

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18527

研究課題名(和文) 歯周病が骨格筋の糖代謝異常に与える影響と関連遺伝子の探索

研究課題名(英文) The effect of periodontitis on glucose metabolism in skeletal muscles

研究代表者

佐々木 直樹 (Sasaki, Naoki)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：40848305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドローム(MS)患者において、歯周病原細菌であるPorphyromonas gingivalis (Pg)に対する抗体価は、骨格筋の脂肪化マーカーであるintramuscular adipose tissue content (IMAC)と正の相関を示すことを明らかにした。高脂肪食(HF)を与えたC57BL/6JマウスにPgを経口投与したところ、耐糖能異常、インスリン抵抗性が惹起され、IMACの増加が認められ、遅筋では脂肪化の亢進、糖の取り込みの減少が認められた。Pgの感染は腸内細菌叢を変化させ、骨格筋の代謝異常を引き起こしMSのリスクファクターとなってい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

この研究成果は、Porphyromonas gingivalisの感染が骨格筋の代謝異常を引き起こし、メタボリックシンドロームのリスクファクターとなっている可能性、およびサルコペニアへとつながる可能性を示すものです。サルコペニアは筋肉量の低下を主体とし、機能的低下をも含む概念ですが、動作の俊敏性が失われ転倒しやすくなる身体的問題に直結します。本研究により歯周病のさらなる危険性が注意喚起され、健康寿命の延伸へとつながることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscles have a high metabolic capacity, which play key roles in glucose metabolism. Although periodontal disease increases the risk of metabolic syndrome, the relationship between periodontal bacterial infection and skeletal muscle metabolic dysfunction is unclear. We found that anti-Porphyromonas gingivalis (Pg) antibody titers positively correlated with intramuscular adipose tissue content (IMAC) in metabolic syndrome patients. In C57BL/6J mice fed a high-fat diet, recipients of oral Pg (HFPg) had impaired glucose tolerance, insulin resistance, and higher IMAC compared to recipients of saline (HFco). The soleus muscle in HFPg mice exhibited fat infiltration and lower glucose uptake with higher Tnfa expression and lower insulin signaling than in HFco mice. Our findings suggest that infection with Pg is a risk factor for metabolic syndrome and skeletal muscle metabolic dysfunction via gut microbiome alteration.

研究分野：口腔科学

キーワード：歯周病 骨格筋 糖代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動や姿勢の維持といった機能だけでなく、栄養バランス、体温コントロール、また内分泌やエネルギー代謝、インスリンに依存した糖取り込みにも関与している組織であり、糖代謝に関して重要な役割を担っている。一方でインスリン抵抗性の増悪はメタボリックシンドローム (MS) の病態悪化に大きく寄与していると考えられており、MS は肥満や 2 型糖尿病のリスクファクターとなっていることが知られている。

歯周病は口腔内の病原細菌による歯槽骨や結合組織の破壊を伴う疾患である。歯周病原細菌はデンタルプラーク中に存在し、リポ多糖や線毛、酵素により炎症を引き起こすことが知られている。MS と歯周病の関連は既に報告されており、歯周病は肥満、糖尿病、そして MS を増悪させることが知られている。しかしながら、歯周病原細菌感染と糖代謝において重要な役割を担う骨格筋の代謝異常との関連に関しては未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では歯周病と MS の関係を明らかとすることを目的とした。我々は MS 患者における歯周病原細菌に対する血清抗体価を調査し、また、マウスモデルで歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の経口投与が糖代謝、腸内細菌叢にどのような影響を与えるか検討した。加えて Pg の経口投与が骨格筋における脂肪化・糖取り込みへどのような影響を与えるか検討することとした。

3. 研究の方法

本研究は佐賀大学倫理審査委員会・東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会及び動物実験委員会の承認の上行われた (佐賀大学倫理審査委員会承認番号: 2018-12-13、東京医科歯科大学倫理審査委員会承認番号: D2019-001、東京医科歯科大学動物実験承認番号: A2019-084C2)。MS 患者 35 名より末梢血を採取し、ELISA 法により歯周病原細菌 3 菌種 (Pg ATCC 33277, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718, *Fusobacterium nucleatum*) に対する血清中の IgG 抗体価を測定した。また、8 週齢雄 C57BL/6J マウスに HF を与え、108 CFU の超音波破碎した Pg (HFPg) または生理食塩水 (HFco) を週 2 日経口投与した。6 週後に 6 時間絶食後の経口糖負荷試験、インスリン負荷試験、マイクロ CT を用いた骨格筋の脂肪化の評価を行った。その後安楽殺を行い、速筋である前脛骨筋及び遅筋であるヒラメ筋において Oil red O 染色を用いた組織学的評価、筋組織中のトリグリセライド・グリコーゲンの定量、インスリンシグナルの評価を行なった。また、骨格筋の Total RNA を抽出、逆転写後、mRNA の発現を qPCR 法にて解析した。加えて、マイクロアレイ解析を行い、得られた遺伝子発現を GSEA にて評価した。TNF- α の C2C12 への糖取り込みに与える影響を検討し、また 6 週目に採取した便から 16S rRNA 遺伝子を抽出し、腸内細菌叢解析を行った。

4. 研究成果

MS 患者では血清中の Pg に対する IgG 抗体価と、空腹時血糖、HOMA-1R 及び IMAC に有意な正の相関が認められた。マウス実験では、HFPg では HFco と比較し 6 週後の時点で耐糖能異常・インスリン抵抗性が認められ、IMAC が上昇し、骨格筋量を示す指標である skeletal muscle area index (SAI) の減少が認められた。またトリグリセライドはヒラメ筋でのみ HFPg において有意に高い値を示していたが、グリコーゲンには両筋組織で有意差は認められなかった。筋組織の組織学的評価では HFPg のヒラメ筋において脂肪化が認められた。HFPg では HFco と比較して、遅筋であるヒラメ筋では有意に糖取り込みが阻害されたが、速筋である前脛骨筋では有意差は認められなかった。さらにウエスタンブロッティングを行なったところ HFPg のヒラメ筋、前脛骨筋の両組織でリン酸化 Akt の割合が低下しており、インスリンシグナルの阻害が認められた。また mRNA の発現を qPCR 法で定量したところ、HFPg では HFco と比較して Tnfa や Il6, Ccl2 等の炎症・免疫関連因子の上昇が認められた。

ヒラメ筋でのマイクロアレイ解析では HFco と HFPg の間で 114 個の発現変動遺伝子 (DEGs) が得られたが、前脛骨筋においてはわずか 1 つの DEGs しか得られなかった。ヒラメ筋の GSEA では TNF signaling via NF- κ B や Inflammatory response 等の炎症関連遺伝子群の上昇が HFPg において認められた。また C2C12 において TNF- α による濃度依存的な糖取り込みの阻害が認められた。腸内細菌叢解析では HFPg では HFco と比較して *Turicibacter* 属の減少が認められ、また細菌同士の相関関係を示したネットワーク構造においては 1 つのネットワークに関わる細菌種の減少が認められた。

今回 MS 患者の血清を用い歯周病原細菌 3 菌種に対する血清抗体価を測定したところ、IMAC と有意な相関を示したのは Pg に対する血清抗体価のみであった。そこで MS の危険因子として Pg に焦点を当てることとした。

今回の研究では Pg の投与により遅筋であるヒラメ筋でのみ糖の取り込みが阻害された。骨格筋を構成する筋線維は遅筋線維 (type I) と速筋線維 (type IIa, type IIx/d, type IIb) に分類

されるが、ヒラメ筋は主に type I 線維で構成されているのに対し、前脛骨筋は主に type II 線維で構成されている。我々は過去にマウスを用いて腰筋の筋線維が HF の投与により type I 線維から type II 線維へ変化することを報告した (Hua N et al., 2017)。ヒラメ筋では HF により type I 線維から type II 線維へ変化が起こっている可能性があり、糖の取り込みがヒラメ筋と前脛骨筋で異なる傾向を示しているのはこの筋線維のタイプの違いが影響している可能性がある。加えて、遅筋と速筋は外的な障害に対する炎症反応が異なることが知られており、Pg 投与による遺伝子発現がヒラメ筋と前脛骨筋で大きく異なっていたのはこのような筋線維の特徴が影響していると考えられる。

インスリン刺激による Akt のリン酸化は糖の取り込みを促進することが知られている。本研究では、Pg の投与によりヒラメ筋と前脛骨筋においてリン酸化 Akt の有意な減少が認められた。しかしながら、糖取り込みの阻害はヒラメ筋でのみ観察された。前脛骨筋では Pg の投与は糖の取り込みに影響を与えていなかったが、Glut1 と Glut4 の mRNA 発現が上昇しており、リン酸化 Akt の減少による代償的变化により実際の糖取り込みが影響を受けていない可能性が考えられる。また「選択的インスリン抵抗性」仮説では、糖尿病によって引き起こされるグルコース及び炎症性サイトカインの上昇レベルは、IRS / PI3K / Akt 経路を介してインスリンの作用を選択的に阻害するが Grb / Shc / MAPK 経路は阻害しないことが示されている。ヒラメ筋では Erk のリン酸化が Pg 投与により亢進していたが、これは実際の糖取り込みの減少を代償的に補填するための変化と考えられる。

興味深いことに、腸内細菌叢解析では Pg の投与により *Turicibacter* 属が減少し、細菌同士の相関関係を示したネットワーク構造では、一つのネットワークに関わる細菌種の減少が認められた。*Turicibacter* は酪酸の合成に関与することが報告されており、酪酸はインスリンの感受性の改善効果があると言われているため、Pg の感染は *Turicibacter* を減少させることにより、インスリン抵抗性に影響を与える可能性が示唆された。

サルコペニア (加齢性筋量減少症) は加齢とともに骨格筋量の減少をきたす概念であるが、近年筋量の減少と脂肪量の増加を伴うサルコペニア肥満が注目されている。本研究では Pg の投与により骨格筋の脂肪化及び代謝異常が認められたことから、歯周病の予防及び治療がサルコペニア肥満の病態改善に寄与する可能性が示唆された。本研究結果は、参考文献 1 に掲載された。

参考文献

1. Watanabe K, Katagiri S, Takahashi H, Sasaki N, Maekawa S, Komazaki R, Hatasa M, Kitajima Y, Maruyama Y, Shiba T, Komatsu K, Ohsugi Y, Tanaka K, Matsuzawa A, Hirota T, Tohara H, Eguchi Y, Anzai K, Hattori A, Iwata T. *Porphyromonas gingivalis* impairs glucose uptake in skeletal muscle associated with altering gut microbiota. *FASEB J* 2021 Feb;35(2):e21171.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yoshida S, Hatasa M, Ohsugi Y, Tsuchiya Y, Liu A, Niimi H, Morita K, Shimohira T, Sasaki N, Maekawa S, Shiba T, Hirota T, Okano T, Hirose A, Ibi R, Noritake K, Tomiga Y, Nitta H, Suzuki T, Takahashi H, Miyasaka N, Iwata T, Katagiri S	4. 巻 11
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Administration Induces Gestational Obesity, Alters Gene Expression in the Liver and Brown Adipose Tissue in Pregnant Mice, and Causes Underweight in Fetuses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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) 10.3389/fcimb.2021.745117	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 Kataoka Akihisa, Katagiri Sayaka, Kawashima Hideyuki, Nagura Fukuko, Nara Yugo, Hioki Hirofumi, Nakashima Makoto, Sasaki Naoki, Hatasa Masahiro, Maekawa Shogo, Ohsugi Yujin, Shiba Takahiko, Watanabe Yusuke, Shimokawa Tomoki, Iwata Takanori, Kozuma Ken	4. 巻 51
2. 論文標題 Association between periodontal bacteria and degenerative aortic stenosis: a pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science	6. 最初と最後の頁 226 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5051/jpis.2006040302	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 Hatasa M, Ohsugi Y, Katagiri S, Yoshida S, Niimi H, Morita K, Tsuchiya Y, Shimohira T, Sasaki N, Maekawa S, Shiba T, Hirota T, Tohara H, Takahashi H, Nitta H, Iwata T	4. 巻 10
2. 論文標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis Alters Endocrine Functions in Brown Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	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) 10.3389/fcimb.2020.580577	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 Watanabe K, Katagiri S, Takahashi H, Sasaki N, Maekawa S, Komazaki R, Hatasa M, Kitajima Y, Maruyama Y, Shiba T, Komatsu K, Ohsugi Y, Tanaka K, Matsuzawa A, Hirota T, Tohara H, Eguchi Y, Anzai K, Hattori A, Iwata T	4. 巻 35
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis impairs glucose uptake in skeletal muscle associated with altering gut microbiota	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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) 10.1096/fj.202001158R	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 Kataoka A, Katagiri S, Kawashima H, Nagura F, Sasaki N, Shiba T, Iwata T, Nara Y, Hioki H, Nakashima M, Hatasa H, Maekawa S, Ohsugi Y, Watanabe Y, Shimokawa T, Kozuma K	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between periodontal bacteria and degenerative aortic stenosis: a pilot study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science (in press)	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hatasa M, Ohsugi Y, Katagiri S, Hirota T, Yoshida S, Morita K, Niimi H, Shimohira T, Watanabe K, Sasaki N, Maekawa S, Nitta H, Iwata T
2. 発表標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis aggravates inflammation in brown adipose tissue
3. 学会等名 The 106th Annual meeting American Academy of Periodontology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 畑佐 将宏, 大杉 勇人, 片桐 さやか, 新見 ひろみ, 森田 和機, 吉田 澄子, 下平 剛, 佐々木 直樹, 前川 祥吾, 芝 多佳彦, 廣田 朝光, 新田 浩, 岩田 隆紀
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisによる菌血症は褐色脂肪の内分泌機能を変化させる
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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

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
---------	---------