様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2016～2017
課題番号：１６H０７０６７

研究課題名（和文）エピカテキンの抗炎症効果の検証～脂肪組織炎症および実験的歯周炎モデルにおける検討

研究課題名（英文）Study on antiinflammatory effects of epicatechin

研究代表者
佐野　朋美（SANO, TOMOMI）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：５０７８２０７５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,300,000円

研究成果の概要（和文）：エピカテキン（EC）を作用させた共培養系をLPS刺激すると、脂肪細胞からの炎症関連遺伝子発現が有意に抑制された。動物実験においては、ECを摂取したマウスは、高脂肪食負荷による体重・内臓脂肪量増加が抑制され、脂肪径の増大も観察されなかった。また、肝臓および脂肪組織における炎症関連遺伝子発現の抑制が確認され、高脂肪食負荷によるインスリン感受性低下の改善が認められた。さらに、EC含有高脂肪食摂取群では歯肉炎症の抑制もみられた。
以上、ECを作用させることで、肥満やインスリン抵抗性の発症および歯周組織炎症が抑制されることが示された。

研究成果の概要（英文）：Epicatechin (EC) suppressed the expression of many inflammatory genes in the adipocytes co-cultured with endotoxin-stimulated macrophages. Specifically, EC markedly suppressed chemokine (C-C motif) ligand 19 (CCL19) expression. The in vivo study indicated that mice fed the EC-supplemented HFD were protected from diet-induced obesity and insulin resistance. The expression levels of genes associated with inflammation in adipose tissue and in the liver were downregulated in this group of mice.
EC exerts beneficial effects for the prevention of adipose tissue inflammation and insulin resistance. Since the mice deficient in the CCL19 receptor were protected from diet-induced obesity and insulin resistance, the beneficial effects of EC could be mediated, at least in part, by marked suppression of CCL19 expression. Thus, EC may also exert beneficial effects against periodontal inflammation-associated augmentation of cardiovascular risk.

研究分野：医歯薬学

キーワード：炎症　エピカテキン　脂肪組織　歯周組織　肥満　インスリン抵抗性

１．研究開始当初の背景

肥満等が危険因子となって発症する糖尿病は歯周病に対する重要な危険因子として知られる。また、こうして発症・重症化した歯周病が、２型糖尿病の血糖コントロールに影響を与え、さらに虚血性心疾患の進行に関わることも明らかにされつつある。肥満はインスリン抵抗性を基盤として２型糖尿病・動脈硬化性疾患といった代謝性疾患に対する最大の危険因子である。その背景には、内臓脂肪に蓄積した成熟脂肪細胞から産生される一連の生理活性物質（アディポカイン）の分泌異常が深く関わっている。

近年、脂肪細胞からのアディポサイトカイン産生に、マクロファージが関与する脂肪細胞・マクロファージ相互作用説が報告された。これは、脂肪細胞周囲に末梢から遊走・浸潤したマクロファージから産生されるサイトカインが、脂肪細胞からのアディポカイン産生異常を惹起し、２型糖尿病やメタボリックシンドロームの発症・進展を、炎症を介してさらに促進するという説である。さらに脂肪細胞･マクロファージともに TLR-4 を発現し、遊離脂肪酸が TLR-4 のリガンドとして作用することで、一層のアディポカインの産生亢進が起こることが報告されたことから、内臓脂肪肥満と炎症そしてメタボリックシンドロームの関連を強固に説明しうるものとして注目されている。

申請者らのグループは、歯周病による局所の感染が全身に影響を及ぼすほどに増幅される機序を脂肪細胞・マクロファージ相互作用の観点から追及してきた。これまでに、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を確立し、両細胞を低濃度 LPS 刺激した際に発現量が変動する脂肪細胞中遺伝子群の網羅的解析を行い、血管病変やインスリン抵抗性といった２型糖尿病やメタボリックシンドローム関連ケモカイン遺伝子（CCL19）の動態が大きく変化することを報告した（Sano T et al., Obesity., 2015）。一方、ダークココアの経口摂取によって心血管系疾患の発症率が減少するとした大規模疫学研究結果が報告され、その主成分であるエピカテキンによる心血管系疾患の抑制効果が注目されている。軽微な炎症の原因説として脂肪細胞・マクロファージ相互作用説が最も注目されており、したがってエピカテキンの抗炎症作用の作用点として、この脂肪細胞とマクロファージの相互作用が最も疑われる。さらに、エピカテキンは脂肪組織の炎症に CCL19 の発現抑制を介して効果を示す可能性がある。実際、Preliminary な検討において LPS 刺激下脂肪組織・マクロファージの共培養系にエピカテキンを添加すると、脂肪細胞からの CCL19 遺伝子発現が有意に抑制されるということを確認している。以上から、脂肪組織における慢性炎症モデル （in vitro および in vivo）においてエピカテキンを作用させることで、肥満およびインスリン抵抗性が抑制されるとともに、歯周炎予防にも効果があるとの仮説を設け、エピカテキンと脂肪細胞・マクロファージ相互作用・歯周炎発症との関連を検討するという着想に至った。

２．研究の目的

本申請は、局所の感染が全身に影響を及ぼすほどに増幅される機序を阻害する手段を検討し、これまでの研究成果をさらに発展させ、さらには歯周炎の予防効果も明らかにしようとするものである。研究期間内に低濃度 LPS 刺激下脂肪細胞・マクロファージ共培養系にエピカテキンを作用させ、発現量が変動する遺伝子の網羅的解析を行い、タンパクレベルでの検証をふまえ、抗炎症に関わる分子基盤解明に繋げること、およびエピカテキン摂取により肥満・インスリン抵抗性・歯周炎が抑制されることを動物モデルにより検討することを目標とする。

３．研究の方法

“ in vitro 研究 ”

① 脂肪細胞・マクロファージ相互作用にエピカテキンが及ぼす抗炎症作用の機序を検討する。
② エピカテキン添加で LPS による遺伝子発現変化が影響を受けた遺伝子群で形成されるパスウェイを解析する。
③ エピカテキンが発揮する抗炎症作用の作用機序を検討する。

“ in vivo 研究 ”

④ エピカテキンを添加した高脂肪食をマウスに摂取させ、エピカテキンによる肥満およびインスリン抵抗性抑制作用について検討する。
⑤ 実験的歯周炎モデルを用い，エピカテキンの歯周炎の予防効果について検討する。

４．研究成果

エピカテキンを作用させた脂肪細胞とマクロファージの共培養系に LPS を添加した際の炎症関連遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて定量した。エピカテキンを作用させた共培養系を LPS 刺激すると、脂肪細胞からの CCL19、IL-6、RANTES、IP-10 遺伝子発現が有意に抑制された。

次に、マウスにエピカテキン配合した高脂肪食を摂取させ、耐糖能や代謝関連因子の変動について、通常食摂取群および高脂肪食摂取群と比較した。食餌摂取量は 3 群とも差はみられなかった。エピカテキン含有高脂肪食摂取群では、高脂肪食負荷による体重・内臓脂肪量増加が抑制され、脂肪径の増大も観察されなかった。また、脂肪組織における遺伝子発現の検討では、エピカテキン含有高脂肪食摂取群は高脂肪食摂取群と比較し、TNF-α、IL-6、MCP-1、CCL19、CD11c、IP-10 遺伝子の有意な発現抑制がみられた。肝臓における遺伝子発現の検討においても、同様に

エピカテキン含有高脂肪食摂取群は高脂肪食摂取群と比較し、TNF-α、IL-6、MCP-1、CCL19、CD11c、IP-10 遺伝子の有意な発現抑制がみられた。血清生化学マーカーの検討では、エピカテキン含有高脂肪食摂取群は高脂肪食摂取群と比較し、CCL19 の有意な血中濃度低下および adiponectin の有意な血中濃度上昇がみられた。すなわち、エピカテキンを摂取することで、高脂肪食負荷によるインスリン感受性低下の改善が認められた。さらに、寒冷試験でエピカテキン含有高脂肪食摂取群は高脂肪食摂取群と比べ有意に直腸温が高く、脂肪組織において高脂肪食摂取群で確認された CD11c 陽性細胞浸潤がみられなかった。

続いて、歯肉線維芽細胞およびマウス歯周組織における検討として以下を行った。エピカテキンを作用させた歯肉線維芽細胞とマクロファージ様細胞の共培養系に LPS を添加した際の歯肉線維芽細胞からの炎症関連遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて定量し、また培養上清からの TNF-αタンパク発現を ELISA 法にて測定した。LPS 刺激下で共培養した歯肉線維芽細胞とマクロファージをエピカテキンで処理すると、歯肉線維芽細胞からの IL-1β、IL-6 遺伝子発現および TNF-αタンパク発現が有意に抑制された。また、マウスにエピカテキンを配合した高脂肪食を摂取させ、歯周組織炎症について通常食摂取群および高脂肪食摂取群と比較した。高脂肪食を摂取したマウスの歯肉組織において通常食摂取群と比較し、CCL19、TNF-α遺伝子発現が有意に上昇したのに対し、エピカテキン含有高脂肪食を摂取したマウスの歯肉組織ではこれらの遺伝子発現が有意に抑制された。

以上、エピカテキンを作用させることで、肥満やインスリン抵抗性の発症および歯周組織炎症が抑制されることが示された。

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）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

(1) <u>Sano T</u>, Nagayasu S, Suzuki S, Iwashita M, Yamashita A, Shinjo T, Sanui T, Kushiyama A, Kanematsu T, Asano T, Nishimura F. Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 査読有、27 : 249-259, 2017
DOI : 10.1016/j.numecd.2016.11.008

(2) Nishimura F, <u>Sano T</u>, Sanui T., The influence of periodontal burden on metabolic control of diabetes - Myth or reality? From a nutritional perspective -. Current Oral Health Reports. 査読有、4(2) : 59-63, 2017
https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40496-017-0136-0

〔学会発表〕（計 11 件）

(1) 眞田大樹・佐野朋美、エピカテキンは歯肉線維芽細胞–マクロファージ相互作用による過剰な炎症反応を抑制する、日本歯周病学会 60 周年記念京都大会、2017

(2) Sano T. Study on the mechanism of increased energy expenditure of CCR7 deficient mouse. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2017

(3) 佐野朋美、CCR7 欠損マウスにおけるエネルギー消費亢進機序についての検討、第 147 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2017

(4) Sano T. Influences of energy metabolism via CCL19-CCR7 pathway on diet-induced obesity and insulin resistance. The 12th meeting of the Asian Pacific Society of Periodontology. 2017

(5) 佐野朋美、CCL19-CCR7 経路を介したエネルギー代謝機構が肥満およびインスリン抵抗性に及ぼす影響の機序に関する検討、第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会、2017

(6) 佐野朋美、エネルギー代謝機構が CCL19-CCR7 経路を介した肥満およびインスリン抵抗性に及ぼす影響に関する検討、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017

(7) Sano T. Epicatechin Down-regulates Adipose Tissue CCL19 Expression, Thereby Ameliorates Diet-induced Obesity and Insulin Resistance. UNC Perio 2017 EXPO. 2017

(8) Yamashita A.・Sano T. Epicatechin Down-regulates Inflammatory Genes in Adipocytes Co-cultured with Endotoxin-activated Macrophages. The 95th General Session & Exhibition of the IADR. 2017

(9) Sano T. Epicatechin Down-regulates Adipose Tissue CCL19 Expression, Thereby Ameliorates Diet-induced Obesity. The 95th General Session & Exhibition of the IADR. 2017

(10) 佐野朋美、IL-17A は 3T3-L1 脂肪細胞における TNF-α 誘導性 IL-6・CCL20 産生を相乗的に増強する、第 145 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2016

(11) 佐野朋美、エピカテキンは脂肪細胞 - マクロファージ相互作用による過剰な炎症反応を抑制する、第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016

〔図書〕（計１件）
佐野朋美他、インターアクション株式会社、患者さんのエイジングに備える・高齢者への歯周治療と口腔管理、2018、283（38-43）

６．研究組織
(1) **研究代表者**
佐野　朋美(SANO, Tomomi)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：５０７８２０７５