度にて測定した（n = 4）。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す 。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

4. **高血糖刺激の中断による細胞間接着分子のタンパク発現変化の検討**

これまでの結果より明らかとなった歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の発現低下が高血糖の影響であることを確認するために、高血糖条件下にて培養し続けた場合と、高血糖培養を途中から中断した場合での細胞間接着分子のタンパク発現の変化について検討を行った。具体的には、NG、HG 条件下にて、それぞれ 21 日間培養する群 NG (3W) および HG (3W) とあわせて、HG にて 7 日間培養後、NG にて 14 日間培養 (HG (1W) → NG (2W)) 、もしくは HG にて 14 日間培養後、NG にて 7 日間培養する (HG (2W) → NG (1W)) 群を設定し、それぞれ培養 21 日後に全細胞画分を回収し、Western Blot 法にて Claudin1 のタンパクの発現について比較した。結果、epi 4 を NG で 21 日間培養した群と比較し、HG ではこれまでの結果と同様に、発現の有意な低下が認められたのと同時に、HG (3W) と比較し、HG (1W) → NG (2W) 群では発現低下に対する有意な回復が認められ、HG (3W) と比較し、HG (2W) → NG (1W) においては発現低下に対する回復傾向が認められた (図 7. a、b) 。このことからも、細胞間接着分子の発現低下が高血糖の作用の結果であることが示唆された。

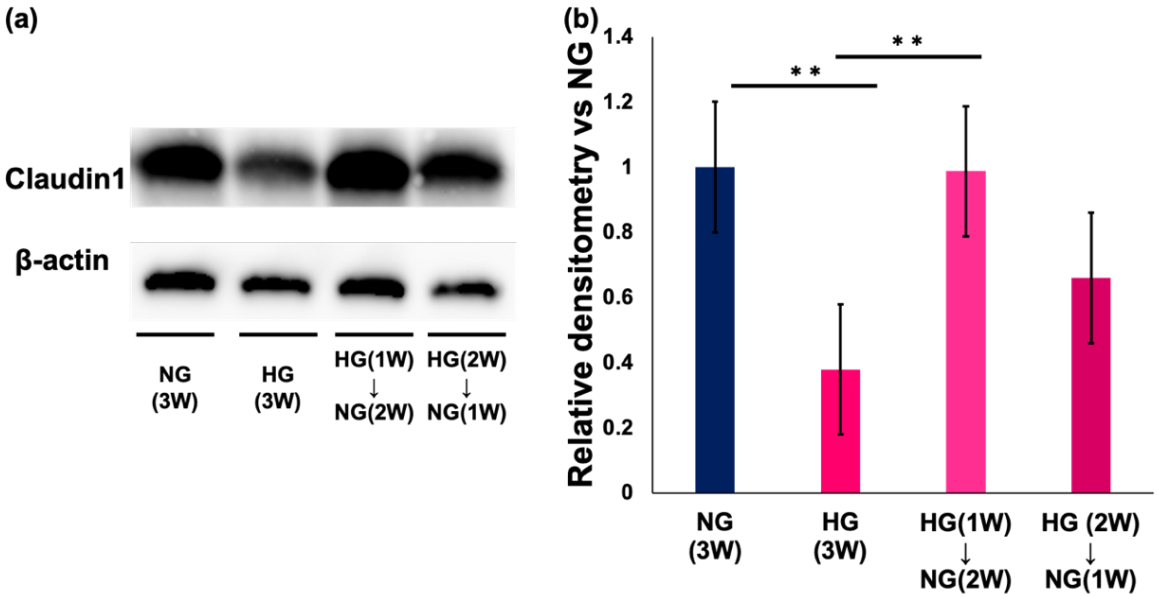


図 7. 高血糖刺激の中断が歯肉上皮細胞の細胞間接着分子タンパクの発現に及ぼす影響

(a) NG (3W) および HG (3W) は epi 4 を NG (5.5 mM D-glucose) もしくは HG (30 mM D-glucose) にて 21 日間培養した。HG (1W) → NG (2W) は 7 日間 HG (30 mM D-glucose) で培養後、高血糖刺激を中止し 14 日間 NG (5.5 mM D-glucose) で培養した。HG (2W) → NG (1W) は 14 日間 HG (30 mM D-glucose) で培養後、高血糖刺激を中止し 7 日間 NG (5.5 mM D-glucose) にて培養した。その後、通法に従い Western Blot 法にて検討を行った。

(b) (a)の結果に対して画像解析を行った（n = 3、＊＊：$p < 0.01$）。各タンパクの発現量は、NG を 1 としたときの相対値として示す。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

5. 高血糖による細胞間接着分子タンパクの発現変化に対する浸透圧の影響

高血糖状態で細胞を培養すると、細胞に浸透圧による影響が及ぼされると想定される。そこで本研究においても、浸透圧の影響について検討することとした。NG および HG と HG の浸透圧のコントロールとして 5.5 mM D-glucose+24.5 mM D-Mannitol (Man) の条件にて 14 日間培養後、全細胞画分を回収し、Western Blot 法にてタンパク発現について比較検討した。これまでの結果と同様に、NG と比較して HG では有意な発現の低下が認められた（図 8. a、b）。しかし、Man においては NG と比較し、発現量に変化は認められず、HG との間には有意な変化が認められた。以上の結果より、浸透圧の違いは細胞間接着分子の発現に影響を及ぼさないことが示唆された。

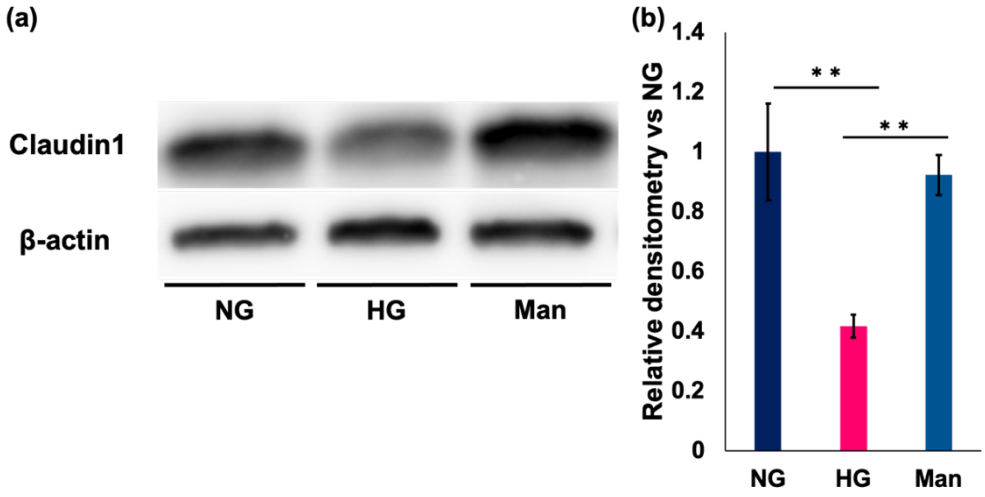


図 8. 高血糖による細胞間接着分子のタンパクの発現変化に対する浸透圧の影響

epi 4 を NG (5.5 mM D-glucose) または HG (30 mM D-glucose) 、Man (5.5 mM D-glucose+24.5 mM D-Mannitol) で刺激し、14 日間培養を行った。

(a) タンパク回収後、Western Blot 法にて Caudin1 の発現変化について検討した。

(b) (a)の結果に対して、画像解析を行い、それぞれの群間に対して有意差検定を行った（n = 3、＊＊：$p < 0.01$）。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

各タンパクの発現量は、NG を 1 としたときの相対値として示す。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

6. 高血糖状態におかれた歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の準網羅的な mRNA 発現の検討

これまでに、高血糖状態の歯肉上皮細胞において、Claudin1 の発現が低下することが明らかとなったが、他の細胞間接着分子の mRNA 発現へ及ぼす影響を確認するため、RT² Profiler PCR Primer Array (Human Cell Junction PathwayFinder) を用いて準網羅的に検討した。epi 4 を NG と HG で 14 日間培養後、細胞同士の接着に関連する分子や、細胞と細胞外基質との接着に関連する分子 84 種類について検討した。その結果、NG と比較し、HG において全ての接着に関連した分子の遺伝子発現の低下が認められた（図 9）。

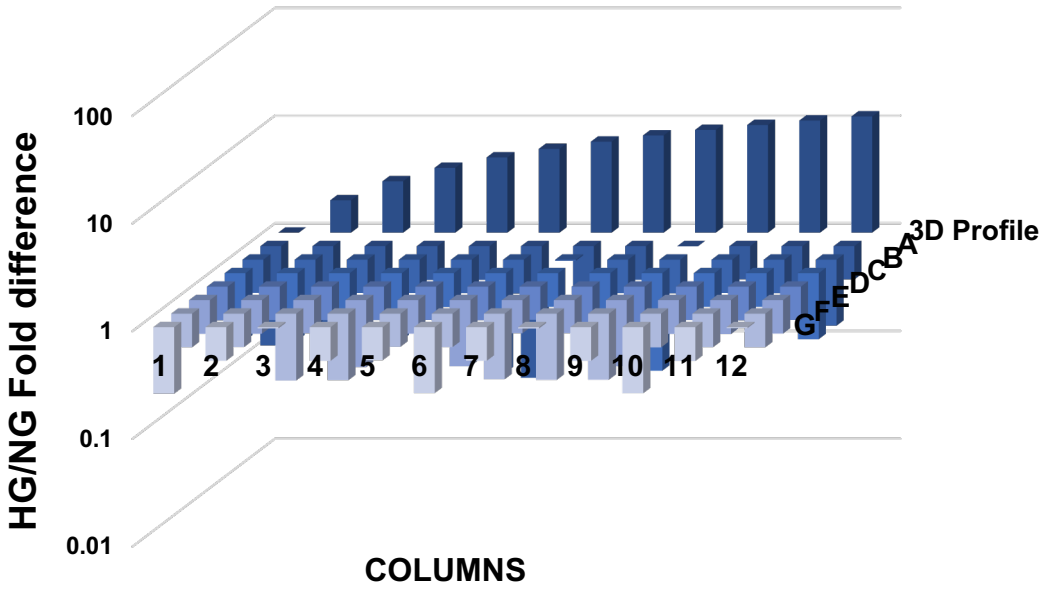


図 9. 高血糖状態におかれた歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の準網羅的な mRNA 発現の検討

epi 4 を NG と HG にて 14 日間培養し、RT² Profiler PCR Primer Array (Human Cell Junction PathwayFinder) を用いて準網羅的な解析を行った（n = 1）。84 種類の細胞間の接着や細胞と細胞外基質との接着に関連する分子をパネル化した PCR アレイである。NG と比較した HG の mRNA 発現の変化についてその変動の割合を 3 次元的に表したグラフを示す。図中の最奥行はキャリブレーションを表しており、1−12 列と A−G 行の棒グラフがそれぞれの mRNA 発現変化を示している。

NG を 1 としたときの相対値として示す。

検討した分子は表 2 に示す。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAV1	CAV2	CAV3	CDH1	CDH2	CLDN1	CLDN10	CLDN11	CLDN12	CLDN14	CLDN15	CLDN16
B	CLDN17	CLDN18	CLDN19	CLDN2	CLDN3	CLDN4	CLDN5	CLDN6	CLDN7	CLDN8	CLDN9	DLL1
C	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	DST	ESAM	F11R	GJA1
D	GJA3	GJA4	GJA5	GJA8	GJB1	GJB2	GJB3	GJB4	GJB5	GJB6	GJC2	GJD2
E	GJE1	ICAM1	ICAM2	ITGA1	ITGA2	ITGA3	ITGA4	ITGA5	ITGA6	ITGA7	ITGA8	ITGA9
F	ITGAL	ITGAM	ITGAV	ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB5	ITGB6	JAM2	JAM3	JUP
G	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4	OCLN	PLEC	PVRL1	PVRL2	PVRL3	TJP1	TJP2	TJP3

表 2. 上記の 1−12 列と A−G 行のそれぞれの細胞接着に関連した分子の一覧

表 2 に示す分子の詳細を以下に記載する。

A-1:Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa、A-2:Caveolin 2、A-3:Caveolin 3、A-4:Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)、A-5:Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)、A-6:Claudin 1、A-7:Claudin 10、A-8:Claudin 11、A-9:Claudin 12、A-10:Claudin 14、A-11:Claudin 15、A-12:Claudin 16、B-1:Claudin 17、B-2:Claudin 18、B-3:Claudin 19、B-4:Claudin 2、B-5:Claudin 3、B-6:Claudin 4、B-7:Claudin 5、B-8:Claudin 6、B-9:Claudin 7、B-10:Claudin 8、B-11:Claudin 9、B-12:Delta-like 1 (Drosophila)、C-1:Desmocollin 1、C-2:Desmocollin 2、C-3:Desmocollin 3、C-4:Desmoglein 1、C-5:Desmoglein 2、C-6:Desmoglein 3、C-7:Desmoglein 4、C-8:Desmoplakin、C-9:Dystonin、C-10:Endothelial cell adhesion molecule、C-11:F11 receptor、C-12:Gap junction protein, alpha 1, 43kDa、D-1:Gap junction protein, alpha 3, 46kDa、D-1 :Gap junction protein, alpha 3, 46kDa、D-2:Gap junction protein, alpha 4, 37kDa、D-3:Gap junction protein, alpha 5, 40kDa、D-4:Gap junction protein, alpha 8, 50kDa、D-5:Gap junction protein, beta 1, 32kDa、D-6:Gap junction protein, beta 2, 26kDa、D-7:Gap junction protein, beta 3, 31kDa、D-8:Gap junction protein, beta 4, 30.3kDa、D-9:Gap junction protein, beta 5, 31.1kDa、D-10: Gap junction protein, beta 6, 30kDa、D-11: Gap junction protein, gamma 2, 47kDa、D-12: Gap junction protein, delta 2, 36kDa、E-1:Gap junction protein, epsilon 1, 23kDa、E-2:Intercellular adhesion molecule 1、E-3:Intercellular adhesion molecule 2、E-4:Integrin, alpha 1、E-5:Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)、E-6:Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)、E-7:Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)、E-8:Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)、E-9:Integrin, alpha 6、E-10:Integrin, alpha 7、E-11:Integrin, alpha 8、E-12:Integrin, alpha 9、F-1:Integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)、F-2:Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)、F-3:Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)、F-4:Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)、F-5:Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)、F-6:Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)、F-7:Integrin, beta 4、

F-8:Integrin, beta 5、F-9:Integrin, beta 6、F-10:Junctional adhesion molecule 2、F-11:Junctional adhesion molecule 3、F-12:Junction plakoglobin、G-1:Notch 1、G-2:Notch 2、G-3:Notch 3、G-4:Notch 4、G-5:Occludin、G-6:Plectin、G-7:Poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)、G-8:Poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)、G-9:Poliovirus receptor-related 3、G-10:Tight junction protein 1 (zona occludens 1)、G-11:Tight junction protein 2 (zona occludens 2)、G-12:Tight junction protein 3 (zona occludens 3)、

7. 高血糖状態がヒト歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の mRNA およびタンパク発現に及ぼす影響についての検討

前述の準網羅的な mRNA 発現の解析結果より、細胞間接着に関する代表的な分子について、ヒト歯肉上皮細胞を 14 日間高血糖状態にて培養することで、細胞間接着が減弱し、タイトジャンクション構成分子である Claudin1 のタンパク発現については同様の傾向がみられた。そこで、歯肉上皮細胞の細胞接着において代表的な Tight junction と Adherens Junction を構成する細胞間接着分子に対する高血糖の影響を検討することとした。epi 4 を NG、HG にて 14 日間培養後 RNA を回収し、細胞間接着分子の mRNA 発現について Real time PCR 法にて比較検討した。その結果、NG と比較して HG では、Claudin1、ZO-1、Tricellulin、E-cadherin の有意な発現の低下と Occludin の低下傾向が認められた（図 10. a–e）。

次に、同条件で培養後、全細胞画分よりタンパクを回収し、Western Blot 法にてタンパクレベルでの発現を比較したところ、NG と比較して HG で Claudin1、Occludin、E-cadherin、Tricellulin の有意な発現の低下が認められた（図 10. f–j）。さらに、epi 4 をガラスボトムディッシュにて同条件下で培養した細胞を 14 日目に固定し、蛍光免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、Claudin1 および E-cadherin の発現が確認され、NG と比較して HG では、その発現の低下が認められた（図 11. a、b）。

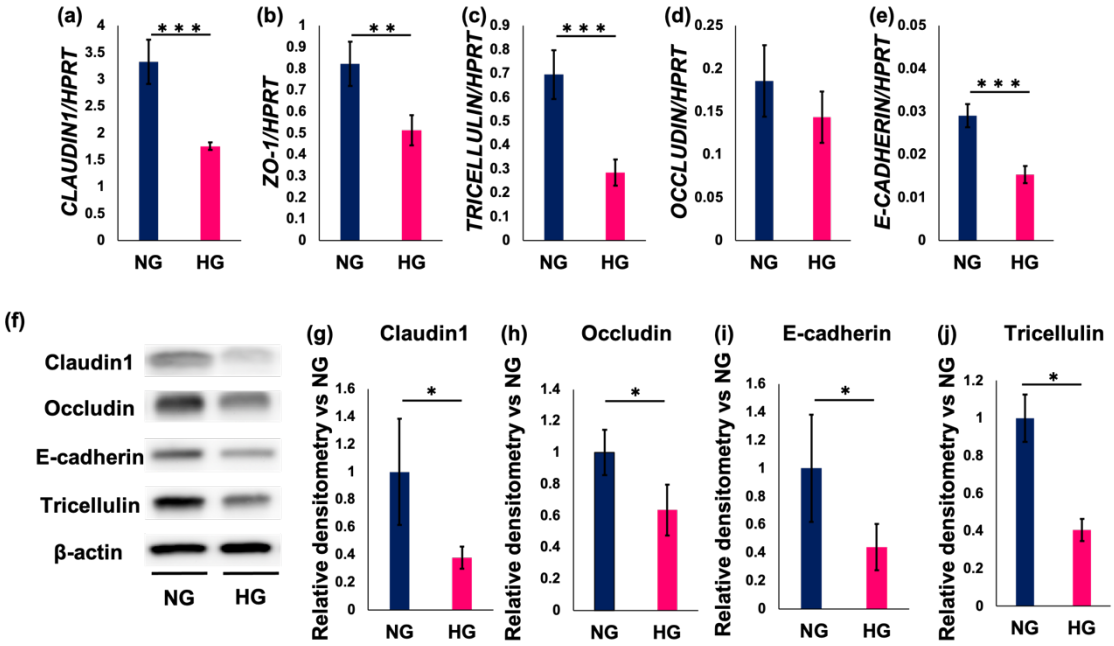


図 10. 高血糖状態が歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の mRNA およびタンパク発現に及ぼす影響

(a–e) epi 4 を NG (5.5 mM D-glucose) 、HG (30 mM D-glucose) にて 14 日培養後 mRNA を回収、Real time PCR 法にて検討を行った (n = 4、＊＊：$p < 0.01$、＊＊＊：$p < 0.001$) 。
(a) Claudin1 (b) ZO-1 (c) Tricellulin (d) Occludin (e) E-cadherin のプライマーを使用した。
(f) Western Blot 法にて検討した結果を示す。
(g–j) それぞれの細胞間接着分子の Western Blot 画像の解析を行い、それぞれの群間に対して有意差検定を行った。各タンパクの発現量は、NG を 1 としたときの相対値として示す。
(g) Claudin1 (n = 4、＊：$p < 0.05$) (h) Occludin (n = 4、＊：$p < 0.05$)
(i) E-cadherin (n = 4、＊：$p < 0.05$) (j) Tricellulin (n = 3、＊：$p < 0.05$)
解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。
それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

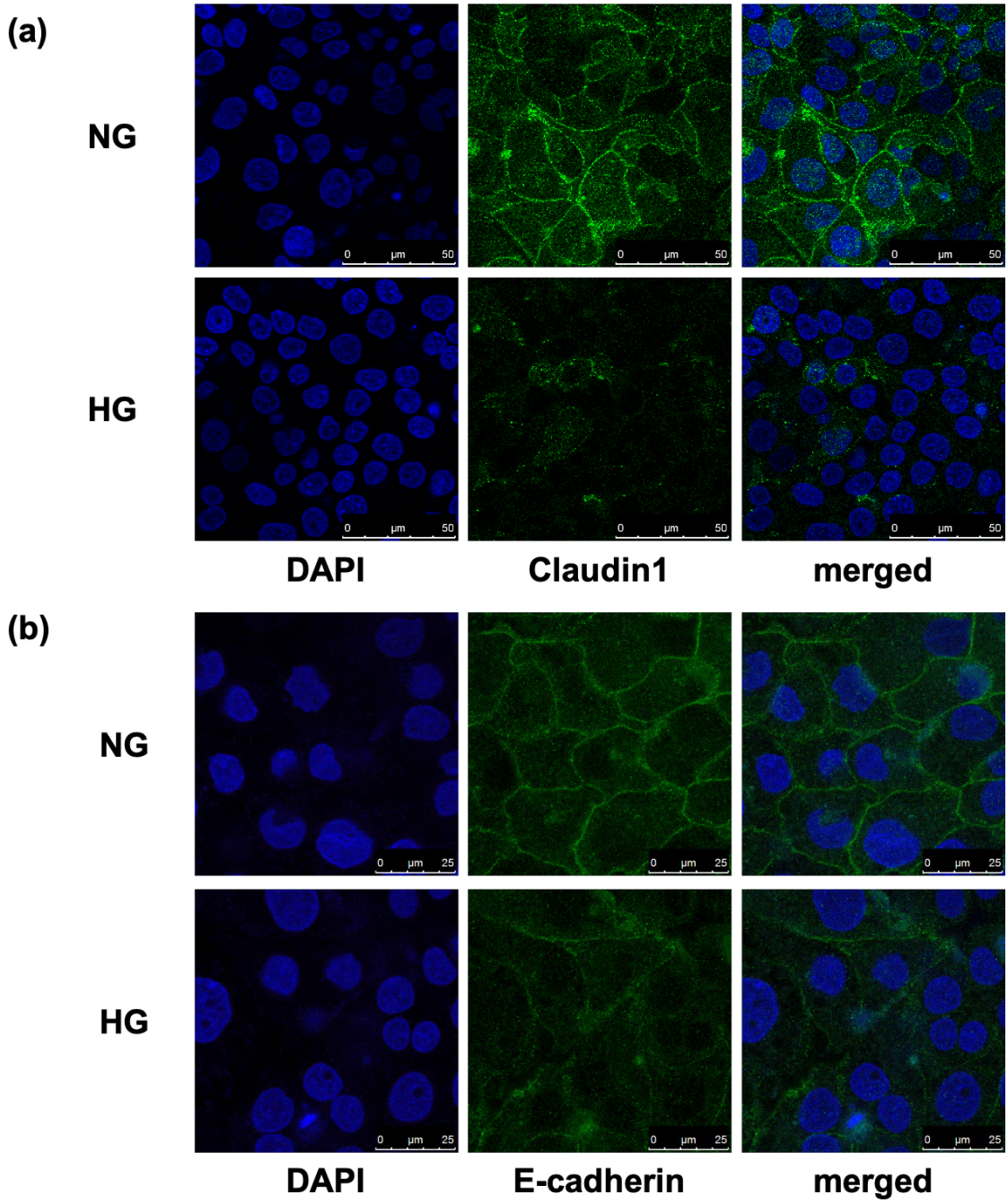


図 11. 細胞免疫染色による細胞間接着分子の発現解析

NG (5.5 mM D-glucose) もしくは HG (30 mM D-glucose) にて 14 日間培養し、細胞免疫染色を行った。(a) Claudin1 (1:250) (b) E-cadherin (1:200) の濃度でそれぞれ染色し、核染色を DAPI にて行った。拡大倍率は Claudin1 (×40) 、E-cadherin (×63) で観察した。
それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

8. 高血糖状態が歯肉上皮細胞間接着分子の発現に及ぼす影響（異なる細胞株を用いた検討）

epi 4 にて確認できた高血糖による細胞間接着分子の発現低下について、他のヒト歯肉上皮細胞の細胞株である OBA-9 を用いて検討することとした。NG または HG にて 14 日間培養し、細胞間接着分子の発現を検討した。その結果、epi 4 において、発現の有意な低下が認められた Claudin1 の発現については、mRNA およびタンパク発現共に、NG と比較した HG における発現変化は認められなかった（図 12. a）。しかし、その他の Occludin、Tricellulin、ZO-1、E-cadherin では HG において mRNA の有意な発現低下が認められ、epi 4 と同様の発現低下傾向が認められた（図 12. b–e）。また、タンパク発現においても E-cadherin、Occludin の有意な低下が認められ、その変化は epi 4 と同様であった（図 12. f–i）。さらに、他のヒト歯肉上皮細胞の細胞株である Tfx についても、同条件にて培養し、mRNA 発現の変化について検討を行った。その結果、Claudin1 と E-cadherin においては有意な発現低下は認められなかったが、その他の細胞間接着分子である Occludin、Tricellulin、ZO-1 においては epi 4 と同様の有意な発現低下が認められた（図 12. j–n）。

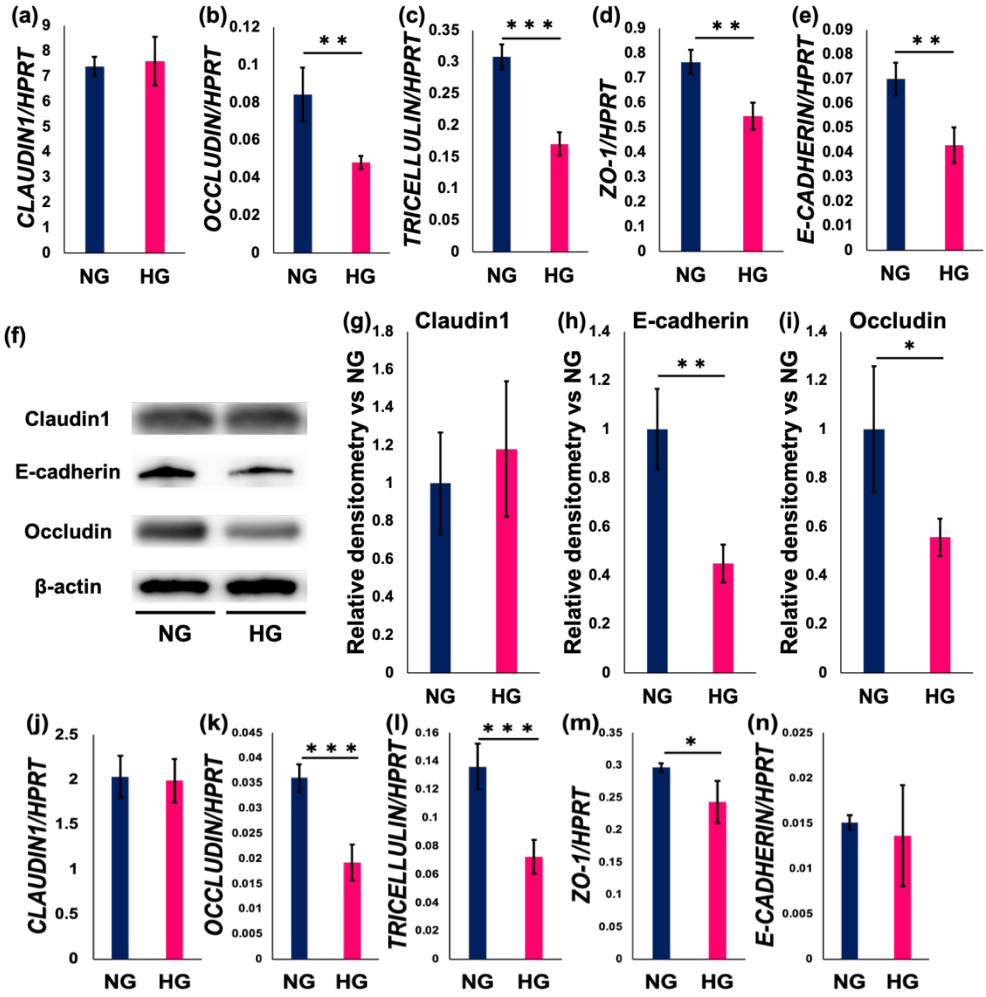


図 12. OBA-9 および Tfx における細胞間接着分子の発現変化の検討

他の同種細胞である OBA-9 を NG (5.5 mM D-glucose)、HG (30 mM D-glucose) にて 14 日間培養後、細胞間接着分子の mRNA およびタンパクの発現変化について検討した (a−i) 。

また、同様の条件にて Tfx を培養し、mRNA の発現変化について検討した (j−n) 。

(a−e) (a) Claudin1 (b) Occludin (c) Tricellulin (d) ZO-1 (e) E-cadherin の発現変化について Real time PCR 法にて検討した結果を示す (n = 4、＊＊：$p < 0.01$、＊＊＊：$p < 0.001$) 。

(f) Western Blot 法にて検討した結果を示す。

(g−i) それぞれの細胞間接着分子の Western Blot 画像の解析を行い、それぞれの群間に対して有意差検定を行った。各タンパクの発現量は、NG を 1 としたときの相対値として示す(n = 3、＊：$p < 0.05$、＊＊：$p < 0.01$)。(g) Claudin1 (h) E-cadherin (i) Occludin

(j−n) (j) Claudin1 (k) Occludin (l) Tricellulin (m) ZO-1 (n) E-cadherin の発現変化について Real time PCR 法にて検討した結果を示す (n = 4、＊：$p < 0.05$、＊＊＊：$p < 0.001$) 。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

9. 立体培養した歯肉上皮細胞の観察

in vitro 培養系の epi 4 をより歯肉上皮組織に近い状態で評価することを目的として、立体培養を試みた。表皮や眼の網膜上皮細胞の *in vitro* での立体培養に応用されている方法 [22] で、Transwell®のアッパーチャンバーに細胞を播種し、細胞が生着した後、上方のメディウムを除去し、気相として培養し続けることで細胞が重層するエアーリフト培養を行った。epi 4 を同方法にて 30 日間立体培養し、得られた組織をアッパーチャンバーの下面のメンブレンごと固定後、HE 染色にて観察を行った。その結果、培養 0 日目と比較し、培養 30 日目では細胞が重層している像が確認された。さらに、培養 30 日目の高血糖状態において、積層構造の均一性が失われる異常が認められた（図 13. a）。さらに同上組織について、透過型電子顕微鏡を用いて細胞間隙の観察を行った結果、高血糖状態では図中の矢頭に示すように、細胞隣接部位の間隙が不均一な形態を示す像が観察された（図 13. b）。

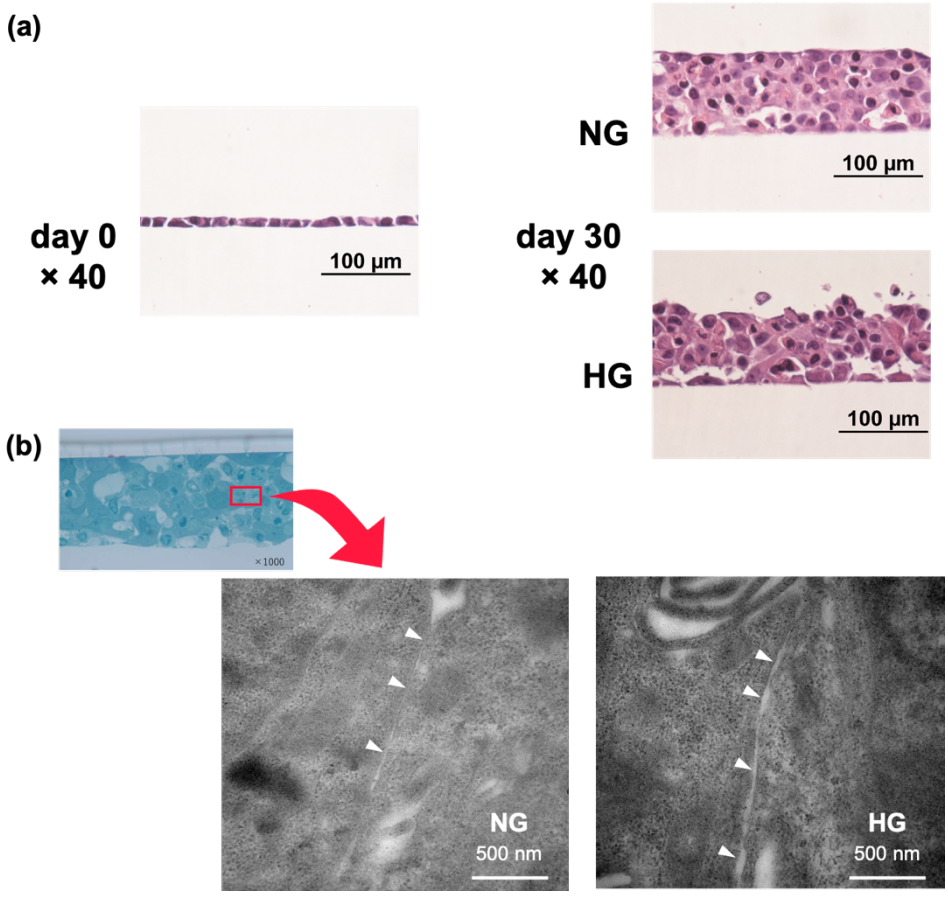


図 13. 立体培養した epi 4 の観察

(a) epi 4 のエアーリフト培養を行い、培養 0 日目と 30 日目に回収後、HE 染色を行った。

(b) 透過型電子顕微鏡を用いて立体培養した epi 4 の細胞間隙を観察した（×50000）。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

10. 高血糖状態で培養された歯肉上皮細胞における細胞間接着分子発現低下の機序に関する解析

一般的に、細胞内に取り込まれたグルコースは解糖系から TCA サイクルにてエネルギー産生に使用されるが、この実験系のように高血糖条件下では、細胞内で異常な糖代謝が引き起こされると想定される。その代表例としては、高血糖により異常な ROS や最終糖化産物 AGEs が産生されることで酸化ストレスが亢進することや、PKC が活性化すると報告されている [23, 24]。そこでまず、長期間高血糖状態にて培養した epi 4 の AGEs に対する応答性の変化を検討するために、AGEs を特異的に認識する細胞表面レセプターの一つである receptor of advanced glycation end products (RAGE) の発現変化を解析した。epi 4 を NG と HG にて 14 日間培養後 RNA を回収し、RAGE の mRNA 発現について Real time PCR 法にて検討した（図 14. a）。その結果、NG と比較して HG において有意な発現の増加が認められた。このことにより、epi 4 において、HG では AGEs に対する反応性が亢進する可能性が示唆された。さらに、RAGE に作用する AGEs の一種である Carboxymethyl Lysine (CML) を D-glucose の代わりに 1 ng/mL の濃度で用い、14 日間刺激を行い、Claudin1 の mRNA 発現について Real time PCR 法にて検討した（図 14. b）。結果、CML 群において Claudin1 発現の有意な低下が認められた。

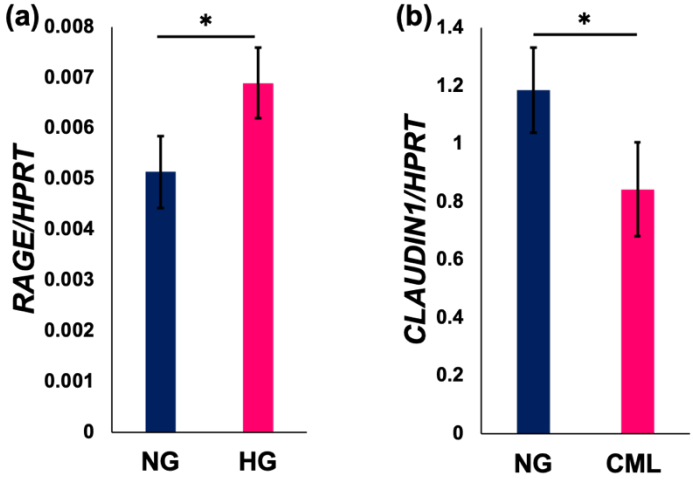


図 14. 高血糖状態が epi 4 における AGEs シグナルに及ぼす影響

(a) epi 4 を NG (5.5 mM D-glucose)、HG (30 mM D-glucose) にて 14 日間培養後、それぞれ RNA を回収し、RAGE の mRNA 発現変化について、Real time PCR 法にて検討した（n = 4、＊：$p < 0.05$）。

(b) NG と CML (1 ng/mL) にて 14 日間刺激を行い、Claudin1 の mRNA 発現変化について Real time PCR 法にて検討した（n = 4、＊：$p < 0.05$）。

解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

さらに、同上条件の epi 4 に対する、酸化ストレスの影響について検討した。epi 4 を NG および HG にて 14 日間培養後、ROS の量を蛍光強度にて測定した。その結果、高血糖条件では有意な ROS の亢進が認められた（図 15. a）。次に、これまでの高血糖刺激培養条件に抗酸化物質である NAC を 1 mM の濃度で添加し、酸化ストレスへの阻害効果を検討した。その結果、これまでの結果と同様に NG と比較し HG では Claudin1 の有意な mRNA 発現の低下が認められたのに対し、HG に NAC を添加した群では低下に対する有意な回復効果が認められた（図 15. b）。さらに、高血糖状態の腎尿細管上皮細胞においては MAPK シグナルが活性化することが報告されており[25]、同上条件で培養した epi 4 における MAPK シグナルに対する高血糖の影響を検討するために、MAPK のリン酸化を Western Blot 法にて比較解析した。その結果、NG と比較して HG では ERK1/2 リン酸化の有意な亢進が認められた（図 15. c、d）。

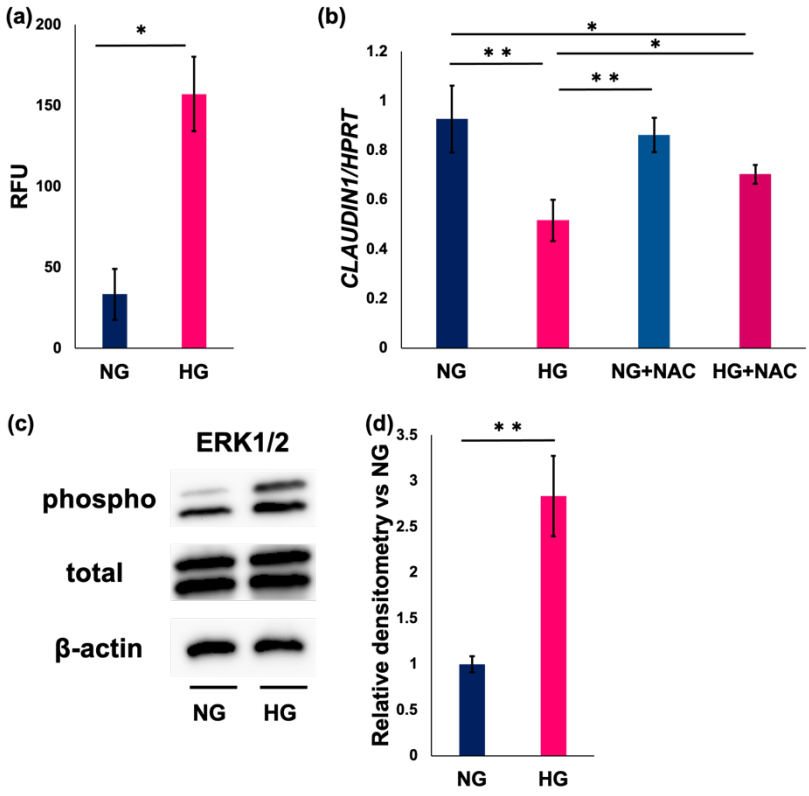


図 15. 高血糖状態の歯肉上皮細胞における細胞間接着分子の発現低下に対する酸化ストレスと ERK1/2 リン酸化の影響

(a) OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit を用いて、活性酸素種（ROS）の量を蛍光強度にて測定し、酸化ストレスの関与について検討を行った（n = 4、＊：$p < 0.05$）。RFU (Relative fluorescence units) 相対蛍光単位で結果を示す。

(b) これまでと同じ培養条件に、抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を添加し Real time PCR 法にて Claudin1 の発現変化を検討した（n = 4、＊：$p < 0.05$、＊＊：$p < 0.01$）。

(c) さらに、これまでと同じ条件で培養した歯肉上皮細胞における MAPK シグナルに対する高血糖の影響を Western Blot 法にて検討した。

(d) 画像解析を行った（n = 3、＊＊：$p < 0.01$）。各タンパクの発現量は、NG を 1 としたときの相対値として示す。

(a、b、d) 解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す 。

考察

本研究は糖尿病が歯周病のリスク因子であるという背景と歯周病菌感染に対して最前線に位置する歯肉上皮のバリア機能に着目し、歯肉上皮の細胞間接着に対する高血糖の影響を *in vitro* および *in vivo* にて解析したものである。

上皮は生体内と外を隔てる物理的なバリアであり、細胞間接着を強固に維持することで外側からの刺激を遮断し、生体防御に関わっている。歯周ポケット内には 700 種類以上といわれる多様な細菌がバイオフィルムを形成し棲息している。そのバイオフィルムと最前線で対峙するのはポケット内の歯肉上皮である。一方、歯周病と糖尿病は相互にリスク因子として位置付けられている[26]。糖尿病は高血糖が慢性化することで、全身の様々な組織が機能不全となる糖尿病合併症を引き起こすことが知られており、歯周病も 6 番目の合併症といわれている。その機序としては、微小血管障害、創傷治癒障害、免疫機能障害等が提唱されてきた。しかし近年、腸管粘膜上皮において高血糖によりバリア機能が減弱することで全身性の炎症が惹起される可能性が報告された[9]。そこで本研究では、歯周病における感染の最前線に位置する歯肉上皮のバリア機能に対する高血糖の影響について検討をすすめることとした。

本研究で使用した db/db マウスは control マウスと比較して、7 週齢と 12 週齢において、血糖値が有意に高値を示した。これは、10 週齢の db/db マウスにおいて血糖値が 32.7±2.0 mM (588.6±36 mg/dL) である[18]という報告と一致した結果であり、糖尿病の病態が完成していること意味している。また、db/db マウスでは 7 週齢と比較し、12 週齢の血糖値と体重が有意に増加しており、典型的な表現型を確認できた。さらに、12 週齢の db/db マウスの上顎歯槽骨は control マウスよりも歯槽骨の吸収が有意に進行している事が明らかとなった。これら高血糖モデルでの検討からも、糖尿病の病態では歯槽骨の吸収が増悪する事が示唆された。

当研究室で樹立したヒト歯肉上皮細胞株を用いて *in vitro* で高血糖の影響について検討を行った。高血糖の条件としては他の上皮の研究[23,25]と上記モデル動物の血糖値を参考として、グルコースの濃度を 30 mM と設定した。同条件にて歯肉上皮細胞を長期間培養すると、コントロール群と比較してデキストランの透過性が上昇している結果が得られた。このことから高血糖により細胞間の接着が機能的に減弱していることが明らかとなり、高血糖に曝されると、歯肉上皮においても透過性が亢進し、バリア機能が減弱することが示唆された。一方で、腎尿細管上皮細胞において、浸透圧の上昇が Tight Junction に影響すると

報告されており[27]、上記の細胞間の透過性の亢進が、これらの影響の結果であると疑われた。しかし、慢性的な高血糖刺激やそれに伴う浸透圧の上昇は epi 4 における細胞間接着分子の低下に影響しないことが示された。

上皮組織のバリア機能は細胞間接着機構により成り立っており、その主たるものとして、Tight Junction と Adherens Junction があるが、高血糖マウスの歯肉組織および高血糖条件にて培養した epi 4 において、そのどちらの構成分子についても mRNA 発現の有意な低下が認められた。さらに、本研究は、体の最外側に位置するバリア機構である Tight Junction を構成する Claudin1 の発現に着目して検討を行った。その結果、高血糖マウス歯肉組織および高血糖条件下での epi 4 において、Claudin1 のタンパク発現の有意な発現の低下が認められた。また、epi 4 で免疫染色を行った結果、細胞間隙に沿って発現が確認され、高血糖培養群において、発現の減弱が確認された。これらの結果から、バリア機能減弱が確認された同様の条件において細胞間接着分子の発現が低下しており、機能的な発現低下と考えている。

さらに、慢性的な高血糖刺激を中止し通常の培養条件に戻すことで、細胞間接着分子の発現低下に対して、回復が認められるかについて、epi 4 を用いてさらに検討してみた。その結果、高血糖により細胞間接着分子が低下し、その反応が可逆的な反応であることが明らかとなった。さらに、高血糖刺激を継続した群と比較し、2 週間高血糖刺激を中断する群では、Claudin1 の有意な発現回復が認められたが、1 週間高血糖刺激を中断する群では発現の回復傾向に留まり、有意な差は認められなかった。このことから、高血糖が細胞間接着分子へ及ぼす影響は時間依存的である可能性が示唆された。これらの結果より、糖尿病患者の歯周ポケット内ではバリア機能が破綻しているが、糖尿病の治療により血糖管理を適正に行うことで、バリア機能を回復する可能性が示唆され、糖尿病性の歯周病の病態の一端が明らかになったと考えている。

次に、*in vitro* において、より生体組織に近い状態での観察を目指し、歯肉上皮細胞の 3 次元的な培養を試みた。これまでに、歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞を用いた *in vitro* での 3D 共培養系にて、口腔接合部上皮界面を模倣する歯肉組織モデルの研究[28,29]が試みられているが、本研究では皮膚上皮組織を模した薬剤の効能試験で用いられている培養方法であるエアーリフト培養を epi 4 に応用し、30 日間の培養を行ったところ、3 次元的な培養が可能であることが明らかとなった。この 3D 培養系にて高血糖条件での培養を行うと、コントロール群と比較し、均一な細胞配列や厚みの異常が観察された。さらに、3 次元的な培養細胞の細胞間隙の形態に変化があるか観察するため、細胞間隙を透過型電子顕微鏡で観察した結果、高血糖状態では細胞隣接部位の間隙が不均一な形態を示す像が観察された。以上より、高血糖状態においては、機能的な細胞間接着分

子の発現低下が細胞間隙の形態を変化させ、バリア機能の減弱が引き起こされている可能性が示唆された。一方、網膜上皮細胞における研究で高血糖状態に曝されると細胞骨格と極性の不整が惹起されバリア機能の異常につながることが報告されている [30]。本研究における歯肉上皮細胞においても同様の現象が起こっている可能性が想定されるが、細胞骨格を介したバリア機能への影響に関する検討については、本研究で用いた epi 4 の高血糖培養系での今後の検討課題と考えている。

ヒト歯肉上皮細胞の細胞株として epi 4 を用いて検討してきたが、同種ヒト歯肉上皮細胞株である OBA-9 についても細胞間接着分子発現の検討を行った。その結果、Claudin1 の有意な低下は認められなかった。さらに、他の細胞株 Tfx で同様の検討を行ったところ、Claudin1、E-cadherin の有意な低下は認められないが、他の細胞間接着分子の発現変化については epi 4 と類似した結果を得た。これら細胞株間の違いは、epi 4 および Tfx と OBA-9 の細胞株作製時、細胞単離や遺伝子導入の方法としては同様であるが、臨床検体の歯肉上皮の採取時に採取する部位の違い等により細胞の分化度に差異があった可能性が考えられる。本研究における高血糖での細胞間接着分子群の mRNA 発現の減弱については、マウスの歯肉組織と epi 4 における発現変化が最も酷似していた。しかし、マウス歯肉上皮組織はサンプル量確保のため、歯肉の内縁上皮のみを限定して採取することは極めて難しく、加えて、基底層、有棘層等を区別して細胞株を樹立することは技術的に不可能をいわざるを得ない。今後はヒト歯肉上皮を対象とした組織学的検討およびそれぞれの細胞株の分化度の違いと細胞間接着分子の発現変化の差異について、さらに検討を進めていきたいと考えている。

一般的に、筋肉や脂肪組織での糖の取り込みはインスリンに依存しており、インスリン抵抗性により、糖の取り込みが障害されることで高血糖の状態が引き起こされ、糖尿病は進行する。これに対し、上皮を含めた腎臓、神経などの細胞ではインスリンはあまり関与せず、細胞内への糖の流入は周囲の糖濃度に依存している。細胞内に取り込まれたグルコースは解糖系から TCA サイクルにてエネルギー産生に使用されるが、本研究における実験系のように高血糖条件下では、細胞内で異常な糖代謝が引き起こされることが想定される。例えば解糖系だけで処理できない糖の代謝経路として、ポリオール経路、ヘキソサミン経路、PKC 経路、AGEs 経路、ペントースリン酸回路といった複数の側副経路が存在する [31]。ヒト歯肉上皮組織の検体を用いた組織学的研究にて、健康な歯肉と比較して歯周病患者の歯肉上皮では RAGE の発現が上昇し、糖尿病に罹患した歯周病患者ではさらなる RAGE の発現上昇が報告されている [32]。そこで、本研究では RAGE に対するリガンドとして AGEs の一種である CML を用いた。CML は生体における主要な AGEs 構造として報告されており、長

期的な酸化ストレス蓄積の指標とされている。本研究の培養条件が 14 日間という長期的な高血糖状態であるため、CML が細胞間接着分子の低下に関与しているのではないかと考えた。まず、epi 4 における CML を含めた AGEs の特異的レセプターである RAGE の存在を mRNA 発現にて確認した結果、高血糖刺激にて発現の明らかな上昇が認められたことにより、AGEs に対する細胞応答性が亢進している可能性が示唆された。HG 刺激の代わりに CML にて 14 日間刺激を行うと Claudin1 の mRNA 発現の有意な低下が認められ、歯肉上皮細胞において、AGEs が細胞間接着分子の発現低下に関与していることが示唆された。これは腎尿細管上皮において、AGEs が ERK1/2 のリン酸化と E-cadherin の発現低下を引き起こすという報告[33]や、AGEs が ZO-1 を低下させるという報告[34]があり、本研究と類似した結果である。また、高血糖状態の上皮組織において、解糖系の側副経路が活性化することで、AGEs が産生されると、細胞内シグナル経路として、ERK1/2 リン酸化が関与していることが報告されている[24]。一方、先行報告として、腎尿細管の上皮細胞において ROS が増加し ERK1/2 が活性化されることで E-cadherin の発現が低下する[25]、角膜上皮細胞において高血糖による ZO-1 の発現低下に ERK1/2 が関与している[35,36]といった発表がなされている。そこで、本実験系においても、ROS と MAPK の ERK1/2 のリン酸化が関与しているのではないかと考え検討を行ったところ、高血糖状態の epi 4 において、ROS の産生と ERK1/2 のリン酸化の有意な上昇が認められた。さらに、抗酸化剤である NAC を同上培養系に添加することで、高血糖による Claudin1 の mRNA 発現の低下に対して有意な抑制効果を示したことから、歯肉上皮細胞に対して、高血糖状態は酸化ストレスを増大させ ERK1/2 が活性化することにより、細胞間接着分子の発現低下を引き起こしていることが示唆された。歯肉上皮細胞に対して、高血糖状態は酸化ストレスを増大させ ERK1/2 が活性化することにより、細胞間接着分子の発現低下を引き起こしていることが示唆された。

糖尿病はⅠ型糖尿病、Ⅱ型糖尿病、その他、妊娠糖尿病に大別できる。日本人の糖尿病の大部分を占めるのはⅡ型糖尿病である。それぞれを模した動物モデルが存在するが、ストレプトゾトシン（STZ）を投与することで膵臓細胞を傷害し、インスリンの分泌を阻害し、Ⅰ型糖尿病の病態を示す STZ 誘発糖尿病モデルマウスは古くから用いられている[37]。本研究では、日本人に多いⅡ型糖尿病患者の歯周病悪化のリスクの一因を解明することとし、Ⅱ型糖尿病のモデルである db/db マウスを用いた。当マウスは高インスリン血症も同時に呈している。インスリンレセプターについては腸管上皮や血管内皮において発現しており、その細胞機能に関与していることが報告されている[38,39]。しかし、歯肉組織に対するインスリンレセプターの影響については報告がない。さらに、ヒト歯肉上皮

において、インスリン非依存的 GLUT1、インスリン依存的 GLUT4 が発現しているとの報告 [40,41] があるが、その機能について明らかにした報告はない。本研究の *in vitro* の実験においては、歯肉上皮細胞に対して高血糖刺激を行ったが、インスリンの濃度は変化させておらず、インスリン非依存性のレセプター GLUT1 等を介した糖の取り込みによる影響と考えている。また、db/db マウスはレプチン受容体が欠損することで異常な食欲が生じて肥満になる糖尿病モデルマウスであるため、高血糖状態を正常な血糖値に回復することは難しい。しかし、重度免疫不全糖尿病モデルマウスである Kuma マウスは遺伝子欠損による自然発症型の糖尿病モデルマウスであり、インスリン治療により正常な血糖値に回復が可能なモデルであることが報告されている [42]。この Kuma マウスや STZ マウスを用いて検討をすすめることで、インスリンの影響や本研究で明らかとなった高血糖による細胞間接着分子の可逆的な変化について、*in vivo* においても解析が可能ではないかと考えられ、今後、糖尿病の病態における歯肉上皮組織のバリア機能をさらに詳細に評価検討する手法として期待される。

本研究では、高血糖状態により歯肉上皮のバリア機能が低下することを明らかにしてきたが、歯周病の主原因は歯周病菌感染である。これまでに *in vivo* および *in vitro* 研究で、歯周組織および歯肉上皮細胞に対して、長期的な *Pg* 生菌や *Pg* LPS（リポポリサッカライド）にて刺激することによってバリア機能が減弱するという報告 [43-45] がなされている。このことから、歯周病の原因の 1 つである歯周病菌が放出する LPS 等の影響による細胞間接着分子の低下に加え、本研究で着目した糖尿病の病態である高血糖による細胞間接着分子の低下が起こることで、歯周病の病態がさらに増悪するものと考えられる。さらに、本研究で明らかにした高血糖による細胞内の ROS の蓄積は、細菌感染による炎症の結果としても蓄積することが報告されており、NAC はどちらの反応に対しても抑制的に働く可能性がある。また、NAC は比較的安全なアミノ酸であるため、歯磨剤等に添加することで局所において効果を期待できる候補物質として期待される。高血糖は全身の組織において炎症を亢進することがこれまでに多く報告されており [46]、歯周組織の局所における感染からの炎症反応と重なることで歯周組織破壊がどのように修飾されるかについては、前述のインスリンの影響とあわせて詳細に検討する必要があり、今後の重要な課題である。

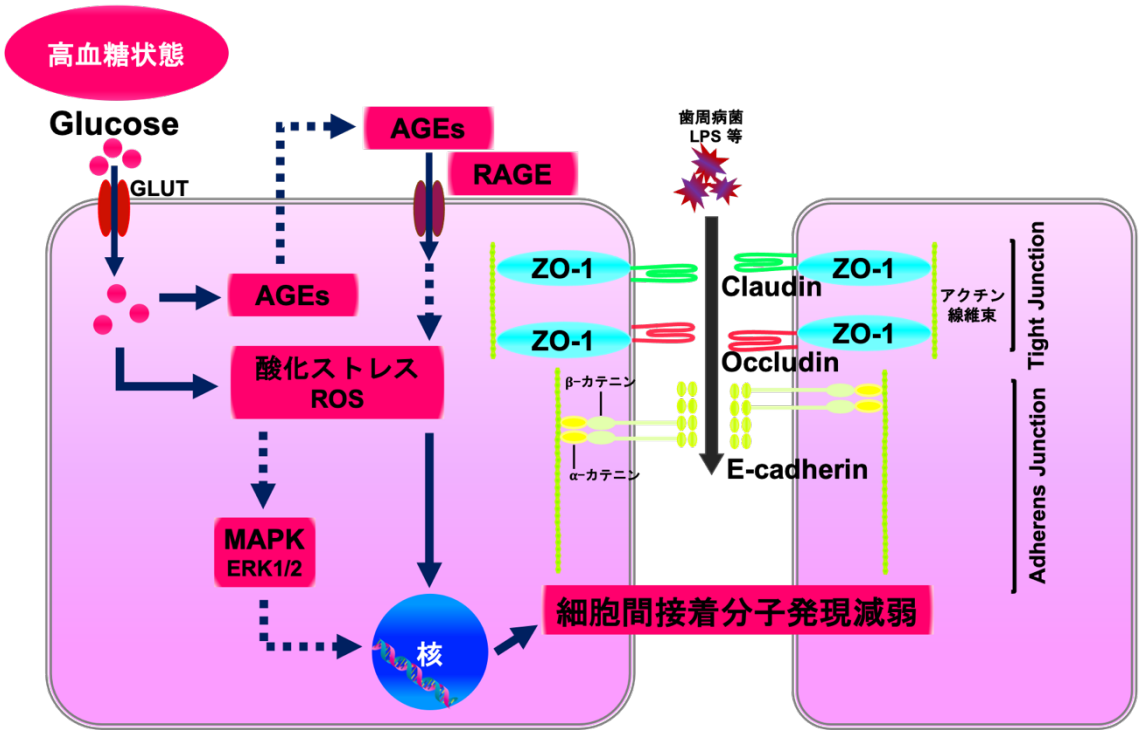


図 16. 高血糖状態が歯肉上皮の細胞間接着に及ぼす影響

結論

本研究より以下の結論を得た。

1. ヒト歯肉上皮細胞において、高血糖状態は細胞間接着を減弱し、その構成分子の発現を低下させることが明らかとなり、糖尿病マウス歯肉組織においても同様の変化が認められた。

2. ヒト歯肉上皮細胞はエアーリフト培養にて重層することが明らかとなり、高血糖状態下で重層した細胞間隙を観察すると、ジャンクションの形態が不定形を示した。

3. ヒト歯肉上皮細胞における高血糖による細胞間接着分子の発現低下には、AGEs および ROS の産生と ERK1/2 のリン酸化の亢進が関与していることが明らかとなった。

以上のことから、高血糖状態の歯肉上皮細胞において、過剰な糖が細胞内に流入することにより、代謝過程で AGEs や ROS が過剰に産生されることで酸化ストレスが亢進し、細胞間接着分子の発現の減弱が引き起こされると考えられる。これらの結果から、糖尿病患者の歯肉上皮では、高血糖によりバリア機能が低下することで、歯周病菌やその LPS などの起炎物質が侵入しやすくなり、歯周病の悪化につながることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なるご指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、柏木陽一郎助教に心より感謝申し上げます。

さらに、電子顕微鏡を用いた観察とそれに伴う切片の作製に関して多大なる御助言を頂きました大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部、三浦治郎助教に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々なご協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

1. 厚生労働省. 平成 23 年歯科疾患実態調査.
2. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes:. *Diabetes Care.* 2020;43(Suppl 1): S14-S31.
3. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol.* 1991;62(2):123-131.
4. Cintra LTA, Estrela C, Azuma MM, Queiroz Í, Kawai T, Gomes-Filho JE. Endodontic medicine: interrelationships among apical periodontitis, systemic disorders, and tissue responses of dental materials. *Braz Oral Res.* 2018;32(suppl 1): e68.
5. Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomuta H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation end

products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia.* 1997;40(7):764-769.
6. Yang X, Mostafa AJ, Appleford M, Sun LW, Wang X. Bone Formation is Affected by Matrix Advanced Glycation End Products (AGEs) In Vivo. *Calcif Tissue Int.* 2016;99(4):373-383.
7. Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):12043-12047.
8. Kashiwagi Y, Takedachi M, Mori K, et al. High glucose-induced oxidative stress increases IL-8 production in human gingival epithelial cells. *Oral Dis.* 2016;22(6):578-584.
9. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection. *Science.* 2018;359(6382):1376-1383.
10. DeFronzo RA. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med.* 1997;50(5):191-197.
11. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S233-236.
12. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000;49(11):1939-1945.
13. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes.* 2010;59(1):249-255.
14. Oda D, Watson E. Human oral epithelial cell culture I. Improved conditions for reproducible culture in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26(6):589-595.
15. Murakami S, Yoshimura N, Koide H, et al. Activation of adenosine-receptor-enhanced iNOS mRNA expression by gingival epithelial cells. *J Dent Res.* 2002;81(4):236-240.

16. Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K, et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with Porphyromonas gingivalis via toll-like receptor 2. *J Periodontol.* 2004;75(3):370-379.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
18. Chan TM, Young KM, Hutson NJ, Brumley FT, Exton JH. Hepatic metabolism of genetically diabetic (db/db) mice. I. Carbohydrate metabolism. *Am J Physiol.* 1975;229(6):1702-1712.
19. Yu H, Yang J, Zhou X, Xiao Q, Lü Y, Xia L. High glucose induces dysfunction of airway epithelial barrier through down-regulation of connexin 43. *Exp Cell Res.* 2016;342(1):11-19.
20. Okano J, Kojima H, Katagi M, et al. Hyperglycemia Induces Skin Barrier Dysfunctions with Impairment of Epidermal Integrity in Non-Wounded Skin of Type 1 Diabetic Mice. *PLoS One.* 2016;11(11):e0166215.
21. Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, et al. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PLoS One.* 2018;13(8):e0201855.
22. Toropainen E, Ranta VP, Talvitie A, Suhonen P, Urtti A. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(12):2942-2948.
23. Peng J, Zheng H, Wang X, Cheng Z. Upregulation of TLR4 via PKC activation contributes to impaired wound healing in high-glucose-treated kidney proximal tubular cells. *PLoS One.* 2017;12(5): e0178147.
24. Kido R, Hiroshima Y, Kido JI, et al. Advanced glycation end-products increase lipocalin 2 expression in human oral epithelial cells. *J Periodontal Res.* 2020;55(4):539-550.
25. He T, Guan X, Wang S, et al. Resveratrol prevents high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells by inhibiting NADPH oxidase/ROS/ERK pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 402: 13-20.
26. Casanova L, Hughes FJ, Preshaw PM. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *Br Dent J.* 2014;217(8):433-437.

27. Canuto LP, Collares-Buzato CB. Increased osmolality enhances the tight junction-mediated barrier function in a cultured renal epithelial cell line. *Cell Biol Int.* 2019;43(1):73-82.
28. Bao K, Akguel B, Bostanci N. Establishment and characterization of immortalized gingival epithelial and fibroblastic cell lines for the development of organotypic cultures. *Cells Tissues Organs.* 2014;199(4):228-237.
29. Takeuchi H, Sasaki N, Yamaga S, Kuboniwa M, Matsusaki M, Amano A. Porphyromonas gingivalis induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. *PLoS Pathog.* 2019;15(11):e1008124.
30. Rothschild PR, Salah S, Berdugo M, et al. ROCK-1 mediates diabetes-induced retinal pigment epithelial and endothelial cell blebbing: Contribution to diabetic retinopathy. *Sci Rep.* 2017;7(1):8834.
31. Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. *Vascul Pharmacol.* 2011;54(3-6):68-74.
32. Amir J, Waite M, Tobler J, et al. The role of hyperglycemia in mechanisms of exacerbated inflammatory responses within the oral cavity. *Cell Immunol.* 2011;272(1):45-52.
33. Li JH, Wang W, Huang XR, et al. Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. *Am J Pathol.* 2004;164(4):1389-1397.
34. Song HB, Jun HO, Kim JH, Yu YS, Kim KW. Suppression of protein kinase C-ζ attenuates vascular leakage via prevention of tight junction protein decrease in diabetic retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(1):63-68.
35. Jiang QW, Kaili D, Freeman J, et al. Diabetes inhibits corneal epithelial cell migration and tight junction formation in mice and human via increasing ROS and impairing Akt signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2019;40(9):1205-1211.
36. Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS. Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004;78(1):125-136.

37. Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2008;Chapter 5:Unit 5.47.
38. Yamada M, Takahashi N, Matsuda Y, et al. A bacterial metabolite ameliorates periodontal pathogen-induced gingival epithelial barrier disruption via GPR40 signaling. *Sci Rep.* 2018;8(1):9008.
39. Andres SF, Simmons JG, Mah AT, Santoro MA, Van Landeghem L, Lund PK. Insulin receptor isoform switching in intestinal stem cells, progenitors, differentiated lineages and tumors: evidence that IR-B limits proliferation. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 24):5645-5656.
40. Kuroki S, Yokoo S, Terashi H, Hasegawa M, Komori T. Epithelialization in oral mucous wound healing in terms of energy metabolism. *Kobe J Med Sci.* 2009;55(1):E5-E15.
41. Rao SR, Sundaram S, Lavu V. Immuno-localization of glucose transporter 4 in healthy human gingiva. *Indian J Dent Res.* 2012;23(5):565-567.
42. Sakano D, Inoue A, Enomoto T, et al. Insulin2. *Sci Rep.* 2020;10(1):12187.
43. Chen W, Alshaikh A, Kim S, et al. Impairs Oral Epithelial Barrier through Targeting GRHL2. *J Dent Res.* 2019;98(10):1150-1158.
44. Fujita T, Firth JD, Kittaka M, Ekuni D, Kurihara H, Putnins EE. Loss of claudin-1 in lipopolysaccharide-treated periodontal epithelium. *J Periodontal Res.* 2012;47(2):222-227.
45. Abe-Yutori M, Chikazawa T, Shibasaki K, Murakami S. Decreased expression of E-cadherin by Porphyromonas gingivalis-lipopolysaccharide attenuates epithelial barrier function. *J Periodontal Res.* 2017;52(1):42-50.
46. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1111-1119.