

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09894

研究課題名（和文）「高炭水化物食」誘導脂肪肝マウスを用いた歯周炎によるNAFLD増悪機序の解明

研究課題名（英文）Elucidating the Mechanisms by which Periodontitis Exacerbates NAFLD in Mice with High-Carbohydrate Diet-Induced Fatty Liver Disease

研究代表者

栗原 英見（Kurihara, Hidemi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・名誉教授

研究者番号：40161765

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）：本研究では、肥満や糖尿病を伴わない非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）マウスモデルを高炭水化物食（HCD）を用いて樹立し、歯周炎がNAFLDに与える直接的な影響を明らかにすることを目的とした。その結果、HCDは肥満や糖尿病を引き起こさずに脂肪肝を誘発することが確認された。さらに、そのHCD誘発NAFLDマウスモデルに、実験的結紮結紮歯周炎を併用すると、肝臓の脂肪蓄積が顕著に増加し、歯周炎がNAFLDを悪化させることが明らかになった。

この結果から、歯周炎は肥満や糖尿病の増悪を介することなく、直接的に肝臓代謝に影響を及ぼし、NAFLDの病態を悪化させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの高脂肪食誘導性NAFLDマウスモデルは、糖尿病・肥満を併発するものであった。実臨床での患者ケースを良く模倣している一方で、実験ツールとしては複数の因子が絡み合うため、歯周炎による肝臓代謝への直接的影響の解明には適さなかった。

本研究で樹立した、高炭水化物誘導性NAFLDマウスモデルは、糖尿病・肥満が成立する前に脂肪肝を呈するため、歯周炎の直接的な影響検証に有効な新規実験ツールとなる。実際に、本モデルを用いて、肝臓に移行した歯周病原性細菌が肝臓代謝障害の原因となることを見出し、将来の新規NAFLD予防・治療法開発のための基盤となる知見を提供できたことの意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mouse model without the confounding factors of obesity and diabetes by using a high carbohydrate diet (HCD), and to elucidate the direct impact of periodontitis on NAFLD. As a result, it was demonstrated that HCD induces fatty liver without causing obesity or diabetes. Furthermore, when experimental ligature-induced periodontitis was introduced to the HCD-induced NAFLD mouse model, there was a significant increase in liver fat accumulation, indicating that periodontitis exacerbates NAFLD.

These findings suggest that periodontitis can directly affect liver metabolism and worsen NAFLD without the intermediary effects of obesity and diabetes. This study highlights the potential of using an HCD-induced NAFLD model to better understand the direct interactions between periodontitis and liver disease, providing a valuable tool for further research in this area.

研究分野：歯周病

キーワード：高炭水化物食 NAFLD 歯周炎

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、口腔内の病原性細菌に対する宿主の免疫反応によって引き起こされる慢性炎症であり、歯を支える歯槽骨や結合組織の破壊をもたらす。加えて、歯周炎は全身に病原性微生物や炎症性サイトカインを送り込み、遠隔の臓器に影響を与える可能性があることが報告されている。実際、歯周炎は心血管疾患、糖尿病、早産、関節リウマチなどの全身疾患と関連していることが広く認識されている。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、代表的な慢性肝疾患の一つであり、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を含む。NAFL は可逆的な状態であるが、そのうち 10~20% が NASH に進行する。NASH は肝細胞の変性による不可逆的な炎症状態であり、最終的には肝硬変や肝がんに進行することがある。NAFLD の進行に関しては、肥満、糖尿病、インスリン抵抗性、酸化ストレスなどのリスク要因が報告されている。

重要なことに、Yoneda らは近年、歯周炎が NAFLD の発症リスク因子となり得ることを初めて報告した。この発見に続いて、いくつかの研究が動物モデルを用いて歯周炎と NAFLD の関係を調査しているが、その増悪メカニズムについては不明な点が多く残されている。その原因として、従来の研究では、高脂肪食によって NAFLD マウスモデルを作成し、そこに歯周炎を併発させる方法が多く用いられてきた。しかし、高脂肪食は NAFLD だけでなく糖尿病や肥満も引き起こす。糖尿病や肥満は NAFLD の増悪因子であると同時に、歯周炎によってその病態が悪化する。したがって、歯周炎が NAFLD などの肝臓代謝に及ぼす直接的な影響を検証することが困難であった。すなわち、糖尿病や肥満を併発させることなく NAFLD を生じさせ、ここに歯周炎を併発可能な動物実験モデルの確立が必要と考えられた。

高脂肪食は大量の飽和脂肪酸を提供し、脂質をさまざまな組織に蓄積させ、糖尿病、肥満、脂肪肝が同時に発症する。一方、食物から摂取された過剰な炭水化物 (果糖やグルコースを含む) はまず肝臓に到達し、脂質合成経路を活性化して脂肪肝を引き起こす。すなわち過剰な炭水化物摂取は、脂肪肝が確立した後に糖尿病や肥満が発症するといえる。この特徴に着目し、研究代表者は、高炭水化物食が糖尿病や肥満を伴わない脂肪肝 (NAFLD) マウスモデルが樹立可能であると仮説をたて、さらにその NAFLD 単独発症マウスモデルに歯周炎を併発させることで、これまで未解明であった歯周炎による肝臓代謝への直接的な影響が解明できると考えた。

2. 研究の目的

上述した背景から本研究では、「高炭水化物食」を与えることで糖尿病や肥満を伴わない NAFLD マウスモデルを確立し、そこに実験的歯周炎を発症させることで、糖尿病は肥満を介するメカニズムとは異なり、歯周炎が肝臓代謝に直接的に及ぼす分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1. 高炭水化物食 (HCD) による NAFLD 単独発症マウスモデルの確立

6 週齢の雄の BALB/cAJcl マウスを使用し、標準飼料 (NC)、高脂肪食 (HFD)、および HCD でそれぞれ 6 週間飼育した (HCD および HFD の組成は右テーブル参照)。飼育期間中、毎週の体重測定を行い、実験期間終了前に腹腔内ブドウ糖耐性試験 (IPGTT) およびインスリン耐性試験 (ITT) を実施した。これらの試験では、16 時間の絶食後にグルコースまたはインスリンを腹腔内注射し、血糖値を測定した。また、肝臓を解剖し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、組織学的解析を行い、ImageJ ソフトウェアを用いて脂質面積を定量化した。

	HCD	HFD32
	Formula(g/Kg)	
Sucrose	341.45	Crystalline Cellulose 55
Corn Starch	115	Maltodextrin 82.5
Cellulose	50	Lactose 69.28
Unsalted butter	245	Sucrose 67.5
Cholesterol	1.5	Powdered beef tallow 158.8
Casein	195	Safflower oil(high oleic acid) 200
DL-Methionine	3	Milk casein 245
Mineral Mix,AIN-96	35	Egg white 50
Calcium Carbonate	4	L-cystein 4.3
Vitamin Mix,AIN-93	10	AIN93 vitamin mix 14
Tertiary butylhydroquinone	0.05	AIN93G mineral mix 50
		Choline bitartrate 3.6
		Tertiary butylhydroquinone 0.02
Energy (kcal/100g)		507.6
		450

実験 2. HCD 誘導 NAFLD マウスモデルにおける歯周炎併発の影響検証

歯周炎による肝臓代謝への直接的な影響を検証するために、実験的絹糸結紮歯周炎モデルを併用した。具体的には、マウスの上顎臼歯周囲にシルク糸を結び、歯周炎を誘発した。この処置を行ったマウスに対して、NC または HCD を 4 週間与え、その後 IPGTT および ITT を実施した。上顎骨は 4%パラホルムアルデヒドで固定し、マイクロ CT を用いて骨吸収を解析した。これにより、セメント-エナメルジャンクション (CEJ) から歯槽骨頂 (ABC) までの距離を測定し、歯周炎の程度を評価した。

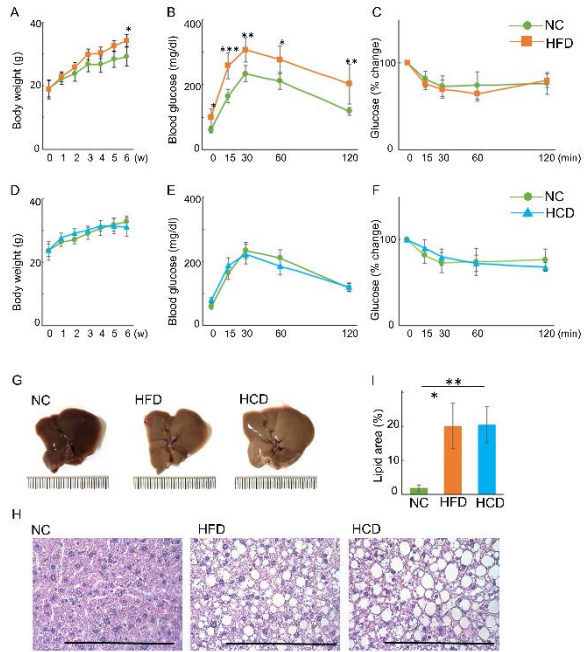
4. 研究成果

結果 1

HFD または HCD を 6 週間投与したマウスの体重、ブドウ糖耐性、インスリン耐性、肝臓の状態を評価した。HFD を与えたマウスは、標準飼料 (NC) を与えたマウスに比べて体重が有意に増加し (図 1A)、インスリン耐性は変わらなかったものの (図 1C)、ブドウ糖耐性は著しく低下した (図 1B)。一方、HCD を与えたマウスは体重 (図 1D)、ブドウ糖耐性 (図 1E)、インスリン耐性 (図 1F) において NC 群と有意な差異は見られなかった。しかし、HFD および HCD のいずれも肝臓に脂肪変性を引き起こし、肝臓の色が変化し (図 1G)、組織学的解析において脂肪滴の蓄積が観察された (図 1H および 1I)。これらの結果から、HFD は NAFLD を誘発するのみならず、肥満や糖尿病を併発してしまうことが示された。一方、HCD は肥満や糖尿病を伴わずに NAFLD を誘発できることが確認された。すなわち、HCD 誘導性 NAFLD マウスモデルは、歯周炎による直接的な影響の検証に適した、新規動物実験手法となることが示唆された。

図 1. 高脂肪食 (HFD) および高炭水化物食 (HCD) がマウスの体重、ブドウ糖耐性、インスリン耐性、および肝臓脂肪症に与える影響

BALB/cAJcl マウスに対して、標準飼料 (NC) (A-H)、HFD (A-C, G-H)、または HCD (D-H) を 6 週間与えた。(A および D) 毎週の体重測定。(B および E) 6 週目に 16 時間の絶食後に行った腹腔内ブドウ糖耐性試験 (IPGTT) と (C および F) インスリン耐性試験 (ITT) (n=4/グループ)。値は各グループの 4 匹のマウスの平均値±SD を示す。*p < 0.05, **p < 0.01。NC 群と有意に異なる。(G) 6 週間後に摘出した肝臓の代表的な肉眼画像。(H) 6 週目に摘出した肝臓の HE 染色切片。バー=100 μm。(I) ImageJ ソフトウェアで定量化した脂質面積。値は各グループの 4 匹のマウスの平均値±SD を示す。*p < 0.05, **p < 0.01。

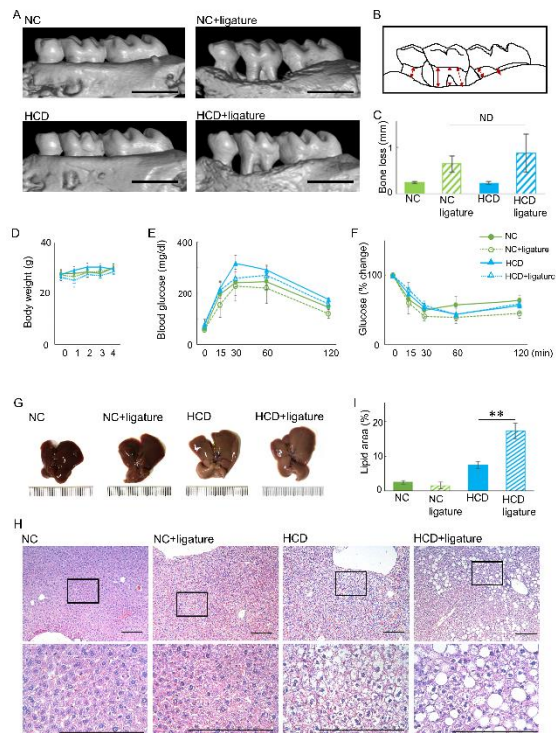


結果 2

HCD 誘導性 NAFLD マウスモデルに絹糸結紮歯周炎を併発させ、歯周炎の肥満・糖尿病・NAFLD への影響を検討した。絹糸結紮歯周炎を誘発したところ、NC および HCD のいずれの群においても、歯周炎による組織破壊が顕著に見られた (図 2A および 2C)。一方で、体重 (図 2D)、ブドウ糖耐性 (図 2E)、インスリン耐性 (図 2F) において、歯周炎の有無に関わらず有意な差異は見られなかった。肝臓に関しては、HCD を与えたマウスで顕著な脂肪蓄積が観察され (図 2H)、歯周炎を誘発することでさらに脂肪滴の蓄積が増加した (図 2H および 2I)。これらの結果から、歯周炎は、肥満や糖尿病の増悪を介さず、肝臓に直接的に影響を与えることで NAFLD を悪化させる可能性が示唆された。

図 2. 高炭水化物食 (HCD) による NAFLD マウスモデルにおける結紮誘発性歯周炎の影響

(A) 結紮処置 4 週間後の代表的なマイクロ CT 画像。バー=1mm。(B) CEJ-ABC 距離の測定対象部位の模式図。(C) CEJ-ABC 距離の合計を差し引いて計算した総歯周骨吸収量。値は各グループの 5 匹のマウスの平均値±SD を示す。ND=有意差なし。(D) 毎週の体重測定。(E) IPGTT および (F) ITT を 6 週目に 16 時間の絶食後に実施 (n=4/グループ)。値は各グループの 4 匹のマウスの平均値±SD を示す。(G) 4 週間後に摘出した肝臓の代表的な肉眼画像。(H) 4 週目に摘出した肝臓の HE 染色切片。上段は低倍率画像、下段はボックス内の領域を拡大した画像を示す。バー=100 μm。(I) ImageJ ソフトウェアで定量化した脂質面積。値は各グループの 4 匹のマウスの平均値±SD を示す。**p < 0.01。



以上の結果 1, 2 の成果から、高炭水化物食 (HCD) は肥満や糖尿病を伴わない NAFLD モデルの作成に適しており、歯周炎が NAFLD を悪化させることが明らかになった。さらに、その増悪メカニズムは、炎症性サイトカインの産生向上によるものではなく、口腔から肝臓に移動する歯周病原性細菌によるものである可能性を見出している。これらの成果をまとめて、現在、英語論文投稿準備中である。

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	加治屋 幹人 (Kajiya Mikihiro) (00633041)	広島大学・大学病院口腔検査センター・教授 (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