

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17347

研究課題名(和文) 歯周病原細菌感染が糖尿病性心筋障害と選択的オートファジーの関連に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the influence of periodontal pathogen infection on the association between diabetic myocardial disease and selective autophagy

研究代表者

始平堂 由佳 (Shiheido, Yuka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60791853

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)：近年、糖尿病による心筋障害にはオートファジーの抑制も関与していることが指摘されるようになった。我々は以前、歯周病原細菌が感染している心筋では心筋梗塞後の心破裂が頻発しており、その原因はミトコンドリア選択的オートファジー(マイトファジー)が抑制されるためであることを報告した。この成果を発展させ、本研究は糖尿病に歯周病原細菌の感染が併発することによる心筋機能障害の発症機序をオートファジー制御異常という観点から解明することを目的とした。その結果、歯周病原細菌の感染がオートファジー抑制を介して糖尿病性心筋障害を悪化させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、主要な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の感染がオートファジー制御機構を阻害することで、糖尿病による心筋障害をさらに悪化させている可能性が示唆された。このことから、オートファジー制御機構をコントロールすることで、歯周病による糖尿病性心筋障害への影響を抑制できる可能性があることが明らかとなった。

本研究を応用することにより、将来的にはオートファジー制御機構をターゲットとした新規治療法の確立や創薬開発へと発展させることが期待できる。さらに歯周病予防の重要性を唱えるエビデンスに新たな一石を投じることができる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been pointed out that the suppression of autophagy was also involved in myocardial disease due to diabetes. We demonstrated that infection with a periodontal pathogen induced cardiac rupture after myocardial infarction due to the suppression of mitochondrial selective autophagy (mitophagy). The purpose of this study was to elucidate the pathogenesis of myocardial dysfunction due to diabetes and infection of a periodontal pathogen from the viewpoint of autophagy dysregulation. Our results suggested that the infection of a periodontal pathogen may deteriorate myocardial dysfunction due to diabetes through suppression of autophagy.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原細菌 糖尿病性心筋障害 選択的オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患の最も重要な危険因子のひとつである糖尿病の患者数は、本邦においても年々増加の一途をたどっている。厚生労働省が2012年に実施した国民健康・栄養調査によると約950万人が糖尿病に罹患している。そして糖尿病患者における急性心筋梗塞を含む冠動脈疾患の死亡リスクは、非糖尿病患者に比べて有意に高いことが知られている。この原因として、糖尿病患者では急性冠症候群の再発率が高いことや、糖尿病そのものによる心筋障害が合併症としての心不全発症率を高めるためであると考えられている。これまでに糖尿病による心筋障害の原因として、障害を受けたミトコンドリアから漏出する活性酸素種(ROS)の関与が示唆されてきた(Poornima et al. *Circ Res* 2006)。さらに近年、オートファジーの抑制も関与していることが指摘されるようになった。オートファジーは細胞の新陳代謝を担う細胞内分解機構であるが、オートファジーの制御不全が様々な疾患に関与していることが明らかにされつつある。加えて、障害を受けたミトコンドリアがオートファジーによって選択的に分解される機構であるマイトファジーが心筋の機能維持に重要な役割を果たしていることが最近明らかにされた(Shirakabe et al. *Circulation* 2016)。以上より、糖尿病の状態ではマイトファジーが抑制され、ミトコンドリア機能不全が促進することで心筋障害を引き起こしている可能性が考えられる。しかし糖尿病による心筋障害においてマイトファジー制御系が受ける影響についてはほとんど解明されていない。

糖尿病患者では、非糖尿病患者に比べて歯周病の発症率が有意に高いことが知られている(Nelson et al. *Diabetes Care* 1990)。また、歯周病原細菌の特徴である高い細胞親和性は、選択的オートファジーのひとつであり細胞内細菌を分解する機構であるゼノファジーを阻害するシステムを有しているためであることが示唆されている(Dorn et al. *Cell Microbiol* 2002)。その分子機序は十分に解明されていないが、代表的な歯周病原細菌のひとつである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)はオートファゴソームとリソソームとの融合を阻害する機能を有しており、自らが分解を受けるのを回避している可能性が指摘されている(Dorn et al. *Cell Microbiol*. 2002)。さらに申請者は *P.g.*が感染している梗塞心筋ではマイトファジーが抑制されている可能性を指摘してきた(Shiheido et al. *J Mol Cell Cardiol* 2016)。これらの背景より、歯周病原細菌の感染が、マイトファジー制御系に影響をおよぼし、糖尿病による心筋障害を更に悪化させている可能性が考えられる。かかる仮説を敷衍させることにより、申請者はマイトファジー制御系をコントロールすることにより疾患の病態が改善するのではないかと考えるに至った。しかしこれまでに糖尿病や歯周病原細菌の感染がマイトファジー制御系に与える影響についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病に歯周病原細菌の感染が併発することによる心機能障害の発症機序をオートファジー制御異常という観点から解明することである。

3. 研究の方法

(1) 培養心筋細胞にインスリンやマイトファジー誘導剤などを添加し、インスリン過剰状態におけるマイトファジー活性を評価した。また培養心筋細胞に主要な歯周病原細菌のひとつである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)を添加し、歯周病原細菌がオートファジー活性へ与える影響を評価した。

(2) *P.g.*を経口投与により自然発症2型糖尿病マウスモデル(db/dbマウス)に感染させ、過食によりdb/dbマウスに2型糖尿病を発生させたのち、実験的に心筋梗塞の誘導を行った群と、*P.g.*を感染させた野生型マウスに心筋梗塞を誘導した群、db/dbマウスに心筋梗塞を誘導した群、野生型マウスに心筋梗塞を誘導した群を作製し、*P.g.*の感染および糖尿病により心機能が受ける影響について比較・検討を行った。

(3) 疾患モデルマウスより心臓を摘出、ミトコンドリアを抽出し、ウエスタンブロットなどによりマイトファジー関連タンパクの発現解析を行った。

(4) 293細胞や培養心筋細胞に歯周病原細菌を感染させ、共焦点顕微鏡下でのオートファゴソームおよびオートリソソームの検出・定量を行った。

(5) 293細胞や培養心筋細胞に歯周病原細菌を感染させ、オートファゴソームとリソソームとの融合関連分子を解析し、歯周病原細菌の感染によりオートファジーが抑制されるメカニズムを検討した。

なお、本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会に申請を行い、研究計画承認を得たのちに行った。

4. 研究成果

培養心筋細胞を用いた実験において、インスリン過剰状態ではマイトファジー活性が低下している傾向が見られた。また培養心筋細胞に歯周病原細菌を添加すると、オートファジーが阻害される傾向が見られた。

疾患モデルマウスにおいて、糖尿病と歯周病原細菌感染と心筋梗塞の病態が併発することにより、糖尿病のみ、歯周病原細菌感染のみ、心筋梗塞のみの病態と比較して、心機能がさらに悪化する傾向が見られた。

また、293 細胞や培養心筋細胞に歯周病原細菌を感染させた実験において、歯周病原細菌の感染により、オートファゴソームとリソソームの融合が阻害されていることが明らかとなった。さらに歯周病原細菌の病原因子によりオートファゴソームとリソソームの融合関連分子 X が切断され不活化し、オートファジーが抑制されていることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Aoyama N, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Takamura C, Yoshikawa S, Matsuo K, Izumi Y, Isobe M.

Periodontal condition in Japanese coronary heart disease patients - A comparison between coronary and non-coronary heart diseases.

Journal of Periodontal Research. 査読あり

2019 Jun;54(3):259-265.

doi: 10.1111/jre.12626.

Tamura N, Maejima Y, Matsumura T, Vega R. B, Amiya E, Ito Y, Shiheido-Watanabe Y, Ashikaga T, Komuro I, Kelly D. P., Hirao K, Isobe M.

Single-Nucleotide Polymorphism of the MLX Gene Is Associated With Takayasu Arteritis.

Circulation: Genomic and Precision Medicine. 査読あり

2018, Oct;11(10):e002296.

doi: 10.1161/CIRCGEN.118.002296.

Aoyama N, Suzuki J, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Izumi Y, Isobe M.

Increased Oral Porphyromonas gingivalis Prevalence in Cardiovascular Patients with Uncontrolled Diabetes Mellitus.

International Heart Journal. 査読あり

2018 Jul 31;59(4):802-807.

doi: 10.1536/ihj.17-480.

Ito Y, Maejima Y, Tamura N, Shiheido-Watanabe Y, Konishi M, Ashikaga T, Hirao K, Isobe M
Synergistic effects of HMG-CoA reductase inhibitor and angiotensin II receptor blocker on load-induced heart failure.

FEBS Open Bio. 査読あり

2018 Apr 10;8(5):799-816.

doi: 10.1002/2211-5463.12416.

Aoyama N, Suzuki J, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Minabe M, Izumi Y, Isobe M

Japanese Cardiovascular Disease Patients with Diabetes Mellitus Suffer Increased Tooth Loss in Comparison to Those without Diabetes Mellitus -A Cross-sectional Study.

Internal Medicine. 査読あり

2018 Mar 15;57(6):777-782.

doi: 10.2169/internalmedicine.9578-17.

Aoyama N, Suzuki J, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Minabe M, Izumi Y, Isobe Mitsuaki

Associations among tooth loss, systemic inflammation and antibody titers to periodontal pathogens in Japanese patients with cardiovascular disease.

Journal of Periodontal Research. 査読あり

2018 Feb;53(1):117-122.

doi: 10.1111/jre.12494.

Aoyama N, Suzuki J, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro Issei, Minabe M, Izumi Y, Isobe M

Detrimental effects of specific Periodontopathic bacterial infection on tachyarrhythmia compared to Bradyarrhythmia.

BMC Cardiovascular Disorders. 査読あり

2017 Oct 17;17(1):267.

doi: 10.1186/s12872-017-0703-2.

Srisuwantha S, Shiheido Y, Aoyama N, Sato H, Kure K, Laosrisin N, Izumi Y, Suzuki J
Porphyromonas Gingivalis Elevated High-Mobility Group Box 1 Levels After Myocardial Infarction
in Mice.
International Heart Journal. 査読あり
2017 Oct 21;58(5):762-768.
doi: 10.1536/ihj.16-500.

Aoyama N, Suzuki J, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Kumagai
H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro Issei, Izumi Y, Isobe M
Periodontitis deteriorates peripheral arterial disease in Japanese population via enhanced
systemic inflammation.
Heart and Vessels. 査読あり
2017 Nov;32(11):1314-1319.
doi: 10.1007/s00380-017-1003-6.

Aoyama N, Suzuki J, Sato H, Yoshida A, Shiheido Y, Iumi Y
Japanese workers with long leisure time have deteriorated periodontal condition: A crosssectional
study.
Journal of Oral Biosciences. 査読あり
2017 May;59(2):104-107.
doi: 10.1016/j.job.2017.01.002

〔学会発表〕(計 3 件)

田村夏子、前嶋康浩、始平堂由佳、伊藤祐輔、平尾見三、磯部光章
Apolipoprotein A-1 is a Candidate of Novel Biomarkers of Takayasu Arteritis.
第 83 回日本循環器学会学術集会
2018 年

Yasuhiro Maejima, Yuka Shiheido-Watanabe, Natsuko Tamura, Yusuke Ito, Kenzo Hirao, Mitsuaki
Isobe.
Critical role for dipeptidyl peptidase-4 activity in the pathogenesis of experimental autoimmune
myocarditis.
Heart Failure Congress 2018
2018 年

Yasuhiro Maejima, Shun Nakagama, Yuka Shiheido-Watanabe, Yusuke Ito, Natsuko Tamura, Kenzo
Hirao, Mitsuaki Isobe.
SGLT2 inhibitor directly protects oxidative stress-mediated cardiomyocyte injury by suppressing
mitochondrial damagemediated apoptosis.
第 22 回日本心不全学会学術集会
2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。