

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10298

研究課題名(和文) 歯周病が脂肪肝の発症に及ぼす影響の疫学・細胞生物学研究による解明

研究課題名(英文) The effects of periodontal disease on hepatic steatosis -an epidemiological and cell biological study-

研究代表者

川戸 貴行 (KAWATO, Takayuki)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：50386075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本疫学研究では、歯周ポケットの保有と腹部超音波検査での脂肪肝の所見との間に関連性を認めたが、歯周病から脂肪肝への方向性の因果関係は確認されなかった。一方、アルコールの摂取習慣がない又は頻度が少なく脂肪肝があると、肝臓の線維化指標FIB-4値が1.3以上であるオッズ比が、歯周ポケットなしに比べてありで高かった。細胞生物学研究では、培地へのグルコース添加で肝細胞内の脂肪滴は増加したが、LPS刺激はこれに影響しなかった。また、肝星細胞のI型コラーゲン発現はLPS刺激で増加した。これらの知見から、メタボリックシンドロームによる脂肪肝から肝臓の線維化への進行リスクを歯周病が高める可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝は、動脈硬化性疾患のリスクを高めるメタボリックシンドローム(メタボ)の肝臓での表現型である。脂肪肝が炎症や線維化を伴う状態になると、肝硬変や肝癌など予後不良のリスクが高まる。一方、歯周病は歯の喪失原因となるだけでなく、軽微な慢性炎症として全身に影響しており、インスリンの作用を阻害するなどメタボや糖尿病にも影響すると考えられている。本疫学研究と基礎研究で明らかとなった歯周病と肝臓の線維化指標との関連性や、肝臓の線維化を誘因する肝星細胞の活性化に及ぼす歯周病原菌のLPSの影響は、歯科保健指導による歯周病予防が、メタボや脂肪肝対策にも有効である可能性を示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this epidemiological study, the cross-sectional analyses revealed the association between periodontal disease and hepatic steatosis. However, the longitudinal analyses could not find a causal relationship. The association between periodontal disease and the index of liver fibrogenesis was observed in the hepatic steatosis group without chronic alcohol drinking. In cell biological studies, the effects of LPS derived from the periodontal pathogen on the hepatic cells and hepatic stellate cells was examined. Increased glucose concentration in the cell culture medium induced the accumulation of lipid droplets in hepatic cells, but LPS stimulation did not affect it. The expression of type I collagen in hepatic stellate cells was increased by LPS stimulation.

These findings indicated that periodontal diseases might increase the risk of liver fibrogenesis.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：メタボリックシンドローム 脂肪肝 歯周病 線維化

1. 研究開始当初の背景

アルコールの摂取に起因せず肝臓への脂肪蓄積が進行する非アルコール性脂肪肝は、メタボリックシンドローム(メタボ)の肝臓での表現型とされている。脂肪肝は、肝臓細胞の脂肪蓄積のみから炎症や線維化を伴う状態に移行すると、肝硬変や肝癌など予後不良のリスクが高まることが知られている。非アルコール性脂肪肝のリスク因子は、糖や脂質の慢性的な摂取過剰などの食事的な要因、運動不足、ストレスなどがあげられる。一方、歯周病は歯周病原菌の感染と宿主の炎症反応によって歯周組織が破壊されることから歯の喪失の原因となり、食生活に影響を与える。さらに、歯周病は、軽微な慢性炎症として全身に影響すると考えられており、メタボや糖尿病においても、歯周病が持つ慢性炎症の側面が影響すると考えられている。

これまでに研究代表者は、歯周病の罹患を表す歯周ポケットの保有とメタボ関連指標(BMI、血糖値、収縮期血圧、血中脂質)との関連性を検討し、非メタボであっても歯周ポケットの保有が続くと、メタボ指標が陽性化することを疫学研究で明らかにしている。さらに、歯周病患者の血中で増加することが知られる炎症性サイトカインで脂肪細胞を刺激すると、脂肪組織の増加に関係する血管新生因子の発現が上昇することを明らかにしている。

2. 研究の目的

これらの背景のもと本研究では、歯周病はメタボリックシンドローム関連指標の陽性化だけでなく、肝臓における脂肪の蓄積や肝臓の線維化にも影響するのではないかと仮説を立て、疫学研究によって、歯周ポケットの保有と脂肪肝ならびに肝臓の線維化指標との関連性を調べた。また、細胞生物学研究では、歯周病原菌の内毒素(LPS)が血流を介して肝臓に作用することを想定し、LPSが肝臓細胞の脂肪滴形成に及ぼす影響を検討した。さらに、肝臓の線維化に関する肝星細胞の活性化に及ぼすLPSの影響についても調べることにした。

3. 研究の方法

(1) 疫学研究

本研究では、某事業所で実施された定期健康診断(定期健診)ならびに歯科健康診断(歯科健診)の結果を用いた。歯周病と脂肪肝・肝臓の線維化指標との関連性に関する分析では、2008年と2012年の定期健診・歯科健診の受診者、歯科保健指導がメタボ関連指標に及ぼす影響に関する分析では、2012年と2013年に定期健診と歯科健診を受診し、それぞれ本研究の参加の同意が得られた者を対象とした。

腹部超音波検査所見にて、肝・腎コントラストの上昇、高エコー、脈管不明瞭、深部減衰のうち3つ以上の該当で脂肪肝ありとした。歯周病はCommunity Periodontal Index(CPI)による歯周組織検査によってプロービング深さ4mmで歯周ポケットあり(歯周病)とした。脂肪肝の線維化指標は年齢と血液検査値により算出されるFIB-4値が1.3以上で陽性とした。メタボ関連指標では、肥満はBMI25以上、高血圧は収縮期血圧が130mmHg以上、脂質異常は血中のトリグリセリドが150mg/dL以上またはHDLコレステロールが40mg/dL以下、高血糖は空腹時血糖値110mg/dL以上を陽性とした。生活習慣(歯みがき回数、喫煙習慣、朝食の摂取、運動習慣)については質問調査票への回答結果を用いた。

(2) 細胞生物学研究

本研究では、肝臓細胞としてHepG2細胞を、肝星細胞としてLx2細胞を用いた。細胞を培養プレートに播種後、グルコース、飽和脂肪酸(パルミジン酸)、大腸菌または歯周病原菌由来LPSを含む培地で培養した。HepG2細胞内の脂肪滴形成はOil-Red-O染色で調べた。遺伝子発現はreal-time PCR法で、タンパク発現はELISA法またはWestern blotting法で調べた。

4. 研究成果

(1) 歯周病と脂肪肝との関連性の検討-1(腹部超音波検査所見による検討)

2012年の健診結果を用いた横断的分析では、データに欠損の無い1,497名(男性1,211名、女性286名、平均年齢50.4歳)のうち、脂肪肝ありは507名であり、脂肪肝ありのオッズ比(年齢、性別、肥満の有無、高血圧、生活習慣の回答状況で調整)は、歯周ポケットなしに対してありで1.39と統計学的に有意($p < 0.05$)に高かった。この横断研究の結果を踏まえ、2008年と2012年の両方で定期健診と歯科健診を受診している者で2008年の時点で脂肪肝なしの者663名(男性518名、女性145名、平均年齢47.3歳)を縦断的に分析した。その結果、2012年に脂肪肝ありとなったものは133名で、脂肪肝ありのオッズ比(横断的分析と同様に調整)は、歯周ポケットなしに対してありで1.44と高かったものの統計学的な有意差は認められなかった。すなわち、歯周病と脂肪肝の間には関連性を認めたものの、歯周病から脂肪肝への方向性での因果関係を推定するには至らなかった。

(2) 歯周病と脂肪肝との関連性の検討-② 腹部超音波検査所見と肝臓の線維化指標による検討)
 対象者を 脂肪肝所見なしで FIB-4 値 1.3 未満, 脂肪肝所見ありで FIB-4 値 1.3 未満, 脂肪肝所見ありで FIB-4 値 1.3 以上, 脂肪肝所見なしで FIB-4 値 1.3 以上に分類し, 歯周ポケットの保有状況との関連性を調べた。FIB-4 値 1.3 未満の と かなる群では, 歯周病の有無による脂肪肝ありのオッズ比に有意差は認められなかったが, 脂肪肝の所見ありの と かなる群では, FIB-4 陽性 (1.3 以上) のオッズ比は歯周ポケット無しに比べてありで有意に高かった (表 1)。

表1 脂肪肝ありのグループにおける歯周ポケットと線維化指標の関連性

歯周ポケット	FIB-4陽性のオッズ比
なし	1
4~6 mm	1.04
6 mm以上	2.47*

* $p < 0.05$

さらに, 脂肪肝の所見ありの と かなる群を飲酒習慣別にサブグループ化した所, 飲酒習慣なしと飲酒習慣が週3日以下において, 歯周ポケットの有無による FIB-4 値 1.3 以上のオッズ比に有意差が認められた (表 2)。以上の結果から, 飲酒習慣のない又は頻度が少なく脂肪肝となった者では, 歯周病が肝臓の線維化のリスクを高める可能性が考えられた。

表2 脂肪肝ありのグループにおける飲酒習慣別にみた歯周ポケットと線維化指標の関連性

飲酒習慣	歯周ポケット	FIB-4陽性のオッズ比
なし	なし	1
なし	4~6 mm	3.73
	6 mm以上	6.92*
	なし	1
週2, 3回	4~6 mm	1.41
	6 mm以上	6.57*
	なし	1
週4, 5回	4~6 mm	0.46
	6 mm以上	1.50
	なし	1
毎日	4~6 mm	0.67
	6 mm以上	1.14

* $p < 0.05$

(3) 歯科保健指導がメタボ関連指標に及ぼす影響の検討

メタボ関連指標が 2 項目以上該当する歯周病保有者で歯間ブラシの使用に重点を置いた歯科保健指導 (山崎ら, 口腔衛生会誌 61) を受けたグループでは, 指導前に比べて指導後の歯周ポケット深さと検査後の歯肉からの出血の割合, 腹囲および収縮期血圧が有意に減少した。また, 歯科保健指導を受けていないグループに比べてこれを受けたグループでは, 指導後の収縮期血圧が有意に低下していた (表 3)。なお, その他のメタボ関連指標には歯科保健指導による影響は認められなかった。本結果から, 歯科保健指導はメタボ状態の改善に寄与する可能性が考えられた。

表3 歯科保健指導がメタボ指標に及ぼす影響

検査指標	歯科保健指導	ベースライン	1年後	群間比較
BMI (kg/m ²)	あり	25.4 ± 2.9	25.0 ± 3.0	0.188
	なし	25.8 ± 3.1	25.8 ± 3.7	
腹囲 (cm)	あり	88.4 ± 6.3	86.8 ± 6.3	0.161
	なし	88.5 ± 8.2	88.2 ± 8.4	
収縮期血圧 (mgHg)	あり	133.5 ± 10.1	129.8 ± 9.7	0.045*
	なし	135.8 ± 13.3	139.8 ± 16.4	
HDLコレステロール	あり	52.5 ± 13.8	53.9 ± 15.2	0.301
	なし	54.7 ± 12.8	53.1 ± 11.7	
トリグリセリド値 (mg/dL)	あり	188.6 ± 143.3	184.5 ± 117.9	0.158
	なし	188.2 ± 122.5	237.8 ± 209.4	
空腹時血糖 (mg/dL)	あり	107.3 ± 16.7	106.8 ± 15.7	0.801
	なし	105.0 ± 19.1	106.0 ± 21.0	

* $p < 0.05$

(4) 歯周病原菌由来の LPS 刺激が肝細胞の脂肪滴形成に及ぼす影響

HepG2 細胞内の脂肪滴形成は、培地へのグルコース添加で増加することが確認されたが、LPS による刺激の有無による脂肪滴形成の違いは認められなかった(図1)。

また、HepG2 細胞において脂肪滴形成の促進因子 diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT)-2 と perilipin 2 の発現を確認したが、これらの因子の発現に LPS 刺激の影響は認められなかった。これらの結果から、歯周病由来 LPS の刺激は糖過剰状態における肝細胞内の脂肪滴形成に影響しないと考えられた。

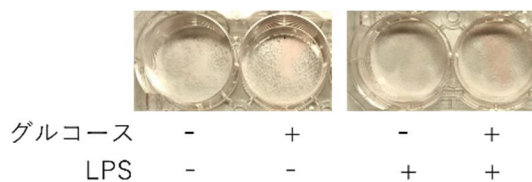


図1 HepG2細胞の脂肪滴形成に及ぼすグルコースとLPSの影響

(5) 歯周病原菌由来の LPS 刺激が肝星細胞の活性化に及ぼす影響

LX-2 細胞の α -SMA と I 型コラーゲンの発現は、LPS の刺激によって飽和脂肪酸の存在下と非存在下の両条件で増加した。 α -SMA は筋線維芽細胞のマーカー、I 型コラーゲンは肝臓の主要な細胞外基質タンパクであり、これらの発現増加は肝星細胞の活性化を示すものである。肝星細胞における α -SMA と I 型コラーゲンの発現は TGF- β 1 によって誘導されることが知られている。そこで、TGF- β 1 発現を調べたところ、LPS 刺激による増加が認められた。一方、 α -SMA と同様に筋線維芽細胞様に活性化した肝星細胞で増加する MMP-2 の発現については、LPS 刺激による影響を認めなかった。MMP-2 は、肝星細胞の細胞外基質タンパク産生を誘導することが知られている。すなわち、歯周病原菌由来の LPS 刺激を受けた肝星細胞による I 型コラーゲン発現増加は、MMP-2 ではなく TGF- β 1 を介する可能性が考えられた。また、本研究では、I 型コラーゲンを分解する MMP-1 の発現は、飽和脂肪酸存在下での LPS 刺激で減少した。これらの結果から、飽和脂肪酸レベルが高い状況での歯周病原菌の LPS の曝露は、肝星細胞の筋線維芽細胞様の活性化を誘導し、活性化した肝星細胞における I 型コラーゲンの発現増加とコラーゲナーゼの発現低下によって、肝臓の線維化リスクが高まる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Yamazaki Y, Morita T, Nakai K, Konishi Y, Goto A, Yamamoto T, Seto M, Ozaki M, Tanaka H, Maeno M, Kawato T	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of dental health intervention on cardiovascular metabolic risk: a pilot study of Japanese Adults	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Hypertension	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） 10.1038/s41371-021-00551-2	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 川戸貴行	4. 巻 110
2. 論文標題 歯周病とメタボリックシンドローム・肥満	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 診断と治療	6. 最初と最後の頁 1145-1149
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 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田十誉子、山崎洋治、山本高司、中井久美子、田中秀樹、尾崎愛美、川戸貴行
2. 発表標題 成人男性における歯周病と脂肪肝およびその線維化との関連性
3. 学会等名 第71回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2022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	森田 十誉子 (Morita Toyoko) (00597247)	公益財団法人ライオン歯科衛生研究所（研究部研究開発室）・研究部研究開発室・主任研究員 (82681)	

6. 研究組織（つづき）

	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	尾崎 愛美 (Ozaki Manami) (10867930)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	
研究分担者	中井 久美子 (Nakai Kumiko) (50736725)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	
研究分担者	山本 高司 (Yamamoto Koji) (60868529)	公益財団法人ライオン歯科衛生研究所（研究部研究開発室）・研究部研究開発室・研究員 (82681)	
研究分担者	田中 秀樹 (Tanaka Hideki) (90434076)	日本大学・歯学部・准教授 (32665)	

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