

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09959

研究課題名（和文）妊娠性糖尿病に関わる口腔環境因子の検索とそのメカニズムの解明に関する包括的研究

研究課題名（英文）A comprehensive study on the oral environmental factors related to gestational diabetes and their mechanisms.

研究代表者

長谷川 梢（中村梢）（Hasegawa-Nakamura, Kozue）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00404492

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は歯周病が妊娠性糖尿病に関わるメカニズムの解明を目的とした。In vitro研究では、FnLPS刺激は、胎盤由来細胞のJEG3細胞では炎症性物質の発現に影響しなかったが、BeWo細胞の炎症性物質の遺伝子発現を上昇させ、さらにインスリンを添加することで、FnLPS刺激で上昇した炎症性物質の遺伝子発現がさらに上昇した。マウスを用いたIn vivo研究で、歯周病原細菌の投与により胎盤に好中球が増加することが明らかになった。これらのことから、歯周病原細菌は胎盤にて炎症反応を引き起こし、それによりインスリン抵抗性に影響を及ぼすことで、妊娠性糖尿病の発症・悪化に関わる可能性を示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られる知見から、歯周病妊娠性糖尿病の関わるメカニズムの一部を示唆することができた。このことは、口腔内環境の悪化が妊娠性糖尿病のリスク因子となる可能性だけでなく、口腔内環境の改善が妊娠性糖尿病の発症・悪化リスクの低減につながる、可能性があることを示唆できる。また、本研究で得られるエビデンスを基に社会的啓蒙活動を行うことで、口腔内環境の維持管理の重要性が広く認識され、多くの女性の妊娠前からの歯科受診につながる事が予想され、妊娠・出産のリスクの低減だけでなく、女性自身さらには生まれてくる子供の口腔内環境の改善につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the mechanism by which periodontal disease is involved in gestational diabetes. In vitro study, the stimulation by Fn LPS did not affect the gene expression of inflammatory mediators in placenta-derived JEG3 cells. In BeWo cells, the stimulation of Fn LPS increased the gene expression of inflammatory mediators, and the gene expressions of those increased by FnLPS stimulation were further increased by the addition of insulin. In vivo study using mice, it was revealed that number of neutrophils in the placenta of mice injected by periodontal pathogenic bacteria increased compared to that in control mice. These results suggest the possibility that periodontal pathogenic bacteria cause an inflammatory response in the placenta, which affects insulin resistance, and may be involved in the onset and worsening of gestational diabetes.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 妊娠性糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年日本では、女性の社会進出、晩婚化、医療の発達等により、高齢妊娠・出産が増えつつあり、それに伴い妊娠・出産に関する様々な問題が増加している。その1つに産科疾患である妊娠性糖尿病がある。妊娠性糖尿病とは、妊娠中に初めて発見された糖代謝異常である。妊娠性糖尿病の母胎の高血糖状態は、母胎だけでなく胎児にも様々な合併症を引き起こすだけでなく、妊娠性糖尿病発症妊婦は出産後の糖尿病発症リスクが高いことも明らかになっている。妊娠中は、胎盤から産生される様々なホルモンによりインスリン抵抗性が亢進し、それに伴う血糖値の上昇が起こることにより、胎児の成長に必要なエネルギーが補われる。正常妊娠では、その血糖値の上昇に対し膵臓でのインスリンの分泌が亢進し血糖値が維持されるが、膵臓でのインスリンの分泌の亢進が不十分だと、妊娠性糖尿病が発症するとされている。近年、妊娠性糖尿病の胎盤のインスリン抵抗性のさらなる亢進が、全身や局所で産生された炎症性物質により引き起こされる可能性が示唆され (Wedekind L et.al. J Diabetes Complications. 1393-400. 2016)、in vivo 研究で、抗炎症作用をもつ物質の投与により妊娠性糖尿病の病態が改善したことも報告されるなど (Nguyen-Ngo C ら、Mol Nutr Food Res. 63(19):e1900224. 2019)、全身や局所の炎症が妊娠性糖尿病の発症や悪化に関わる可能性が明らかにされている。

慢性炎症疾患である歯周病は糖尿病と双方向の関連があることが明らかになっている。歯周病が糖尿病に関与するメカニズムについては、歯周病の炎症が脂肪細胞などのインスリン抵抗性を惹起することで糖尿病の発症や悪化に関与する可能性が報告されている (Demmer ら、Diabetes Care 35. 2235-42, 2012)。そのため、妊娠性糖尿病においても、胎盤でのインスリン抵抗性のさらなる亢進は、歯周炎による炎症性物質や、口腔内から胎盤へ伝播した口腔内細菌による胎盤の炎症により引き起こされる可能性があると考えられる。

歯周病と妊娠性糖尿病の関連は 2006 年頃から報告されており、我々も日本において糖代謝異常を伴う妊婦の胎盤に *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *T. forsythia* が検出されたことを報告し、胎盤に存在するそれらの歯周病原細菌が糖代謝異常と関連する可能性を報告した。2019 年には Han らから、妊娠性糖尿病の妊婦の口腔細菌検出率と口腔細菌数は、非糖尿病妊婦よりも高いことが報告された (Han ら、Medicine, 98: e14903, 2019)。しかしながら、この分野の研究報告数は少なく、歯周病と妊娠性糖尿病の関連性や、そのメカニズム全てを明確にできておらず、いまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究は、妊娠性糖尿病の発症・悪化に関わる口腔内原因因子の検索とそのメカニズムの解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) in vitro 研究

JEG3 細胞 (ECACC92120300; KAC) を  $2.1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、または BeWo 細胞 (RCB3678; RIKEN BRC) を  $1.1 \times 10^2$  cells/cm<sup>2</sup> で細胞を播種し 24 時間後 5% FBS 含有の培地にて 12 時間培養した。その後、*E. coli* LPS、または *F. nucleatum* LPS にて 24 時間刺激した後、細胞を回収した。

BeWo 細胞 (RCB3678; RIKEN BRC) を  $1.1 \times 10^2$  cells/cm<sup>2</sup> で細胞を播種し 24 時間後 5% FBS 含有の培地にて 12 時間培養した。その後、*F. nucleatum* LPS にて 24 時間刺激した後、インスリン 100nM を添加し 30 分、12 時間後に、細胞を回収し分析した。

Total RNA は ISOGEN を用いて採取し、cDNA は Super-Script III First-strand Synthesis

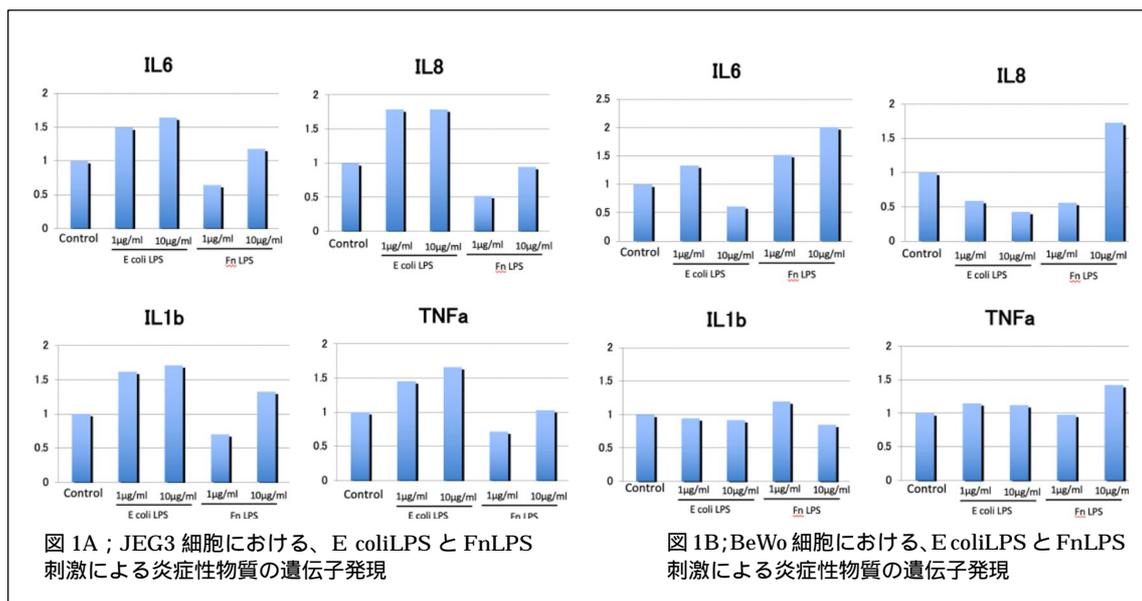
Super Mix を用いて作製した。IL-6、IL-8、TNF-a、IL-1b、GAPDH について、Real-time PCR にて Quanti-Tect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN)を用いて調べた。

## 2) in vivo 研究

本研究は鹿児島大学動物実験倫理審査の承認を得て行われた(D13013、D14024、D16021)。10-13 週齢の妊娠 ICR マウス 32 匹を用いた。雌のマウスは雄の ICR マウスと一晩同じケージで交配させ、翌朝膣に出血が認められたマウスを妊娠マウスとし、その日を妊娠 1 日目 (GD1) とした。歯周病細菌として *P. gingivalis* ATCC33277 と *F. nucleatum* ATCC10953 を用いた。106CFU *P. gingivalis* (Pg) または、106CFU *F. nucleatum* (Fn) または、106CFU の Pg と Fn の混合 (PgFn)、または PBS (Control) を 100  $\mu$ L 尾静脈から投与した。投与期間は、妊娠 8 日目から 10 日目 (ControlGD8-10 (n=4)、PgGD8-10 (n=4)、FnGD8-10 (n=4)、PgFnGD8-10 (N=4))、あるいは妊娠 13 日目から 15 日目の 3 日間 (ContGD8-10 (n=4)、PgGD13-15 (n=4)、FnGD13-15 (n=4)、PgFnGD13-15 (n=4))、1 日 1 回投与した。マウスは妊娠 8 日目に安楽死させ、胎児、胎盤、血液を採取した。胎盤を組織分析用に採取しホルマリン固定後 Tissue-Tek Optimal Cutting compound に浸漬し、-80 度で保存した。保存した胎盤のヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 H-E) 染色と免疫組織学的染色を行うために、5-7  $\mu$ m 厚の切片を作製した。H-E 染色は通報に従い行った。免疫組織学的染色では、1 次抗体として、好中球のマーカーとして Ly-6B.2 Alloantigen Rat MCA771GA 希釈率 1:500)、Rat IgG2b, kappa monoclonal [RTK4530] - Isotype control (ab18541) abcam (希釈率 1:250) を用い、シンプルステインマウス MAXPO(R) (ニチレイバイオサイエンス) と DAB 基質キット (ニチレイバイオサイエンス) を用いた。ヘマトキシリンで対比染色した後観察を行った。

## 4 . 研究成果

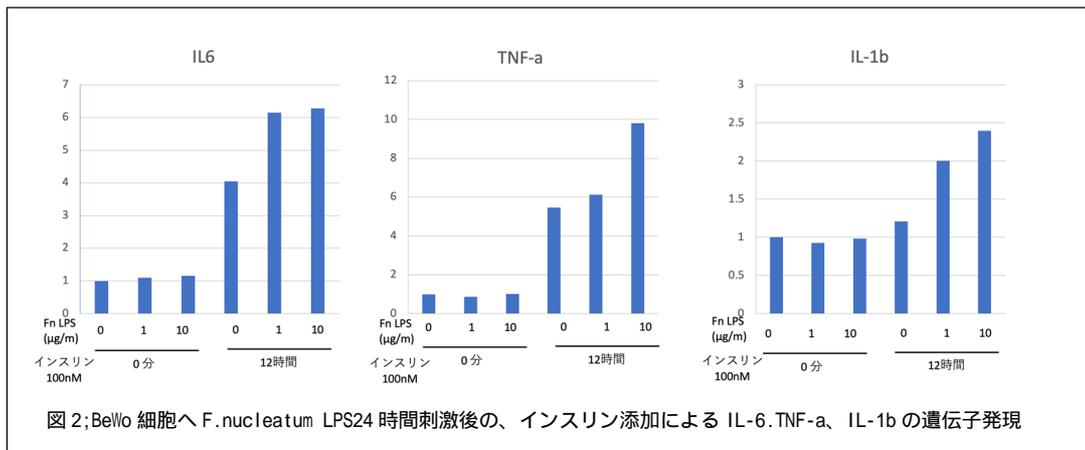
1) 図 1A に JEG3 細胞における、図 1B に BEWO 細胞における、E coli LPS と Fn LPS 刺激による、炎症性物質の遺伝子発現を示す。



JEG3 細胞では、E coli LPS での刺激で IL-6、IL-8、IL-1b、TNF-a の遺伝子発現が上昇したが、Fn LPS 刺激では変化が認められなかった。BeWo 細胞では、E coli LPS 刺激では、IL-6、IL-8、IL-1b、TNF-a の遺伝子発現は変化しなかったが、Fn LPS 刺激では IL-6、IL-8、TNF-a の遺伝子発現が上昇した。これらの結果より、Fn LPS は BeWo 細胞の炎症性物質の遺伝子発現を上昇させることが明らかになった。

2) 図 2 に BeWo 細胞へ *F. nucleatum* LPS24 時間刺激後の、インスリン添加による IL-6、TNF-a、

IL-1bの遺伝子発現を示す。インスリン添加12時間後で顕著に、F.nucleatum LPSの濃度依存的にIL-6、TNF-a、IL-1bの遺伝子発現が増加した。インスリンの作用時間の増加とともに、IL-6、TNF-a、IL-1bの遺伝子発現が増加した。



3) 図3AにDG8-10細菌投与群の、図3BにDG13-15細菌投与群の、H&E染色像とLY-6B.2抗体を用いた免疫組織染色組織像を示す。マウスの胎盤の形態観察では、胎盤の形態は胎盤の形態は各群間に差は認められなかった。マウスの胎盤におけるLY-6B.2(好中球)の発現は迷宮層に認められ、細菌投与群はGD8-10投与、GD13-15投与ともに胎盤の迷宮層のcLY-6B.2の発現が広い範囲で認められた。

図4AにDG8-10細菌投与群の、図4BにDG13-15細菌投与群の、計測範囲でのLY-6B.2陽性細胞の個数の比較を示す。LY-6B.2染色数の分析では、GD8-10投与群の中では、Fn投与群とFnとPg投与群で有意に発現が上昇していた。GD13-15投与群の胎盤では、細菌投与群は、コントロール群と比較し、有意にLY-6B.2陽性細胞の個数が上昇していた。

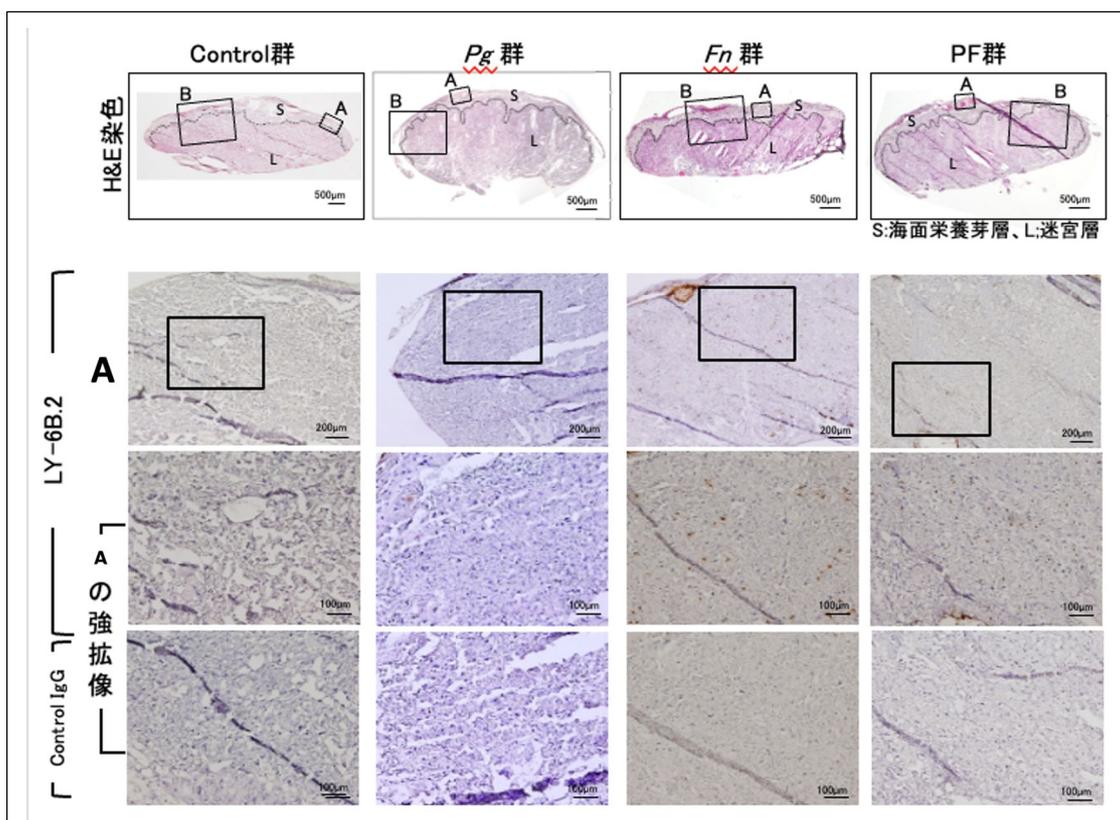


図3; 3A DG8-10細菌投与群の、H&E染色像とLY-6B.2抗体を用いた免疫組織染色組織像

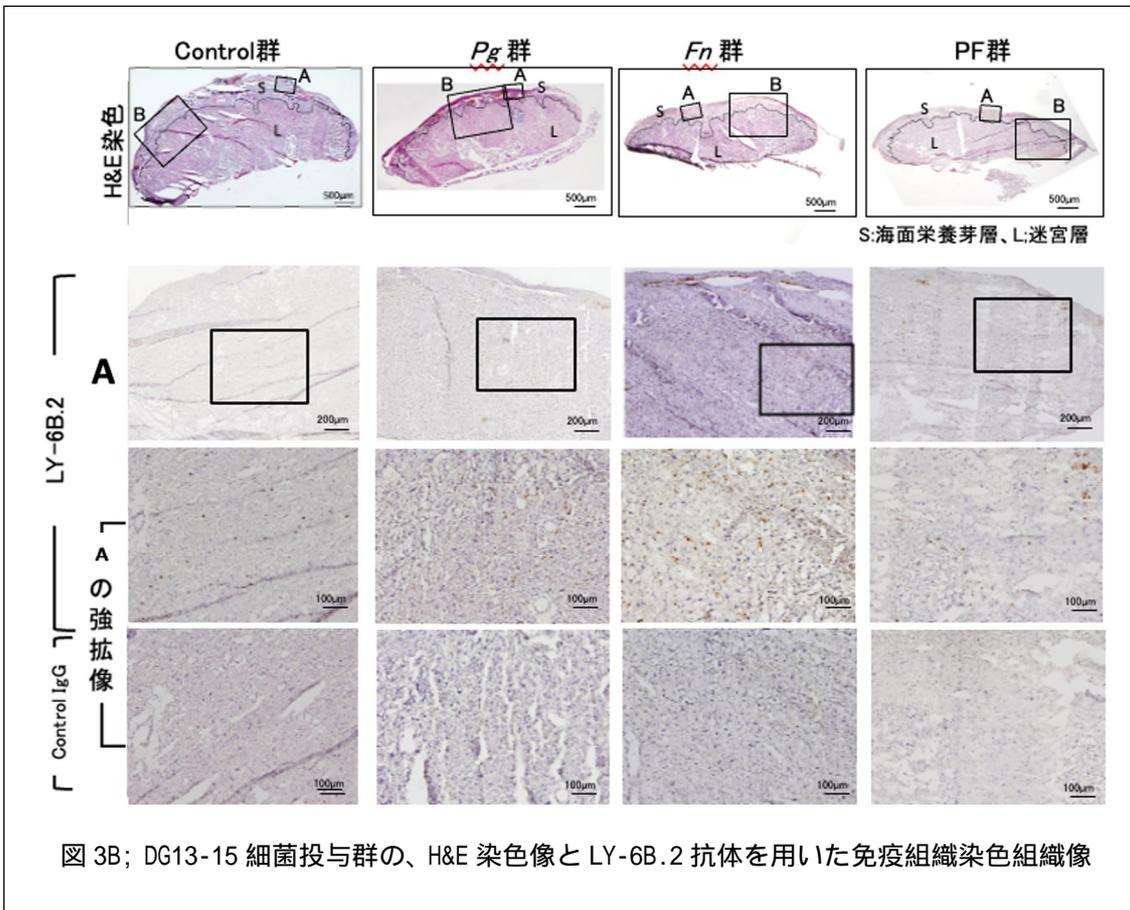


図 3B; DG13-15 細菌投与群の、H&E 染色像と LY-6B.2 抗体を用いた免疫組織染色組織像

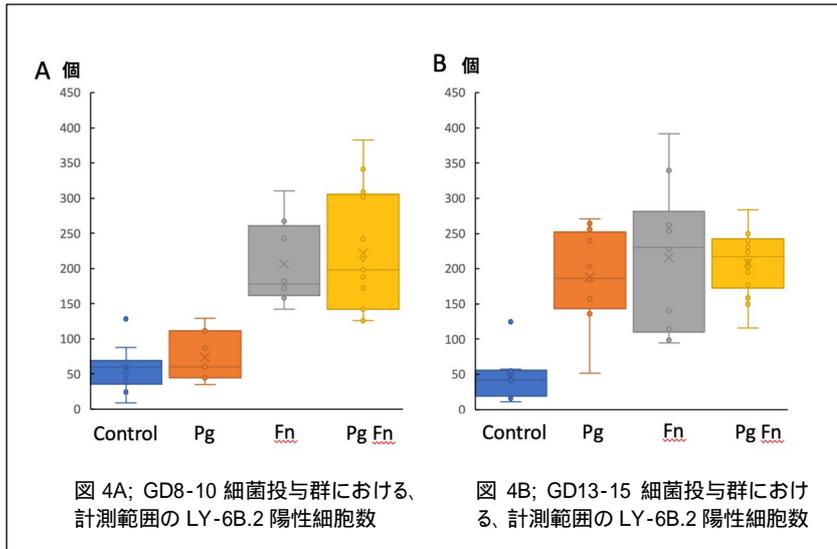


図 4A; GD8-10 細菌投与群における、計測範囲の LY-6B.2 陽性細胞数

図 4B; GD13-15 細菌投与群における、計測範囲の LY-6B.2 陽性細胞数

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 1件）

1. 著者名 Kato S, Nagasawa T, Uehara O, Shimizu S, Sugiyama N, Hasegawa-Nakamura K, Noguchi K, Hatae M, Kakinoki H, Furuichi Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Increase in Bifidobacterium is a characteristic of the difference in the salivary microbiota of pregnant and non-pregnant women.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Oral Health.	6. 最初と最後の頁 260-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-022-02293-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yukari EBE, Toshiaki NAKAMURA, Kozue HASEGAWA-NAKAMURA, and Kazuyuki NOGUCHI	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of interleukin-1 on bone morphogenetic protein-9- induced osteoblastic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 -
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山のどか, 加藤幸紀, 植原 治, 清水伸太郎, 長澤敏行, 中村 梢, 野口 和行, 波多江 正紀, 柿木 博成, 池畑 奈美, 上塘 正人, 古市 保志
2. 発表標題 妊婦の口腔内状況と女性ホルモンとの関連性について
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村梢, 町頭三保, 中村利明, 野口和行
2. 発表標題 妊娠マウスへの歯周病原細菌の投与が妊娠/出産へ与える影響
3. 学会等名 日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部・合同研修会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村梢、町頭三保、中村利明、野口和行
2. 発表標題 歯周病原細菌が妊娠マウスの胎児・胎盤に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村梢、町頭三保、中村利明、野口和行
2. 発表標題 妊娠マウスへの Porphyromonas gingivalis /Fusobacterium nucleatum 投与が 妊娠・出産へ与える影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会第 1 5 2 回
4. 発表年 2021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
研究分担者	橋口 千琴 (Hashiguchi Chikoto)  (10596860)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (17701)	
研究分担者	中村 利明 (Nakamura Toshiaki)  (60381183)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師  (17701)	
研究分担者	野口 和行 (Noguchi Kazuyuki)  (90218298)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授  (17701)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------