

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20625

研究課題名(和文)肥満・歯周病における Apelin 動態とその役割の解明

研究課題名(英文) Identification of a role of apelin in obesity and periodontitis patients

研究代表者

小原 成将 (Obara, Shigeyuki)

九州歯科大学・歯学部・医員

研究者番号：70735878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血清中のapelin濃度は歯周病、肥満を有する歯周病患者において健常者よりもわずかに低い値を示し、歯肉溝滲出液中のapelin濃度は肥満者、肥満を有する歯周病患者において健常者よりも低い値を示した。さらに、J774.1細胞においてapelinは歯周病原細菌Porphyromonas gingivalis由来のLPSによって誘導される炎症性サイトカインの発現を抑制した。

以上より肥満者における歯肉溝滲出液中のapelin濃度の低下は歯周病を悪化させうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：In serum, apelin level were lower in periodontitis group and obesity/periodontitis group than in non-periodontitis group. In gingival crevicular fluid (GCF), apelin level were lower in obesity group and obesity/periodontitis group than non-periodontitis group. Furthermore, pretreatment with apelin decreased Porphyromonas gingivalis LPS-induced expression of inflammatory cytokines in J774.1 cells.

These observations suggest that reduction of apelin level of GCF in obesity patients aggravates periodontitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：apelin GCF adipokine cytokine

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満と歯周病

平成 23 年厚生労働省の歯科疾患実態調査によると、約 80%の人に何らかの病的歯肉所見がみられており、歯周病への罹患が示唆されている。歯周病は歯垢中の歯周病細菌によって引き起こされる慢性炎症疾患で、歯と歯肉の付着の喪失や歯槽骨の吸収を特徴とする。近年、歯周病と全身疾患の関連性を示す疫学研究が数多く報告され、歯周医学 (ペリオドンタルメディシン) という概念が確立された。肥満と歯周病との関連性についても多く研究されている。肥満を有する者 (BMI30 以上肥満度 2 度) は、肥満ではない者 (BMI20 以下) と比較して、8.6 倍歯周病に罹患するリスクが高いという報告 (Saito T *et al.*, *N Engl J Med* 1998 図 1) を皮切りに、肥満が歯周病のリスクファクターであることを示す多くの疫学研究報告がなされてきた (Chaffee BW *et al.*, *J Periodontol* 2010)。

(2) アディポカイン

肥満は先進諸国において深刻な健康課題であり、2 型糖尿病、循環器疾患、メタボリックシンドロームなどを引き起こす (Kopelman PG, *Nature* 2000)。近年では、肥満そのものが軽度の慢性炎症と考えられており、代謝異常に起因する炎症を示す *metaflammation* (metabolically triggered inflammation) という用語も提唱されている (Htamişligil GS, *Nature* 2006)。この炎症を惹起し、疾患を誘発する原因となっているのが、アディポカインである。アディポカインは脂肪組織によって産生され、サイトカイン様の様々な働きをもつ生理活性物質である。アディポカインの中には免疫系に働くものも報告されており、炎症を誘導するものや、逆に炎症を抑制するものがある。前者の代表としては炎症性サイトカインとしても知られている IL-1 や TNF- α が、後者は adiponectin, leptin, apelin が報告されている。肥満から誘発される疾患には、脂肪組織が産生するアディポカインが関与するが、肥満者の歯肉溝滲出液、及び血清中において、アディポカインである TNF- α , leptin 濃度が増加することが報告されている (Gokhale NH *et al.*, *J Periodontol* 2014, Zimmermann GS *et al.*, *J Periodontol* 2013, Lundin M *et al.*, *Acta Odontol Scand* 2004)。しかし、他のアディポカインの歯周組織局所における動態やアディポカインが歯周病発症に及ぼす影響についての詳細なメカニズムは不明である。

(3) アペリン (apelin)

apelin は 1998 年に発見された新規の生理活性物質であり (Tatemoto K *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 1998)、脂肪細胞より産生分泌されるアディポカインの一種である (Boucher J *et al.*, *Endocrinology* 2005)。

apelin は体液バランス、食物摂取、細胞増殖、血圧、血管新生の制御に関わっていることが報告されている (Li F *et al.*, *Front Biosci* 2008, Alexander J *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol* 2007, Ishida J *et al.*, *J Biol Chem* 2004, Lee DK *et al.*, *J Neurochem* 2000)。また、炎症性サイトカインの抑制、炎症に起因する動脈瘤形成の抑制といった報告から抗炎症作用を持つと考えられている (Zhu S. *et al.*, *Mol Cell Biochem* 2011, Leeper NJ *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009)。

(4) これまでの研究成果と着想に至った経緯

LPS (リポ多糖) は歯周病を引き起こす因子の 1 つである。LPS でマクロファージを刺激すると、IL-1, TNF- α などの炎症性サイトカイン産生が上昇することが知られている。研究代表者は、apelin の抗炎症作用に着目し、大腸菌由来 LPS 刺激マクロファージの炎症性サイトカイン産生に対する影響を検討した。apelin は大腸菌由来 LPS 刺激による炎症性サイトカイン発現・産生を有意に抑制することを見出した (Obara S *et al.*, *Modern Research in Inflammation* 2014)。肥満者、糖尿病患者では、血清中の apelin 濃度は増加している (Castan-Laurell I *et al.*, *Euro J Endocrinol* 2008, Li L *et al.*, *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006) ことが報告されており、炎症反応を抑制するための増加である可能性が示唆されるが、歯周病患者、肥満を有する歯周病患者の血清中・歯肉溝滲出液中の apelin の挙動・役割については不明である。

2. 研究の目的

本研究はアディポカインの一種である apelin に着目し、肥満・歯周病病態におけるその役割を明らかにすること、さらに、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS によって誘発される炎症に対する apelin の抗炎症作用を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 歯周病患者・肥満を有する歯周病患者における apelin の役割の解明

被験者

九州歯科大学付属病院を受診した歯周病治療開始前の患者のうち、本研究への同意を得られた者を対象とした。日本歯周病学会の指針により広範診断されたものを歯周病患者群、口腔内に 4 mm 以上の歯周ポケットを有しないものを健常者群とした。さらに BMI 25 以上を肥満あり、25 未満を非肥満として、(a) 非肥満・健常者 (b) 肥満・健常者 (c) 非肥満・歯周病患者 (d) 肥満・歯周病患者の 4 群に分類した。

妊婦・授乳中である者、喫煙者、過去 3 ヶ月以内に抗生剤、消炎剤、免疫抑制剤の服用がある者、重篤な全身疾患 (糖尿病等) に罹

患している者は除外した。

被験者は身長、体重、BMI、腹囲、プロービングポケットデプス(PPD)を計測した。

サンプルの採取

被験者より、血液、歯肉溝滲出液を採取した。歯肉溝滲出液の採取はペリオペーパー[®]を用いて行い、歯肉溝滲出液量はペリオトロン[®]にて測定した。

サイトカイン、アディポカイン濃度の測定
炎症性サイトカインとして IL-1 β 、IL-6、TNF- α を、アディポカインとして apelin, adiponectin, resistin の濃度をそれぞれ ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)にて測定した。

(2)歯周病細菌に LPS により誘発される炎症に対する apelin の機能解析

細胞の培養

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 を最も活性の強い apelin の型である [Pyr1]-apelin-13(10 μ M)で20時間前刺激したのち、*P. gingivalis*由来のLPS(1 μ g/ml)で4,6時間の刺激を行った。その後、細胞と培養上清を採取した。

遺伝子発現の解析

採取した細胞より RNA を回収し、RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)法にて IL-1 β 、IL-6、TNF- α の遺伝子発現を解析した。内部コントロールには GAPDH を使用した。

炎症性サイトカインの解析

採取した培養上清中の IL-1 β 、TNF- α 濃度を ELISA にて測定した。

4. 研究成果

本研究は九州歯科大学倫理委員会において承認を受けた計画に基づき行われた。

(1)被験者

非肥満・健常者(a)群、肥満・健常者(b)群、非肥満・歯周病患者(c)群、肥満・歯周病患者(d)群の検査結果を表1に示す。

表1：4群の検査結果

	a群	b群	c群	d群
人数	3	8	8	3
年齢	28.66 \pm 2.82	30.25 \pm 4.40	68.00 \pm 16.13	68.33 \pm 9.90
BMI	21.65 \pm 1.36	31.46 \pm 4.34	21.15 \pm 1.76	32.68 \pm 9.45
腹囲(cm)	72.67 \pm 5.69	95.43 \pm 11.99	79.60 \pm 8.28	106.57 \pm 21.69
PPD (mm)	1.67 \pm 1.55	3.00 \pm 0.63	5.33 \pm 0.57	5.5 \pm 0.71

(2)血清中のサイトカイン、アディポカインの濃度

4群の血清中の apelin, resistin, adiponectin, IL-1 β 、IL-6、TNF- α の濃度を ELISA にて測定した(図1)。

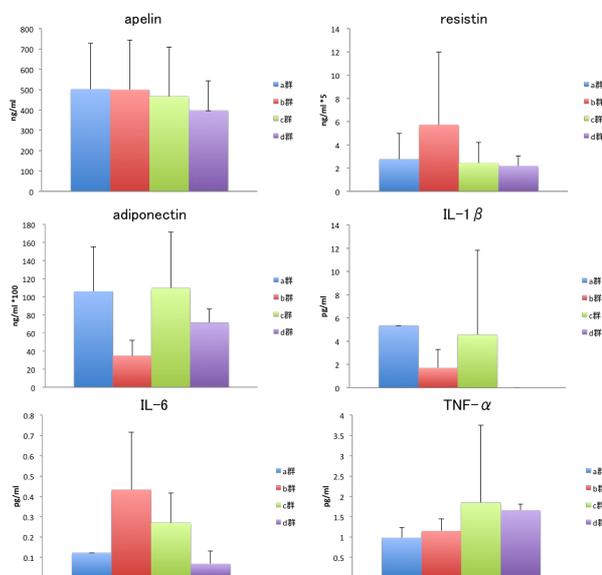


図1 血清中の各種アディポカイン、サイトカインの濃度

血清中の apelin 濃度は d 群でわずかに低い値を示した。IL-1 β において d 群は3名全てが ELISA の検出限界以下であった。resistin, adiponectin, IL-1 β 、IL-6、TNF- α の結果は過去の報告 (Zimmermann GS *et al.*, *J Periodontol* 2013, Cetinkaya B *et al.*, *J Periodontol* 2013, Satpathy A *et al.*, *Obes Res Clin Pract* 2015) とほぼ一致していた。

(3)GCF 中のサイトカイン、アディポカインの濃度

4群の GCF 中の apelin, resistin, adiponectin, IL-1 β 、IL-6、TNF- α の濃度を ELISA にて測定した(図2)。

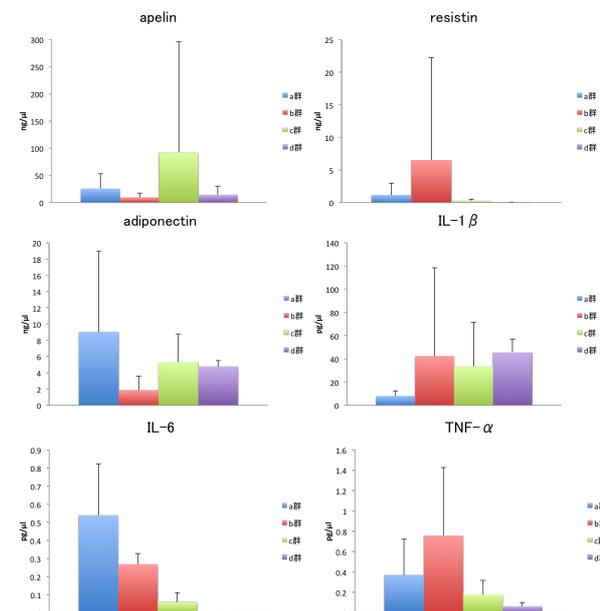


図2 GCF 中の各種アディポカイン、サイトカインの濃度

GCF 中の apelin 濃度は b 群、d 群で a 群よりも低い値を示した。resistin, adiponectin, IL-1, IL-6, TNF- α の結果は過去の報告 (Mod er T *et al.*, *Int J Pediatr Obes* 2011, Zimmermann GS *et al.*, *J Periodontol* 2013, Cetinkaya B *et al.*, *J Periodontol* 2013) と必ずしも一致してはいなかった。これは GCF を採取した歯周ポケットの深さや、採取量の違いによると考えられる。

(4) *P. gingivalis* 由来 LPS の誘導する炎症反応に対する apelin の影響について

J774.1 を apelin にて前刺激後、LPS にて刺激を行い、IL-1 β , TNF- α の遺伝子発現を RT-PCR にて(図 3)、TNF- α のタンパク発現を ELISA にて検証した(図 4)。

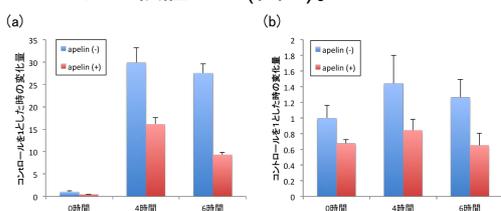


図 3 LPS の誘導する IL-1 (a), TNF- α (b) の発現に対する apelin の影響(LPS の刺激時間は 4 時間、6 時間)

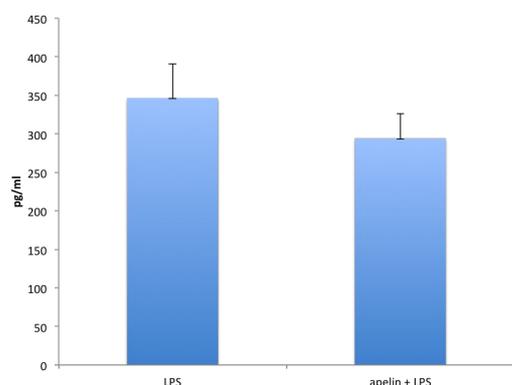


図 4 LPS の誘導する TNF- α のタンパク発現に対する apelin の影響(LPS の刺激時間は 6 時間)

apelin の前刺激によって *P. gingivalis* 由来の LPS が誘導する IL-1 β , TNF- α の遺伝子発現および TNF- α のタンパク発現が抑制された。これにより apelin は *P. gingivalis* 由来の LPS が誘導する炎症反応を抑制することが示唆された。

(5) 肥満・歯周病における apelin の役割

肥満群、肥満・歯周病患者群にて GCF 中の apelin 濃度が減少すること、歯周病原菌 *P. gingivalis* 由来の LPS が誘導する炎症反応を apelin が抑制することが確認された。これにより、肥満者における GCF 中の apelin 濃度の低下は歯周病を悪化させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原成将 (Obara Shigeyuki)

九州歯科大学歯学部歯周病学分野・医員

研究者番号 : 70735878

(4) 研究協力者

中島啓介 (Nakashima Keisuke)

臼井通彦 (Usui Michihiko)

守下昌輝 (Morishita Masaki)

中道郁夫 (Nakamichi Ikuo)

村岡宏祐 (Muraoka Kousuke)