

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17576

研究課題名（和文）Red Complexのアディポネクチンを介したインスリン抵抗性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of insulin resistance mediated by Red Complex via Adiponectin

研究代表者

田村 好弘（TAMURA, YOSHIHIRO）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30770789

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）： 歯周炎の発症に密接に関連している細菌群とされるRed Complexの口腔細菌における割合（Red Complex比）はIL-1、TNF- α と正の相関を示していた。これはRed Complex比が高いほど、持続性炎症を引き起こしていると考えられる。また、リスクファクターと言われる喫煙や飲酒とも比例しており、これまでの研究を裏付けるものである。

Red Complex比はアディポネクチンとは負の相関を示していた。歯周炎の持続性炎症が抗炎症作用を持つアディポネクチンを低下させることで、インスリン抵抗性に影響を及ぼしていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究は主に糖尿病患者や歯周病患者について行われたものがほとんどであるが、本研究は健康成人に対して行われたことが重要である。健康成人に関して、歯周炎の発症に密接に関連している細菌群とされるRed Complexが抗炎症作用を持つアディポネクチンと負の相関を示したことは、歯周病菌が糖尿病や動脈硬化などの発症に関係していることが改めて示唆された結果となった。

健康成人においてもアディポネクチンが低下することが分かったことで、アクティブエイジングにおける口腔環境の重要性がさらに高まったと考えられる。

研究成果の概要（英文）： The ratio of Red Complex in oral bacteria (Red Complex ratio), which is a group of bacteria closely related to the onset of periodontitis, was positively correlated with IL-1, TNF- α . It is considered that the higher the Red Complex ratio is, the more persistent inflammation is caused. In addition, it is proportional to smoking and drinking, which are called risk factors, and supports previous studies.

Red Complex ratio showed a negative correlation with adiponectin. It is considered that persistent inflammation of periodontitis affects insulin resistance by lowering adiponectin, which has an anti-inflammatory effect.

研究分野：社会系歯学

キーワード：歯周病 Red Complex 糖尿病 アディポネクチン インスリン抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

Beneveniste ら¹⁾や Finestone ら²⁾によって歯周病と糖尿病の関係について報告されて以降、多くの先行研究が歯周病と糖尿病は相互に影響しあっていることを示しているが、メカニズムの解明には至っていない。

しかし、Spranger ら³⁾の報告ではアディポネクチン低下が将来の糖尿病発症の予知マーカーになる事が期待され、また Kumada ら⁴⁾によればアディポネクチン低下が心疾患の発症の予知マーカーとなる可能性が示され、インスリン抵抗性・動脈硬化にアディポネクチンが中心的な役割を担っていることが示唆されている。

2．研究の目的

歯周病原菌による不顕性感染が慢性持続性炎症を引き起こし、炎症性サイトカインを介してアディポネクチン低下を引き起こし、インスリン抵抗性に影響を与えているとの仮説に基づき、健康成人において歯周病がインスリン抵抗性にどのような影響を与えているのかを検討した。

3．研究の方法

2014 年度若木健康増進プロジェクト/プロジェクト健診に参加した一般住民 1,167 名のうち欠損値のある住民や無歯顎者を除いた 1066 人（男性：443、女性：724 名）を対象とし、調査項目として以下の項目を測定した。

（1）背景因子：性別、年齢、喫煙、飲酒、BMI（body mass index）を測定した。対象者には事前に自己記入式の質問用紙を配布し、健診当日に個人面接を行い、回答の確認後に回収した。

（2）歯周病検査：口腔内の診査は歯科医師が人工照明のもと座った状態で診査した。歯周病の有無は CPI を用いて行い歯周ポケットを測定した。4mm 以上のポケットで歯周病ありとした。本研究では 4-5 名の歯科医師が検査を実施するため、健診に先立って診断基準・検査法についてキャリブレーションを施行した。

（3）細菌検査：Red Complex の測定は舌苔を滅菌ミクロスパーテルで一掻き採取し、口腔内細菌を網羅的に検出し、検体から DNA を抽出、16SrRNA 部分を PCR 増幅し、次世代シーケンサーによる DNA 塩基配列を決定し、微生物同定データベース（アポロン DB-BA9.0）を用いて口腔内細菌を特定し、全体細菌数に対する Red Complex 属の口腔細菌に対する比率を算出して解析に用いた。

（4）糖尿病関連因子：糖代謝の指標として血清血糖、HbA1c、インスリン分泌能の指標として C-ペプチド、インスリン抵抗性の指標としてインスリン、HOMA-R、アディポネクチンを測定し、検討に用いた。統計解析は R-2.8.1 を用いて行った。

4．研究成果

（1）男女間の比較

男女間で各因子を比較したところ、pack-year、アルコール摂取量、血清血糖、アディポネクチンは男性が優位に高値であった。その他の年齢、BMI、HbA1c、C-ペプチド、インスリン・HOMA-1 に関しては男女間で有意な差は見られなかった。（表 1）

（2）Red Complex 比について

男女とも口腔細菌に占める Red Complex 属の割合は 0.3-0.35% 程度であった。その中で Porphyromonas 属が約 7 割を占めていた。Red Complex 比及び菌毎に男女について比較したところ、Red Complex 比、Porphyromonas 比、Toreponema 比で男性の方が有意に高く、Tannerella 比に関しては有意差は見られなかった。（表 1）

（3）歯周病の有無、現在喫煙の有無と Red Complex の関係について

男性において歯周病のある群、現在喫煙のある群がそうでない群に比べ有意に Red Complex 比が高かった。女性について有意差は見られなかった（共分散分析）。（表 2）

（4）Red Complex 比と炎症性サイトカインの関係について

男性において Red Complex 比と IL-1 β ・TNF- α との間に有意な正の相関を認めたが、IL-6 との相関は見られなかった。女性について有意差は見られなかった（重回帰分析）。（表 3）

（5）Red Complex 比と糖尿病評価因子の関係について

男性において糖尿病を評価する各因子のうち、アディポネクチンと Red complex の間に有意な負の相関関係がみられたが、その他の因子との間には有意差は認めなかった。女性について全ての項目で有意差は見られなかった。（重回帰分析）。（表 4）

表 1 対象者の特徴	男性 (n=408)	女性 (n=658)	p 値
年齢	53.1±15.5	55.4±15.3	ns
Pack-Year	15.7±2.7	2.2±6.3	0.001*
アルコール量(g)	23.4±24.8	3.9±12.6	0.001*
BMI	23.6±3.2	22.2±3.4	ns
血清血糖 (mg/dL)	83.7±16.3	81.4±14.1	0.010*
HbA1c (NGSP,%)	5.8±0.6	5.7±0.5	ns
C-ペプチド(ng/mL)	0.99±0.33	1.02±0.43	ns
インスリン(μ U/mL)	4.32±2.16	4.87±4.75	ns
HOMA-R	0.92±0.53	1.00±1.04	ns
アディポネクチン(μ g/mL)	11.8±5.8	11.1±5.9	0.009*
Red Complex 比(%)	0.346±0.527	0.324±0.694	0.015*
Porphyromonas 比(%)	0.269±0.433	0.218±0.512	0.003*
Toreponema 比(%)	0.026±0.045	0.021±0.47	0.001*
Tannerella 比(%)	0.079±0.138	0.069±0.139	ns

Mann-Whiteny U 検定 , 平均値±標準偏差 SPSS ver24.0

表 2	男性		女性	
	Red Complex 比	有意確率	Red Complex 比	有意確率
現在喫煙なし	0.33±0.54	0.015*	0.32±0.71	0.889
現在喫煙あり	0.39±0.49		0.38±0.44	
歯周病なし	0.33±0.50	0.012*	0.34±0.73	0.344
歯周病あり	0.70±0.70		0.56±0.66	

共分散分析 (SPSS ver24.0)

従属変数: Red Complex 比 独立変数: 歯周病の有無 現在喫煙の有無

調整因子: 年齢、BMI、アルコール量、Pack-year

表 3 Red Complex 比と炎症性サイトカイン

		β 値	調整済み R2 乗値	有意確率
男性	IL-1β	0.169	0.119	0.003*
	IL-6	-0.019	0.088	0.999
	TNF-α	0.109	0.100	0.025*
女性	IL-1β	-0.013	0.018	0.782
	IL-6	-0.005	0.022	0.903
	TNF-α	0.005	0.022	0.897

重回帰分析 (SPSS ver.24) 従属変数: IL-1β、IL-6、TNF-α

説明変数: Red Complex 比 調整因子: 年齢、BMI、アルコール量、Pack-year

表 4 Red Complex 比と糖尿病評価因子の関係

	β 値		調整済み R2 乗値		有意確率	
	男性	女性	男性	女性	男性	女性
血清血糖	0.044	0.044	0.221	0.178	0.197	0.197
HbA1c	-0.022	0.031	0.171	0.146	0.623	0.371
C-ペプチン	-0.073	-0.053	-0.004	-0.003	0.146	0.159
インスリン	-0.062	-0.063	0.000	0.005	0.218	0.096
HOMA-IR	-0.049	-0.047	0.002	-0.003	0.328	0.215
アディポネクチン	-0.136	-0.043	0.019	0.007	0.006*	0.414

重回帰分析 (SPSS ver.24) 従属変数: 糖尿病評価因子

説明変数: Red Complex 比 調整因子: 年齢、BMI、アルコール量、Pack-year

歯周病と糖尿病については多くの研究がなされているが、多くは糖尿病患者を対象とした介入研究であり、歯周病菌である Red Complex に着目した横断研究はない。従来の研究と同様に介入研究を行う事は大規模健診では不可能であり、そこで本研究では歯周病原菌の中でも特に歯周炎の重症度と関係のあるとされている Red Complex を活動性炎症の指標として使用することで、一般地域住民の口腔環境やインスリン抵抗性に与える影響について検討した。

喫煙は歯周病のリスクファクターであることが報告されている⁵⁾⁶⁾。また、Van der Velden ら⁷⁾によれば喫煙者は歯周治療をしても健常者より多くの歯周病菌が検出されるとの報告があり、今回の研究でも喫煙者は非喫煙者と比較して有意に Red Complex 比が高かった。喫煙は末梢血管を収縮させ、歯周病を増悪させることに加え、Hanioka ら⁸⁾によって喫煙者の歯肉は慢性的に低酸素状態であったという報告がなされており、偏性嫌気性菌である Red Complex の繁殖が非喫煙者に比べ容易であったためこのような結果が出たと推察される。

男性において Red Complex 比と血中の IL-1β、TNF-α の間に有意な相関がみられた。Iwamoto ら⁹⁾によれば 2 型糖尿病患者においてスケーリングと歯周ポケット内の抗菌薬投与によって血中の TNF-α が優位に低下するとともに HbA1c が低下したという報告があり、このことは歯周病細菌が引き起こす持続性炎症が血中の TNF-α 濃度を上昇させることを示している。

今回の結果では口腔細菌中の Red Complex 比と IL-1、TNF-α に相関がみられた。これは Red Complex によって慢性持続性炎症が引き起こされ、IL-1β と TNF-α の過剰産生を引き起こしていると推察できる。IL-1、TNF-α の過剰産生は骨吸収促進・プロスタグランジン合成促進・MMP 産生の亢進を促し、歯槽骨吸収を促し歯周病の悪化を引き起こす。即ち、口腔細菌における Red Complex 比は現在の歯周炎の活動性を示している可能性が高い。

生体においては脂肪細胞が炎症性サイトカインを産生することが分かっている¹⁰⁾¹¹⁾が、今回の研究で調整項目に BMI を加えても、炎症性サイトカインは Red complex に有意に相関していることから脂肪細胞にくわえて歯周炎も原因の 1 つであることが判明した。

その他にも Ando ら¹²⁾によれば、TNF-α はインスリンのシグナル伝達において重要なインスリン受容体基質 (IRS) と相互作用するタンパク質 (GKAP42) を減少させることで、正常なインスリンのシグナル伝達を阻害しインスリン抵抗性を発症させると報告している。

アディポネクチンは肥大した脂肪細胞で過剰産生される TNF-α、レジスチン、遊離脂肪酸などによって抑制されることが分かっており、Red Complex が持続的に産生した TNF-α によってアディポネクチンとの間に負の相関がみられたと思われる。Wei-Lian Sun ら¹³⁾も歯周治療によって TNF-α が減少し、アディポネクチンが改善することを報告している。Hoang Van Tong ら¹⁴⁾は 2 型糖尿病患者における血中の TNF-α 及び IL-1β の濃度とアディポネクチンの血中濃度は反比例することを報告しており、それも今回の結果を裏付けるものと思われる。

IL-1β、TNF-α、アディポネクチンのいずれも男性においてのみ有意差がみられた。女性においてサイトカイン、アディポネクチンともに有意差を認めなかったのは、今回のサンプルで男性は女性に比べ喫煙・飲酒量・Red Complex 比のいずれも女性に比較して有意に高く、男性は女性に比べ炎症性サイトカインがより過剰に産生されるためこのような結果になったと考えられた。今回の結果において Red Complex 比と炎症性サイトカインが正に相関し、アディポネクチンとは負の相関していたことは、Red Complex が炎症性サイトカインを介してアディポネクチンを抑制することがインスリン抵抗性の発現に重要な役割を果たしていると考えられた。

先行研究では歯周病の評価法としてポケット深さ (PPD)、臨床的アタッチメントレベル (CAL)、アタッチメントロス (ALOSS)、プロービング時の出血 (BOP)、細菌培養等が用いられてきたが、

この研究では CPI を用いて行い、ポケット 4mm 以上で歯周病ありと診断した。また、本研究では口腔内の細菌の中から Red Complex 属 (Porphyromonas 属, Tannerella 属, Treponema 属) の割合を算出し、歯周炎の及び持続性炎症の評価として用いた。

大規模な横断研究において、被験者 1 人 1 人について精密な歯周病検査を行うことは難しい。歯周病の評価においても PPD、CAL、ALOSS が同様の値を示していたとしても、適切に治療されている被験者とそうでない被験者を比較するのは困難である。今回のように歯周炎の程度を Red Complex 比で評価してこのような結果が出たことは、歯周病における炎症の活動性の指標として Red Complex 比が使用できる可能性が示唆される。また、歯周炎のスクリーニング検査としての活用が期待される。

リミテーションとして、本研究は横断研究でありメカニズムの解明は不可能であることや、対象群の健康志向が強く、重症な歯周炎に罹患している人が少ないこと、歯周病の評価がポケット深さのみで x-p 撮影がなされていないことが挙げられる。

本研究でインスリン抵抗性に関与するとおもわれる TNF- α 、IL-1 β 、アディポネクチンが健康成人においても歯周病菌と関連していることが判明したことは、インスリン抵抗性につながるメカニズムの解明につながるものと思われる。

今後は、インスリン抵抗性においてアディポネクチンのみならず GKAP42 のような IRS を介したインスリンのシグナル伝達やそのメカニズムに歯周病菌がどのように関連しているかについて更なる研究が必要である。

参考文献

- 1) Beneveniste R, Bixler D, Conneally PM: Periodontal disease in diabetics. *J Periodontol* 38:271-279, 1967
- 2) Finestone AJ, Boorujy SR: Diabetes mellitus and periodontal disease. *Diabetes* 16:336-340, 1967
- 3) Spranger J, et al: Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361(9353):226-228, 2003
- 4) Kumada M, et al: Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 23(1):85-89, 2003
- 5) Tomar SL, Asma S: Smoking-attributable periodontitis in the United States; finding from NHANES III. *J Periodontol* 71:743-751, 2000
- 6) Hyman JJ, Reid BC: Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *J Clin Periodontol* 30:230-237, 2003
- 7) Van der Valden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, et al: Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol* 30:603-610, 2003
- 8) Hanioka T, Tanaka M, Ojima M, Takaya K, Matsumori Y, Shizukui S: Oxygen sufficiency in the gingiva of smokers and non-smokers with periodontal disease. *J Periodontol* 71:1846-1851, 2000
- 9) Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, Makiko H, et al: The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor - α and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 72:774-778, 2001
- 10) Lazar M A: The humoral side of insulin resistance. *Nature Medicine* 12(1):43-44, 2006
- 11) Weisberg S P, et al: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clinical Investigation* 112:1821-1830, 2003
- 12) Yasutoshi Ando, Yusuke Shinozawa, Yumi Iijima, Bu-Chin Yu, Meri Sone, Yuko Ooi, et al: Tumor Necrosis Factor(TNF)- α -induced Repression of GKAP42 Protein Levels through cGMP-dependent Kinase(cGK)- α Causes Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem* 290:5881-5892, 2015
- 13) Wei-Lian Sun, Li-Li Chen, Su-Zhan Zang, Yan-Min Wu, Yue-Zhong Ren, Guang-Ming Qin: Inflammatory Cytokines, Adiponectin, Insulin Resistance and Metabolic Control after Periodontal Intervention in Patients with Type 2 Diabetes and Chronic Periodontitis. *Intern Med* 50:1569-1574, 2011
- 14) Hoang Van Tong, Nguyen Kim Luu, Ho Anh Son, Nguyen Van Hoan, Trinh Thanh Hung, Thirumalaisamy P Velavan, et al: Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 8(3):295-305, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 田村好弘, 小山俊朗, 長内俊之, 佐竹杏奈, 石崎博, 野口貴雄, 福田はるか, 沢田かほり, 徳田系代, 和田啓二, 村上晃満, 西永英司, 中路重之, 井原一成, 小林恒	4. 巻 28巻2号
2. 論文標題 一般地域住民における口腔環境と口臭についての研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 体力栄養免疫学雑誌	6. 最初と最後の頁 64-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田村好弘, 小林恒, 内山千代子他	4. 巻 第27巻第2号
2. 論文標題 口腔環境や生活習慣が唾液の性状に与える影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 体力・栄養・免疫学雑誌	6. 最初と最後の頁 76-78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村好弘, 小山俊朗, 長内俊之, 佐竹杏奈, 石崎博, 野口貴雄, 福田はるか, 沢田かほり, 徳田系代, 和田啓二, 村上晃満, 西永英司, 中路重之, 井原一成, 小林恒	
2. 発表標題 一般地域住民における口腔環境と口臭についての研究	
3. 学会等名 体力栄養免疫学会	
4. 発表年 2018年	

1. 発表者名 田村好弘	
2. 発表標題 口腔と全身に関するコホート研究：岩木健康増進プロジェクト Red Complex比と糖尿病・腎機能との関係	
3. 学会等名 第71回日本口腔科学会学術集会	
4. 発表年 2017年	

1．発表者名 田村好拡
2．発表標題 口腔環境や生活習慣が唾液の性状に与える影響
3．学会等名 第27回体力・栄養・免疫学会
4．発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6．研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----