

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23029

研究課題名（和文）メタボローム解析による抗炎症性 3脂肪酸分解産物生成メカニズムの解明

研究課題名（英文）metabolome analysis of anti-inflammatory mechanism by omega-3 fatty acid

研究代表者

竹村 翼（Takemura, Tasuku）

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：10882037

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題の目的は、近年、抗炎症物質として注目を浴びている 3脂肪酸経口摂取時の歯周組織に対する抗炎症作用メカニズムを解明することである。事前に歯周病原細菌*P. gingivalis* (Pg) を腹腔内投与することで抗体を作製させ、Pgを口腔内局所投与（1億CFU/3日毎、6週間）すると共に、3脂肪酸含有マウス食を与え、血清中と歯肉中のサイトカイン量の測定、歯槽骨吸収を評価した。これまでの歯周炎モデルより強い骨吸収が認められたが、コントロールの 6脂肪酸投与群と比較して、3脂肪酸経口投与群は炎症性サイトカイン量、骨吸収の抑制が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、3脂肪酸が歯周組織において抗炎症効果を発揮し、歯周炎進行抑制に寄与することが明らかとなった。そのメカニズムとしては、3脂肪酸が口腔内局所で直接分解されて、その分解産物（レゾルビン、RevE1、プロテクチン）が抗炎症作用を發揮すると考えられる。これ以外にも、口腔内常在菌が分解する可能性も考えられる。これらの知見から、3脂肪酸を多く含む食品の摂取が歯周炎抑制に効果を発揮し、歯周炎が影響する糖尿病、慢性腎症、肝臓疾患のような全身疾患の抑制に働く可能性があり、社会的意義の高い研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate the mechanism of anti-inflammatory effect on periodontitis during oral inoculation of 3 fatty acid, which has been focused as an anti-inflammatory substance in recent years. After intraperitoneally administering the periodontal pathogenic bacterium *P. gingivalis* (Pg), Pg is locally administered orally (10⁸ CFU/3 days for 6 weeks) in the presence of a mouse diet containing 3 or 6 fatty acid. Then, IL-6 level in serum and gingival tissue was measured, and alveolar bone resorption was evaluated. The decrease of IL-6 production and suppression of bone resorption were observed in the 3 fatty acid oral administration group as compared with the control 6 fatty acid administration group.

研究分野：歯周治療学

キーワード：抗炎症物質 歯周炎 歯槽骨吸収 炎症性サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

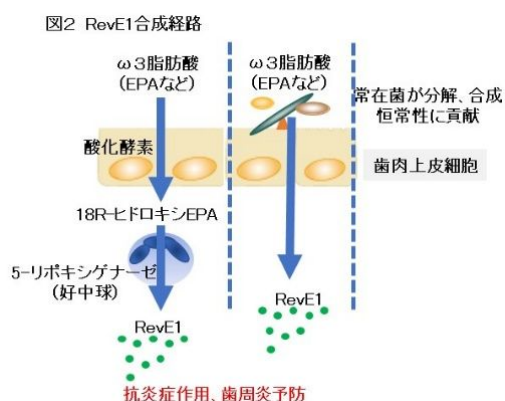
1. 研究開始当初の背景

不飽和脂肪酸には二重結合の位置により 3、6、9 脂肪酸が存在する。哺乳類は 3、6 脂肪酸を体内で合成することができず、食事により摂取する必要がある必須脂肪酸である。近年、特に 3 脂肪酸を多く含む亜麻仁油や青魚などの食品が注目されており、これらの脂肪酸が摂取後、生体内および腸内細菌にて代謝された種々の産物が、免疫制御作用、抗炎症作用を有することが明らかとなっている。3 脂肪酸である EPA の生体内代謝産物であるレゾルビン E1 (RevE1) が *Porphyromonas gingivalis* (Pg) を口腔内塗布した歯周炎モデルにおいて強力な抗炎症作用、組織保護作用を示すこと (Front Immunol. 2019)、DHA の代謝産物であるレゾルビン D2 やマレシン 1 にも抗炎症・炎症収束作用が見いだされており、炎症性腸疾患の抑制に積極的に働くことが明らかになっている (Proc Natl Acad Sci U S A. 2005)。

これらの脂肪酸は一般的に、生体内特に血管内皮細胞の酸化酵素、好中球の 5-リポキシゲナーゼによって RevE1 が生成される。また、6 脂肪酸のリノール酸から、*L. plantarum*、*L. acidophilus*、*S. pyogenes*、*S. maltophilia* のような腸内細菌が保有する代謝酵素 (J Pharmacol Sci. 2018) により 10-hydroxy-cis-12-octadecenoic acid (HYA) が代謝産生されるという報告もある。HYA は歯肉組織の E-カドヘリン分解を阻害することで歯周病を抑制する作用があるほか、腸管上皮細胞の TNF 受容体の発現を抑制し炎症性腸疾患の抑制作用があること、さらに肥満抑制作用や耐糖能改善作用などが報告されている (Int Immunol. 2019)。食事性成分から、生体内代謝、腸内細菌やプロバイオティクスに使用される微生物により分解、産生される機能性代謝物はポストバイオティクスと呼ばれ、生体への影響の解析から機能性食品素材としての開発まで幅広い分野で注目されている。また、分解、代謝酵素の産生量、腸内細菌叢 (腸内フローラ) が人によって異なることを考えると、食事で摂取した 3 脂肪酸の効能は個人差が生じることが予想され、各個人にあったより効果の望めるプロバイオティクスを含めた個別栄養指導や創薬展開が可能になると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、代謝産物 RevE1 を薬剤として使用するのではなく、3 脂肪酸経口摂取で抗炎症効果をきたすメカニズムを検討する点が学術的独自性に長けた点である。将来的には研究を発展させ、実際の患者において、3 脂肪酸を含む食品の摂取状況と、基礎研究から明らかになった抗炎症性代謝物質の代謝能を有した口腔内細菌の保菌状況を調査し歯周病の状態を臨床的にも評価する。



3. 研究の方法

計画1 3 脂肪酸経口投与による歯周炎抑制効果の評価

C57系マウスに Pg W83 株を3日毎、42日間口腔内に塗布することで歯周炎を誘導する (報告済)。マウスに与える餌として 3 脂肪酸含有食餌を使用することで抗炎症効果を検討する。コントロールとして 3 脂肪酸非含有食餌を用いる。解析項目は、歯槽骨吸収、歯肉組織の炎症性サイトカイン量の解析 (ELISA)、RevE1 量の測定、そして組織学的な検討 (免疫染色による免疫細胞分布、組織破壊の程度) を行う。

計画2 RevE1 局所投与によるモデルマウスによる歯周炎抑制効果の検討これまでの先行研究のように Pg 感染歯周炎モデルマウスの歯肉周囲に RevE1 を塗布することでの直接的抗炎症作用を検討する。また 3 脂肪酸経口投与の骨吸収抑制と比較する。

計画3 マウスモデルにおける骨吸収抑制メカニズムの解明

マウス大腿骨由来単球系細胞を分離し、sRANKL、M-CSF 存在下での破骨細胞分化実験をおこなう。この培養系に ω 3 脂肪酸、 ω 6 脂肪酸を加えた場合の破骨細胞分化の影嚢を検討する。破骨細胞の形成は TRAP 染色で行う。また遺伝子解析は real-time PCR で TRAF6、NFATc1、c-Fos、OSCAR、Cathepsin K、MMP-9 の mRNA 発現を検討する。

計画4 ω 3 脂肪酸経口投与による RevE1 生成に関するメタボローム解析

歯周組織局所の ResolvinE1 による抗炎症作用について、前駆体の ω 3 脂肪酸経口投与で歯周組織に起こる応答をメタボローム解析する。Shimadzu 社製 GCMS-QP2010-Ultra、Agilent 社製 1200 series を用いて、GC-MS、LS-MS を行い、遺伝子発現解析と総合的に関連付けを行い、歯周炎局所での免疫応答を解明する。

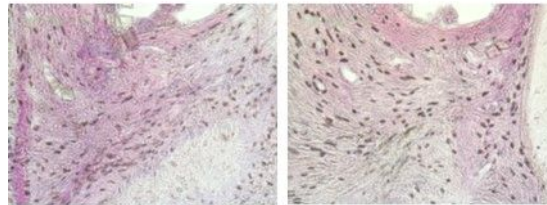
4. 研究成果

結果1

C57 系マウスに Pg W83 株を 3 日毎、4 2 日間口腔内感染後の歯槽骨吸収両を測定し、 ω 3 脂肪酸含有食餌投与群は ω 6 脂肪酸含有食餌投与群と比較して、歯槽骨吸収抑制が認められた。また、歯周組織中の ResolvinE1 量を測定したところ、 ω 3 脂肪酸含有食餌投与群の血清中では高い傾向が認められた。組織像でも、歯周組織の破壊が抑制されている傾向が認められた。特に歯槽骨吸収が認められる部位周囲の炎症細胞浸潤に違いが認められた。

マウス歯周炎モデルの HE 染色組織像

ω 3 脂肪酸添加群 ω 6 脂肪酸添加群

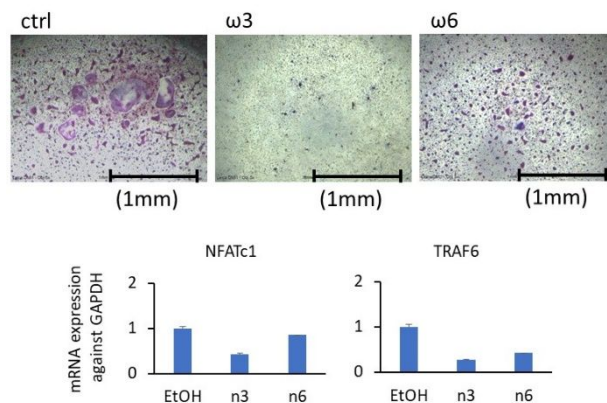


結果2

計画1と同様に C57 系マウスに Pg W83 株を 3 日毎、4 2 日間口腔内感染させるモデルで Pg 塗布日の前日に 2%カルボキシメチルセルロース (CMC) 含有 ResolvinE1 を塗布することで効果を検討した。マウスの歯周炎による歯槽骨吸収と歯肉中の IL-6 産生量が低下した。したがって ResolvinE1 が Pg 感染による歯周組織の破壊を抑制することが示唆された。

結果3

ω 3 脂肪酸添加時の破骨細胞分化を TRAP 染色で検討した。非添加、 ω 6 脂肪酸添加時と比較して、破骨細胞の分化が抑制された。また遺伝子解析を行い NFATc1 と TRAF6 は非添加、 ω 6 脂肪酸添加時と比較して mRNA 発現量の抑制が認められた。



結果4

歯周組織局所の ResolvinE1 による抗炎症作用について、 ω 3 脂肪酸即時経口投与で歯周組織に起こる応答をメタボローム解析した。Shimadzu 社製 GCMS-QP2010-Ultra、Agilent 社製 1200 series を用いて、GC-MS、LS-MS を行い、NAD 代謝産物、数種類の脂肪酸の上昇が認められた。

以上から、 ω 3 脂肪酸がマウス歯周炎局所で抗炎症効果を有することが明らかになった。しかし、脂肪酸が歯周組織局所で分解されて効果を発揮するのか、腸管まで移動して吸収され、血行性に

歯周炎局所に移行することで効果を発揮するのは不明であり、今後検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	應原 一久 (Ouhara Kazuhisa) (80550425)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	

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