

終末糖化産物と LPS が骨芽細胞の PGE₂ 産生に及ぼす影響

富田 景子

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座

(指導: 佐藤秀一 教授, 鈴木直人 教授, 田邊奈津子 准教授)

要旨:

目的: 歯周病は、歯周病原菌の感染と内毒素であるリポ多糖(LPS)が惹起する炎症によって、歯槽骨が吸収される疾患である。終末糖化産物(AGEs)は、生体内では高血糖状態で増加し、糖尿病の発症に関連する。また、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あることが示唆されている。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。

方法: マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞株を播種し、LPS(100 ng/mL)と AGEs(100 μg/mL)を細胞培養液に添加して、最大 14 日間培養した。AGEs の受容体である RAGE、COX-1 および COX-2 の遺伝子発現は real-time PCR 法で、COX-2 のタンパク発現は Western blotting 法で調べた。細胞培養液中の PGE₂ 量は、ELISA 法で調べた。

結果: 骨芽細胞の RAGE と COX-2 の遺伝子発現、COX-2 のタンパク発現および PGE₂ 産生量は、無刺激または LPS 単独刺激に比べて LPS と AGEs の共刺激で増加した。COX-1 は LPS と AGEs の共刺激で変化しなかった。

結論: 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。

キーワード: 終末糖化産物, リポ多糖, シクロオキシゲナーゼ-2, プロスタグランジン E₂

Effects of advanced glycation end products and LPS on PGE₂ production in osteoblasts

Keiko Tomita

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Applied Oral Sciences

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

(Directors : Prof. Shuichi Sato, Prof. Naoto Suzuki, Associate Prof. Natsuko Tanabe)

Abstract: Purpose: Periodontal disease is characterized by alveolar bone resorption with inflammation induced by periodontal pathogens and their endotoxin, lipopolysaccharide (LPS). Advanced glycation end products (AGEs) increase *in vivo* under hyperglycemic conditions and are associated with the development of diabetes. The accumulation of AGEs in diabetes mellitus may be involved in the progression of periodontitis. Therefore, this study aimed to investigate the effects of AGEs stimulation on prostaglandin E₂ (PGE₂), an inflammatory bioactive substance in osteoblasts stimulated by LPS.

Methods: MC3T3-E1 cells, the cell line of osteoblasts derived from the calvarial bone of mice, were seeded and incubated with LPS (100 ng/mL) and AGEs (100 μg/mL) for up to 14 days. The effects of AGEs on the mRNA expression of cyclooxygenase (COX)-1, -2, and RAGE, the receptor of AGEs were examined by real-time PCR. The protein expression of COX-2 was examined by Western blotting and the production of PGE₂ was determined by ELISA.

Results: AGEs increased the mRNA expression of RAGE and COX-2, the protein expression of COX-2, and the production of PGE₂ production in LPS-stimulated osteoblasts.

Conclusion: These results suggested that AGEs may induce alveolar bone resorption by increasing PGE₂ production via COX-2 in osteoblasts stimulated by LPS.

Keywords: advanced glycation end products, lipopolysaccharide, cyclooxygenase-2, prostaglandin E₂

(受付: 令和 4 年 1 月 11 日)

責任著者連絡先: 富田景子

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL : 03-3219-8107

FAX : 03-3219-8349

E-mail : deke18031@gnihon-u.ac.jp

緒 言

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¹⁾。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^{2,3)}。AGEs は生体内に蓄積することが知られており²⁾、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⁴⁾。これらの知見から、糖尿病における AGEs の蓄積は、糖尿病患者における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⁵⁾。また、歯周組織の破壊は、prostaglandin E₂ (PGE₂)によっても進行する^{6,7)}。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⁸⁾、COX のアイソザイムである COX-2 は炎症時に増加する⁸⁾。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。歯周炎患者では歯肉組織の COX-2 の発現と PGE₂ 産生が増加することが報告されている^{6,7)}。また、ラットの歯周炎モデルでは、COX-2 を阻害すると歯槽骨吸収が抑制されることが明らかにされている^{9,10)}。

これまでに、AGEs あるいは 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先行研究で示されている¹¹⁾。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、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 の受容体である receptor of advanced glycation end products(RAGE)と COX-1 および COX-2 の発現、ならびに PGE₂ 産生量を調べた。

材料および方法

1. AGEs の作製

AGEs の作製は先行研究に準じて行った¹²⁾。50 mg/mL ウシ血清アルブミン(富士フィルム和光純薬、大阪)、0.1 M DL-グリセルアルデヒド(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、および 5 mM ジエチレントリアミンペンタメトリック酸(ナカライテスク、京都)を含む 0.2 M リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)を濾過滅菌後、37℃で7日間振盪した。PD-10 カラム(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)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。

2. 細胞培養

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; Hyclone, Logan, UT, USA)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシン B(富士フィルム和光純薬)を添加した α modified Eagle's medium(富士フィルム和光純薬)を細胞培養液として用い、37℃、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, Sigma-Aldrich) および 100 μ g/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。

3. Real-time polymerase chain reaction(real-time PCR)

細胞から RNeasy Mini Kit(QIAGEN, Venlo, Netherlands)を用いて全 RNA を抽出し、分光光度計 NanoDrop 1000(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で RNA 濃度を測定した。Complementary DNA(cDNA)は、500 ng/mL の RNA から Prime Script RT Master Mix(タカラバイオ、草津)を用いて逆転写反応させ作成し、インターカレーター法による real-time PCR を行った¹³⁾。すなわち、表 1 に示すプライマーを含む TB Green Premix EX Taq II(タカラバイオ)溶液 23 μ L に cDNA 溶液 2 μ L を加え、Thermal Cycler Dice Real-Time System(タカラバイオ)を用いて反応させた。反応は、95℃で 5 秒間および 60℃で 30 秒からなるサイクルを 35 回繰り返した。PCR 産物の特異性は、融解曲線分析を Thermal Cycler Dice Real-Time System に付属するソフトウェアで分析・確認した。遺伝子の増幅量を $\Delta\Delta C_T$ 法で求め、ハウスキーピング遺伝子である β -actin の増幅量で補正した。

4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)と Western blotting

培養 14 日目の細胞を回収後、超音波で破碎して得られた細胞溶解液の総タンパク量 20-40 μ g 相当量を SDS-PAGE の試料とした。10%ポリアクリルアミドゲル(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)で電気泳動後、ゲル上のタンパクを PVDF 膜(Bio-Rad Laboratories)に転写した¹⁴⁾。Western blotting では、1 次抗体として抗 COX-2 ウサギ抗体(Cell Signaling Technology,

表 1 プライマーの配列

| Target | Primers |
|----------------|--|
| COX-1 | F 5'-AGGCACTGGTGGATGCCTTC-3' R 5'-AAGGGCTGTAGGCGCATCTC-3' |
| COX-2 | F 5'-GTAGCCAGCAAAGCCTAGAGCAA-3' R 5'-CTACTGAGTACCAGGCCAGCACA-3' |
| RAGE | F 5'-TGAACCTCACAGCCAGTGTCCCTA-3' R 5'-TGCCATCGGGAATCAGAAGT-3' |
| β -actin | F 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3' R 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3' |

Danvers, MA, USA:希釈倍率1:1000)または抗 β -actinマウス抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA:希釈倍率1:500), 2次抗体としてそれぞれビオチン標識のウサギまたはマウス抗体(Thermo Fisher Scientific:希釈倍率1:5000)を用いた。さらに, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液(Sera Care Life Sciences, Milford, MA, USA)を加えた後, ECL prime reagents(GE Healthcare)で発光反応を行い, Chemidoc XRS(Bio-Rad Laboratories)でPVDF膜を撮影した。バンドで示される発現の強さはImage Jソフトウェアで数値化した。なお, COX-2のタンパク発現量は, β -actinのタンパク発現量で補正した。

5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

培養14日目(COX-2)にFBSを含まない細胞培養液に交換し24時間培養後, 培養上清を回収した。PGE₂産生量は, ELISA kit(Cayman CHEMICAL, Ann Arbor, MI, USA)を用いて定量した。

6. 統計学的分析

統計処理は, 結果の正規性をShapiro-Wilkの正規性検定, 等分散をBartlett検定で確認した後, 一元配置分散分析後Tukeyの多重比較を行い, 危険率5%未満を統計学的有意差とした。箱ひげ図は上から最大値, 第3四分位, 第2四分位, 第1四分位および最小値を示す。これらの統計学的分析にはEZRソフトウェア(EZR 1.23: Jichi Medical University Saitama Medical Center)を用いた¹⁵⁾。

成績

1. LPSとAGEsがRAGE, COX-1およびCOX-2の遺伝子発現に及ぼす影響

培養3, 7および14日目のRAGEの遺伝子発現を図1

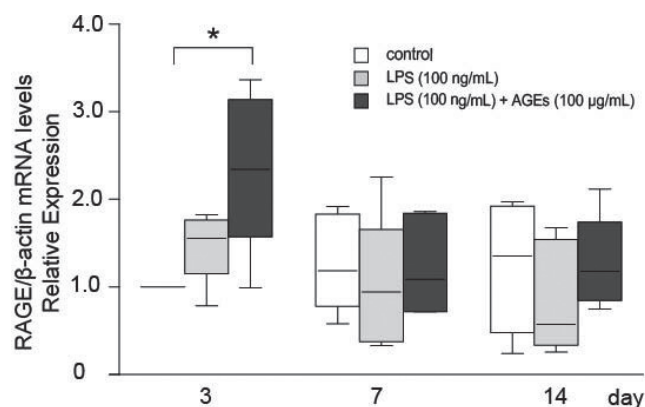


図1 MC3T3-E1細胞のRAGE発現に対するAGEsの影響
培養3, 7および14日目のRAGEの遺伝子発現レベルをreal-time PCR法で調べた。

* $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, (n=5).

に示す。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の遺伝子発現をそれぞれ図2と図3に示す。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。

2. LPSとAGEsがCOX-2のタンパク発現に及ぼす影響

培養14日目のCOX-2のタンパク発現を図4に示す。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。

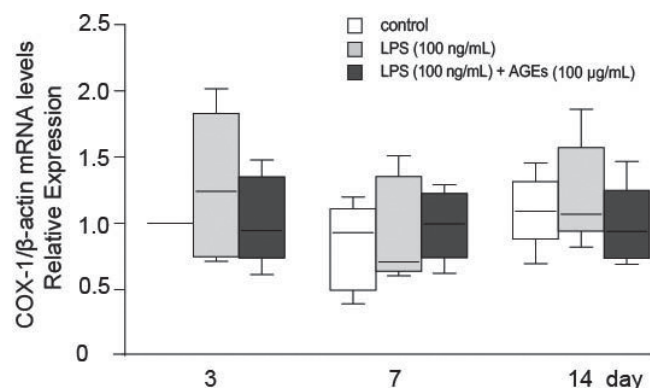


図2 MC3T3-E1細胞のCOX-1発現に対するAGEsの影響
培養3, 7および14日目のCOX-1の遺伝子発現レベルをreal-time PCR法で調べた(n=5)。

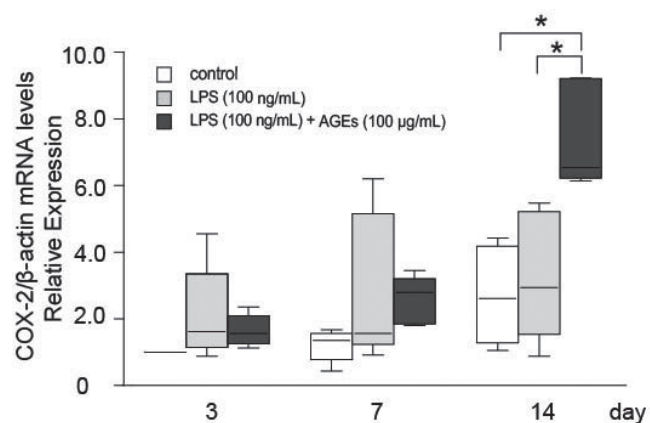


図3 MC3T3-E1細胞のCOX-2発現に対するAGEsの影響
培養3, 7および14日目のCOX-2の遺伝子発現レベルをreal-time PCR法で調べた。

* $P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, (n=5).

3. LPS と AGEs が PGE₂ 産生に及ぼす影響

培養 14 日目の PGE₂ 産生量を図 5 に示す。培養液中の 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。

考 察

本研究では、糖尿病患者で歯周病が増悪する要因として、AGEs と骨芽細胞に着目した。AGEs が骨芽細胞に及ぼす影響については、これまでに主に骨芽細胞の分化と骨形成能について調べられており、酒井¹¹⁾は、MC3T3-E1 細胞を AGEs で刺激すると、骨芽細胞の分化関連因子である Runx2 と Osterix の発現が減少するとともに、骨基質タンパクである osteocalcin 産生と alkaline phosphatase 活性も AGEs によって低下し、石灰化物形成が抑制されることを明らかにしている。また、Sakamoto ら¹⁶⁾は、ラットの骨髄細胞を AGEs と LPS で共刺激すると、それぞれの単独刺激に比べて石灰化物形成が減少する一方で、炎症性サイトカインである interleukin-1 β の遺伝子発現が増加すると報告している。しかし、これら骨芽細胞を用いた先行研究では、骨代謝や炎症に関係するケミカルメディエーターである PGE₂ については報告されていない。

AGEs の刺激は、細胞表面に存在する RAGE と結合し

て細胞内に伝達される¹⁷⁾。過去の報告では、歯周病患者の歯肉に RAGE の発現が認められ、糖尿病を有する歯周病患者では RAGE の発現が高いことが明らかにされている^{18,19)}。また、糖尿病モデルマウスに歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* を感染させた研究では、RAGE の阻害剤によって歯槽骨吸収の抑制が認められている²⁰⁾。さらに、グラム陰性菌体内毒素の LPS が骨芽細胞や線維芽細胞における PGE₂ の産生を誘導すること²¹⁻²³⁾から、本研究では、まず、LPS と AGEs の刺激が、MC3T3-E1 細胞の RAGE と COX の発現に及ぼす影響を調べた。

その結果、MC3T3-E1 細胞は RAGE、COX-1 および COX-2 の遺伝子を発現し、LPS と AGEs の共刺激で RAGE の発現は増加した。また、LPS と AGEs 刺激の影響は、恒常的に発現する COX-1 と炎症時に増加する COX-2 の発現で異なっていた。すなわち、COX-1 の遺伝子発現に LPS と AGEs による刺激の影響を認めず、COX-2 の遺伝子発現も LPS の単独刺激では変化しなかったが、LPS と AGEs の共刺激で増加した。そこで、細胞培養液中の PGE₂ 量を調べた結果、未刺激と LPS 単独刺激に比べて LPS と AGEs の共刺激で PGE₂ の増加が認められた。本研究では、LPS が骨芽細胞の COX-2 発現と PGE₂ 産生に及ぼす影響を調べた先行研究²⁴⁾と同様に *E. coli* 由来の LPS で細胞を刺激したが、その濃度は先行研究の 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ よりも低い 100 ng/mL とした。この先行研究²⁴⁾の知見と本研究結果から、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

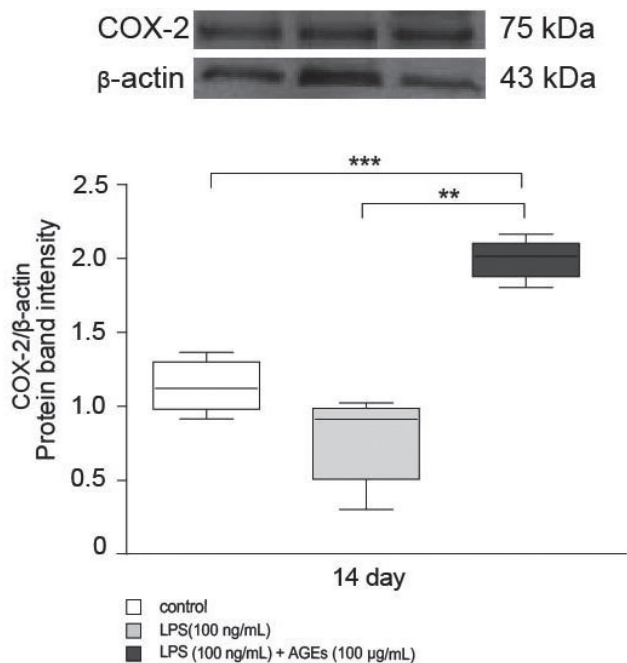


図 4 MC3T3-E1 細胞の COX-2 のタンパク発現に対する AGEs の影響

培養 14 日目の COX-2 のタンパク発現レベルを Western Blotting 法で調べた。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, (n = 5).

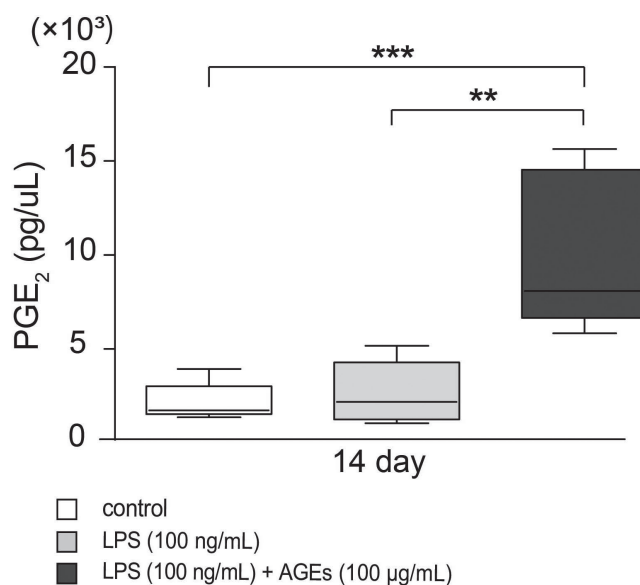


図 5 MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生量に対する AGEs の影響

培養 14 日目の PGE₂ 産生量を ELISA 法で調べた。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test, (n = 5).

を誘導し、PGE₂産生を増強する可能性が示唆された。

PGE₂は、骨代謝に様々な影響を及ぼすことが知られており、ヒトマクロファージ様細胞への直接刺激では破骨細胞の分化を抑制することが報告されている²⁵⁾。一方、PGE₂の刺激を受けた骨芽細胞や歯根膜細胞では、破骨細胞分化促進因子であるreceptor activator of NF-kappa B ligand(RANKL)の産生が増加することから^{26,27)}、PGE₂は、これらの細胞を介して破骨細胞性骨吸収を促進すると考えられている。また、健常者と比較して歯周病罹患者の歯肉溝滲出液中では、RANKLのおとり受容体であるosteoprotegerinに対してRANKLの相対比が高く、プロービングポケットの深さやクリニカルアタッチメントレベルと正の相関が認められている²⁸⁾。これらの知見と本研究の結果から、糖尿病患者で歯周病が悪化する一因に、AGEsによるLPS誘導性のPGE₂産生促進が関与する可能性が示唆された。

結 論

本研究では、AGEsとLPSを加えた細胞培養液でMC3T3-E1細胞を刺激し、RAGE、COX-1およびCOX-2発現、ならびにPGE₂産生に及ぼす影響を検討した。その結果、以下の結論が得られた。

1. AGEsとLPSによる共刺激で、MC3T3-E1細胞のRAGEの発現が増加した。
2. AGEsとLPSは、MC3T3-E1細胞のCOX-1の遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。
3. COX-2発現とPGE₂産生はAGEsとLPSの共刺激で増加した。

以上の結論から、LPSとAGEsは、骨芽細胞の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。

稿を終えるにあたり、本研究遂行に、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座の佐藤秀一教授、生化学講座の鈴木直人教授に謹んで心より感謝申し上げます。また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました本学部生化学講座の田邊奈津子准教授、歯周病学講座の間中総一郎助教を始め、歯周病学講座および生化学講座の皆様へ深く感謝致します。

本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146.
- 2) Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ (2002) Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N-carboxymethyl-lysine and N-(1-carboxyethyl) lysine-modified albumin. *Biochem J* 364, 1-14.
- 3) Vlassara H, Striker GE (2011) AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol* 7, 526-539.
- 4) Schmidt AM, Weidman E, Lalla E, Yan SD, Hori O, Cao R, Brett JG, Lamster IB (1996) Advanced glycation endproducts (AGEs) induce oxidant stress in the gingiva: a potential mechanism underlying accelerated periodontal disease associated with diabetes. *J Periodontol Res* 31, 508-515.
- 5) 石原和幸(2013)6 口腔微生物学と口腔感染症 E 口腔感染症各論 3 歯周病. 口腔微生物学-感染と免疫-. 4版, 石原和幸, 小川知彦, 落合邦康, 葛城啓彰, 上西秀則, 清浦有祐, 小西清司, 柴田幸永, 中澤 太, 浜田信城, 前田伸子編, 学建書院, 東京, 354.
- 6) Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI (2001) Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. *J Periodontol* 72, 461-469.
- 7) Zhang F, Engebretson SP, Morton RS, Cavanaugh PF Jr, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ (2003) The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *J Am Dent Assoc* 134, 861-867.
- 8) 北川昌伸(2010)総論 3 炎症. 標準病理学. 4版, 坂本穆彦, 北川昌伸, 仁木利郎編, 医学書院, 東京, 38.
- 9) Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA (2000) Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 71, 1009-1014.
- 10) Holzhausen M, Spolidorio DM, Muscará MN, Hebling J, Spolidorio LC (2005) Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 40, 208-211.
- 11) 酒井真悠(2021)終末糖化産物は骨芽細胞の骨形成を低下させ、ERK1/2のリン酸化を抑制する. *日大歯学* 95, 53-59.
- 12) Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka K, Notsu M, Ogawa N, Yano S, Sugimoto T (2012) Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis. *Calcif Tissue Int* 91, 286-296.
- 13) Ma L, Xiang L, Ma X, Zhang S, Gong P (2020) Effects of α CGRP on the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblasts cultured on titanium surfaces. *J Hard Tissue Biol* 29, 205-214.
- 14) Torigoe G, Nagao M, Tanabe N, Manaka S, Kariya T, Kawato T, Sekino J, Kato S, Maeno M, Suzuki N, Shimizu N (2017) PYK2 mediates BzATP-induced extracellular matrix proteins synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 494, 663-667.
- 15) Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software "EZ" for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452-458.
- 16) Sakamoto E, Mihara C, Ikuta T, Inagaki Y, Kido J, Nagata T (2016) Inhibitory effects of advanced glycation

- end-products and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the expression of osteoblastic markers of rat bone marrow cells in culture. J Periodontol Res 51, 313-320.
- 17) Nonaka K, Kajiura Y, Bando M, Sakamoto E, Inagaki Y, Lew JH, Naruishi K, Ikuta T, Yoshida K, Kobayashi T, Yoshie H, Nagata T, Kido J (2018) Advanced glycation end-products increase IL-6 and ICAM-1 expression via RAGE, MAPK and NF- κ B pathways in human gingival fibroblasts. J Periodontol Res 53, 334-344.
- 18) Katz J, Bhattacharyya I, Farkhondeh-Kish F, Perez FM, Caudle RM, Heft MW (2005) Expression of the receptor of advanced glycation end products in gingival tissues of type 2 diabetes patients with chronic periodontal disease: a study utilizing immunohistochemistry and RT-PCR. J Clin Periodontol 32, 40-44.
- 19) Rajeev K, Karthika R, Mythili R, Krishnan V, Nirmal M (2011) Role of receptors of advanced glycation end-products (RAGE) in type 2 diabetic and non-diabetic individuals with chronic periodontal disease: an immunohistochemical study. J Investig Clin Dent 2, 287-292.
- 20) Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern D, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. J Clin Invest 105, 1117-1124.
- 21) Nishida E, Hara Y, Kaneko T, Ikeda Y, Ukai T, Kato I (2001) Bone resorption and local interleukin-1 α and interleukin-1 β synthesis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. J Periodontol Res 36, 1-8.
- 22) Chen LL, Yan J (2001) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclasts by inducing IL-1, TNF, and PGE. Acta Pharmacol Sin 22, 614-618.
- 23) 宇田川信之, 小出雅則, 中村美どり, 守安攝子, 吉成伸夫 (2019) 歯周病の免疫学・骨代謝学. 分子リウマチ治療 12, 34-38.
- 24) Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka H, Suzuki N, Takeichi O, Sugaya A, Maeno M (2006) Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E₂ and the receptor Ep4 in osteoblasts. Life Sci 78, 2012-2018.
- 25) Take I, Shima N, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Tsuboi H, Ochi T, Uematsu S, Okafuji N, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N (2005) Prostaglandin E₂ strongly inhibits human osteoclast formation. Endocrinology 146, 5204-5214.
- 26) Nukaga J, Kobayashi M, Shinki T, Song H, Takada T, Takiguchi T, Kamijo R, Hasegawa K (2004) Regulatory effects of interleukin-1 β and prostaglandin E₂ on expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in human periodontal ligament cells. J Periodontol 75, 249-259.
- 27) Mayahara K, Yamaguchi A, Takenouchi H, Kariya T, Taguchi H, Shimizu N (2012) Osteoblasts stimulate osteoclastogenesis via RANKL expression more strongly than periodontal ligament cells do in response to PGE₂. Arch Oral Biol 57, 1377-1384.
- 28) Bostanci N, Ilgenli T, Emingil G, Afacan B, Han B, Toz H, Atilla G, Hughes FJ, Belibasakis GN (2007) Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. J Clin Periodontol 34, 370-376.