

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20890143
 研究課題名（和文）
 歯周病とメタボリックシンドロームの関連性に関する基礎ならびに臨床研究
 研究課題名（英文） The basic and clinical study of the relevance of periodontal disease and metabolic syndrome.
 研究代表者
 山下 明子（Akiko Yamashita）
 広島大学・医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：70511319

研究成果の概要（和文）：

マクロファージと脂肪細胞の共培養下に TLR-4 のリガンドである ipopolysaccharide (LPS)刺激を与えた場合の遺伝子発現の違いを解析した。マクロファージとしてマウスマクロファージである RAW264.7 を脂肪細胞としてマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を分化させたものを使用し、トランスウェルシステムを用いて共培養を行った。DNA マイクロアレイの手法を用いて、マクロファージと共培養した脂肪細胞の遺伝子発現を解析した。その結果、LPS 刺激ありでは刺激なしのものと比較して、IL-6, MCP-1, RNATES や CXCL1/KC などの炎症や動脈硬化に関係する遺伝子が高発現することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed genes differentially expressed in adipocytes when co-cultured with macrophages in the presence of a ligand TLR-4, bacterial lipopolysaccharide (LPS). RAW264.7, a murine macrophage cell line and differentiated 3T3-L1 adipocytes were co-cultured using a transwell system. Genes differentially expressed in adipocytes were analyzed by the DNA microarray method. Co-culture of macrophages and adipocytes with a low LPS concentration markedly upregulated gene expressions associated with inflammation and/or angiogenesis, such as those of IL-6, MCP-1, RANTES and CXCL1/KC, in adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：アディポサイトカイン、歯周病、メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

肥満や糖尿病は歯周病に対する重要な危険因子として、そして歯周病は、2型糖尿病の血糖コントロールを妨げ、虚血性心疾患の進行に関わることが知られている。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り、この背景にはアディポサイトカインの分泌異常が深く関わっている。

近年、脂肪組織からのアディポサイトカイン産生に関して、マクロファージと脂肪細胞が相互に作用し、2型糖尿病やメタボリックシンドロームの発症・進展をさらに促進するとことが唱えられた。(Kathryn E *et al.*, *J Clin Invest*, 2003)。申請者は、これまでに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追及してきた。このたび、歯周病由来感染抗原によってマクロファージが活性化され、それら活性化マクロファージが脂肪組織に浸潤すれば、アディポサイトカインの産生に何らかの影響を及ぼしうるとの仮説を設けた。

2. 研究の目的

アディポサイトカインは多種多様であり、マクロファージとの相互作用で様々な分子の産生性に变化があるか否かについては未だ明らかでない。

本申請は、脂肪細胞・マクロファージ共培養系を低濃度の LPS で作用させた場合のサイトカインの産生性の变化を知るため、産生量が著明に増加する分子の解析を検討し、これまでの研究成果をさらに発展させようとするものである。研究期間内に低濃度 LPS により脂肪細胞・マクロファージ共培養系から産生される分子のサイトカインアレイ解析

を行い、それらの分子が生体において疾患活動性マーカーになりうるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 脂肪細胞 (3T3-L1) とマクロファージ (RAW264) を共培養する。
- (2) LPS 無刺激下と刺激下のサイトカインの解析: 共培養した 3T3-L1 と RAW264 細胞から産生されるアディポサイトカインの産生性を市販の抗体アレイキットを用いてスクリーニングを行う。
- (3) タンパクの定量: LPS 刺激下の共培養上清中から産生性の亢進が確認できたサイトカインに関して、市販の測定キットを用いて濃度測定を行う。
- (4) mRNA の測定: LPS 無刺激下、刺激下でそれぞれ共培養を行った細胞の mRNA を回収して、上記で亢進が確認を定量したサイトカインについて、RNA レベルでの確認をリアルタイム PCR にて行う。
- (5) 統計処理: LPS 刺激下および無刺激下のアディポサイトカインの産生性について統計学的に検討し、LPS が脂肪細胞・マクロファージ相互作用に及ぼす影響の程度を調べる。統計処理は市販の統計ソフトを用いて行う。
- (6) DNA マイクロアレイ解析: LPS 刺激開始から 4, 8, 12, そして 24 時間でタイムコースを設定した RAW264.7 と共培養した脂肪細胞の RNA を回収し、刺激

なしとありで比較し、遺伝子発現の解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 共培養した3T3-L1とRAW細胞から産生される、アディポサイトカインの産生性を市販の抗体アレイキット(サイトカインアレイ)を用いてスクリーニングした結果、これらの共培養系を低濃度細菌LPS刺激した際、IL-6およびMCP-1とともに、RANTESとCXCL1/KCの産生性が亢進していることが明らかとなったため、これらサイトカインに焦点を絞った。
- (2) LPS刺激下で共培養した細胞において上清中に産生性の亢進が確認できた上記CXCL1/KC, RANTESに関して、定量的な濃度測定を行った。この濃度測定には市販のELISA測定キットを用いた。ELISA法にて定量したところ、LPS刺激のあるマクロファージ・脂肪細胞共培養系では無刺激の場合よりも、RANTESについては約40倍、CXCL1/KCについては350倍以上に産生が亢進した。
- (3) 慢性炎症時の脂肪組織での経時的な遺伝子発現の変動を検討するため、3T3-L1とRAW264細胞の共培養開始後0, 4, 8, 12, 24時間でRAW細胞と共培養した3T3-L1細胞から総RNAを回収しDNAマイクロアレイの手法を用いて遺伝子発現のスクリーニングを行い、その後、リアルタイムPCR法にて追試を行った。LPS刺激のあるマクロファージ・脂肪細胞共培養系の脂肪細胞では刺激前と比較していずれも4時間後で遺伝子発現のピークを迎えた。そして、同時期のCXCL1/KCは約60倍、RANTESは約30倍、IL-6は約60倍、

そしてMCP-1では約20倍遺伝子発現量が亢進した。K-means comparisonを用いたクラスター解析の結果、主にNF-κB転写因子の支配を大きく受ける炎症や動脈硬化に関係する遺伝子群の顕著な発現亢進が観察された。

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 3件)

- ① Fusanori Nishimura, Yoshihiko Soga, Akiko Yamashita, Periodontal disease: Chronic low-grade inflammation accelerating aging, Inflammation and Regeneration, 29(3), 2009,186-189 (査読有)
- ② 西村英紀, 山下明子, 歯周病と糖尿病, 内分泌・糖尿病科, 28(5), 2009, 366-370 (査読有)
- ③ A Yamashita, Y Soga, Y Iwamoto, T Asano, Y Li, Y Abiko, and F Nishimura, DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW264.7 in the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin, International journal of Obesity, 32, 2008, 1725-729 (査読有)

[学会発表] (計 10件)

- ① 半井英雄, 山下明子 他, マクロファージと共存する脂肪細胞の急性期タンパク産生性はLPS刺激によって増強する, 第52回日本歯周病学会秋季学術大会, 2009. 10. 11, 宮崎市

- ② 山下明子 他, 低濃度LPS刺激条件下の脂肪細胞・マクロファージ共培養系における脂肪細胞の網羅的遺伝子発現解析, 第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2009. 6. 12, 札幌市
- ③ 山下明子 他, マクロファージと共存する脂肪細胞はLPS刺激によって toll-like receptorを介するシグナルを増強する分子群を産生する, 第52回日本糖尿病学会学術大会, 2009. 5. 22, 大阪市
- ④ 熊本園子, 山下明子 他, マクロファージと共存する脂肪細胞はLPS刺激によって toll-like receptorを介するシグナルを増強する分子群を産生する, 第52回日本歯周病学会春季学術大会, 2009. 5. 16, 岡山市
- ⑤ Akiko Yamashita et al, DNA microarray analyses of LPS-stimulated adipocytes co-cultured with macrophages, 87th the International Association for Dental Research, 2009. 4. 4, Miami, U.S.A
- ⑥ 山下明子 他, 脂肪細胞-マクロファージ共培養系をLPS刺激することによって脂肪細胞で発現量が変動する遺伝子群の網羅的解析, 第51回秋季日本歯周病学会学術大会, 2008. 10. 19, 三重県四日市市
- ⑦ 山下明子 他, 歯周炎症がメタボリックシンドロームの病態に及ぼす影響を判定するための検査指標の確立を目指した基礎研究, 第1回日本口腔検査学会総会・学術大会, 2008. 8. 23, 東京都
- ⑧ Akiko Yamashita et al, Cytokine

Profile Produced from LPS-stimulated Macrophage- Adipocyte Co-cultures, 86th The International Association for Dental Research, 2008. 7. 4, tront, Canada

- ⑨ 山下明子 他, 脂肪細胞 - マクロファージ相互作用から捉えた, 肥満症における炎症の増幅機序の解明, 第41回広島大学歯学会総会, 2008. 6. 15, 広島市
- ⑩ 山下明子 他, 低濃度LPSにより脂肪細胞・マクロファージ共培養系から産生される分子のサイトカインアレイ解析, 第51回春季日本歯周病学会学術大会, 2008. 4. 25, さいたま市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 明子 (Akiko Yamashita)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 70511319

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :