

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11668

研究課題名(和文) 抗酸化nano-medicineは歯周病菌感染が誘導するNASH肝発癌を抑制する

研究課題名(英文) Antioxidative nanoparticles attenuate the development of steatohepatitis and inhibit hepatocarcinogenesis in mice induced by lipopolysaccharide from periodontal bacteria.

研究代表者

山縣 憲司 (Yamagata, Kenji)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00420084

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)：歯周病原細菌由来のリポ多糖(LPS)はNASHを発症させる。Nrf2はLPSの貪食機能に関連する。Kupffer細胞のみにNrf2を発現するNrf2遺伝子レスキューマウス(Nrf2-mRes)を作製した。Nrf2-mResでは、高脂肪食摂餌(HFD)とLPS投与によるNASH肝病変(肝炎症・線維化)の発症が抑制された。Kupffer細胞Nrf2は重要なNASH防御因子と考えられた。現在、Kupffer細胞の貪食機能が減衰した全身Nrf2遺伝子欠損マウスにHFDとLPS投与をおこない、抗酸化レドックス粒子(RNPO)がNASHの発症進展に対する抑制効果を発揮するかを検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者における歯周病の有病率は高率であり、そのLPSの血中濃度は年齢の高齢化とともに増加する。NASHと肝発癌を誘導する歯周病細菌の役割において、LPSがそれらのプロモーションをきたすことが推測されている。本研究では、Kupffer細胞のみにNrf2を発現するNrf2遺伝子レスキューマウス(Nrf2-mRes)を作製した。Nrf2-mResでは、高脂肪食摂餌(HFD)とLPS投与によるNASH肝病変(肝炎症・線維化)の発症が抑制されることを解明した。Kupffer細胞Nrf2は重要なNASH防御因子と考えられた。本研究成果はNASH-肝癌予防に向けた新しい学術的成果として捉えることが出来る。

研究成果の概要(英文)：Lipopolysaccharide (LPS) derived from periodontal bacteria reportedly contributes to the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). The transcription factor Nrf2 plays a role of phagocytosis function against LPS. Macrophage-specific Nrf2 gene rescue mice (Nrf2-mRes), which express Nrf2 only in macrophages, was generated in our laboratory. Nrf2-KO mice developed severe steatohepatitis with liver inflammation and fibrosis compared with WT mice, and steatohepatitis was ameliorated in Nrf2-mRes mice. The results suggested that Nrf2 is an important inhibitory factor against steatohepatitis. Following the observation, at present, we have started a study to clarify the protective mechanisms by which the oral administration of one of the nanoparticle-type antioxidants, RNPO attenuates NASH development through the oral-gut-liver axis in the mice.

研究分野：健康応用科学

キーワード：NASH 歯周病菌 Oral-Gut-Liver axis Nrf2 遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)発症と肝発癌には腸肝相関 (Gut-Liver Axis) が存在する (Hepatology 2009). 肝臓は腸内細菌をはじめとする種々の腸管由来の因子により影響を受ける. NASH 肥満者では LPS の血中濃度が高いことを報告した (J Gastroenterol 2018).

(2) LPS の由来は腸内細菌由来と考えられてきたが, 最近では, 歯周病菌由来の LPS と NASH との関連性が報告されている (BMC Gastroenterol 2012). 先進国では人口の 80%以上が歯周病に罹患している. 歯周病菌は口腔内より腸内に移行し, 潜在的に腸内細菌叢に影響を及ぼしていると推測される (PLoS One 2015).

(3) LPS に対する生体側の抑止因子には抗酸化ストレス応答を制御する転写因子 Nrf2 がある. Nrf2 は LPS による自然免疫系の活性化を抑止する因子である (J Clin Invest 2006). Nrf2 は肝細胞における酸化ストレス消去のほか, 小腸のバリア機能, Kupffer 細胞の貪食能にも重要な役割を果たす (Exp Anim. 2018).

(4) 本学の長崎は高分子ポリマーに抗酸化剤を共有結合させた抗酸化 nano-medicine(RNP⁰)を開発した. RNP⁰ は消化管内で崩壊せず腸管に高濃度に集積し, 腸管内で LPS と会合して MΦ, 好中球が過剰に産生する ROSs の選択的消去に役割を演じる (図 1).

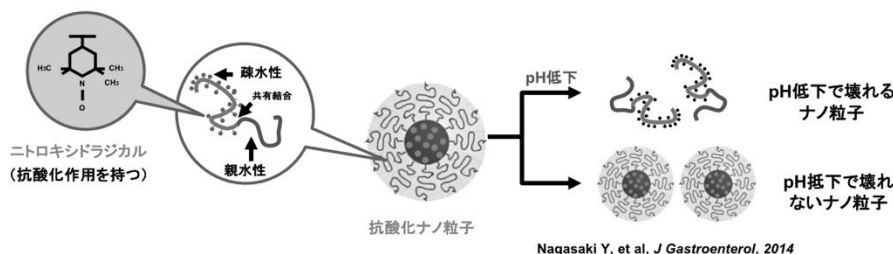


図 1 : 抗酸化ナノ粒子 (RNP⁰)

2. 研究の目的

(1) Kupffer 細胞を含むマクロファージのみに Nrf2 を発現するマクロファージ特異的 Nrf2 遺伝子レスキューマウス (Nrf2-mRes) を作製・解析し, 高脂肪食摂餌と歯周病原細菌由来の LPS が誘導する NASH におけるマクロファージの Nrf2 の役割を明らかにする. (2) 抗酸化ストレス応答機能の減衰したマウスに対して, 高脂肪/ショ糖食による代謝性高 LPS 血症の病態を誘導させる. さらに, 歯周病菌あるいは歯周病菌由来 LPS を感染させる. 本マウスに対して RNP⁰ を長期間経口投与し, RNP⁰ が Oral-Gut-Liver axis を介して LPS による肝の炎症性障害を軽減し, 肝発癌を抑止するかを検証する.

3. 研究の方法

(1) マクロファージ特異的 Nrf2 遺伝子レスキューマウス (Nrf2-mRes) の作製 (図 2): Nrf2 遺伝子のイントロンに, LoxP 配列で挟まれた転写終結シグナルおよび polyA 付加シグナル配列を挿入したノックインマウス (Nrf2^{KI/KI}) を作製した. このマウスは, Nrf2^{-/-} と同様全身で Nrf2 遺伝子が欠損する (Nrf2-KO). 次に, Nrf2^{KI/KI} マウスと, マクロファージ特異的に Cre リコンビナーゼ

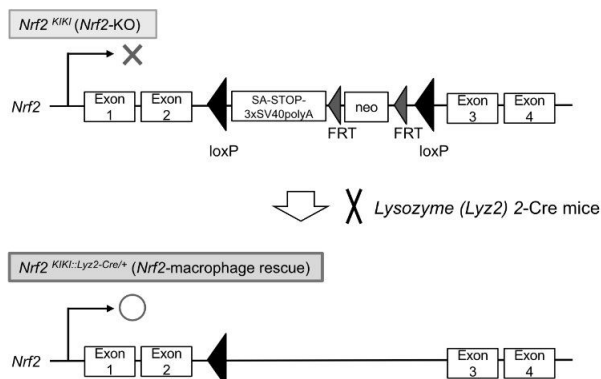


図 2 : マクロファージ特異的 Nrf2 遺伝子レスキューマウス (Nrf2-mRes) の作製

を発現するマウス (Lysozyme 2-Cre マウス) を交配する。これにより生まれる仔は, *Cre* が発現するマクロファージでのみ *LoxP* で挟まれた転写終結シグナルと *polyA* 付加シグナルが除去されるため, *Nrf2* がマクロファージにのみ特異的に発現する (最終遺伝子型: *Nrf2*^{K1/K1::Lysozyme2-cre/+}).

(2) 高脂肪食摂餌と *P.g* 由来 LPS 投与による NASH モデル作製: 雄性 5 週齢の *Nrf2*-KO マウス, *Nrf2*-mRes マウス, WT マウスに 60%高脂肪食 (HFD)を 17 週間摂餌させ, 後半 6 週間に *P.g* 由来 LPS (InvivoGen) を週 2 回腹腔内投与した (0.3 mg/kg). 23 週齢でと殺し, 体組成, 血液生化学検査, 肝病理組織評価 (steatosis activity fibrosis score ; SAF score), 肝組織の定量的 PCR, 肝組織中 LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein), 酸化ストレスマーカーを測定して比較解析を行った。また, 雄性 5 週齢の WT マウスに通常食を摂餌させ, *P.g* 由来 LPS を投与しないコントロール群 (WT control)とした。

(3) *Sqstm1:Nrf2* 遺伝子二重欠失 (DKO) マウスに対して NASH 発症を誘導する。さらに, *P.g* 由来 LPS の腹腔内投与, あるいは *P.g* 生菌の口腔内投与をおこなう。本マウスに対して RNP⁰ を長期間口腔内投与し, RNP⁰ が Oral-Gut-Liver axis を介して, *P.g* 由来 LPS による肝の炎症性障害を軽減し, NASH 発症と肝発癌に対する抑止効果を発揮することが可能であるかを検証する (一部現在実験継続中)。

4. 研究成果

(1) 肝組織の病理組織学的解析において, WT control は有意な変化を認めなかった。HFD + LPS 群の比較では, *Nrf2*-KO は WT と比べ肝炎および線維化が有意に高度であったが, *Nrf2*-mRes では改善した (WT vs *Nrf2*-KO vs *Nrf2*-mRes: steatosis = 1.5 ± 0.1 vs 1.2 ± 0.1 vs 1.2 ± 0.2, activity = 0.6 ± 0.1 vs 1.3 ± 0.1 vs 0.3 ± 0.1, fibrosis = 0.0 ± 0.0 vs 1.3 ± 0.2 vs 0.0 ± 0.0) (図 3)。

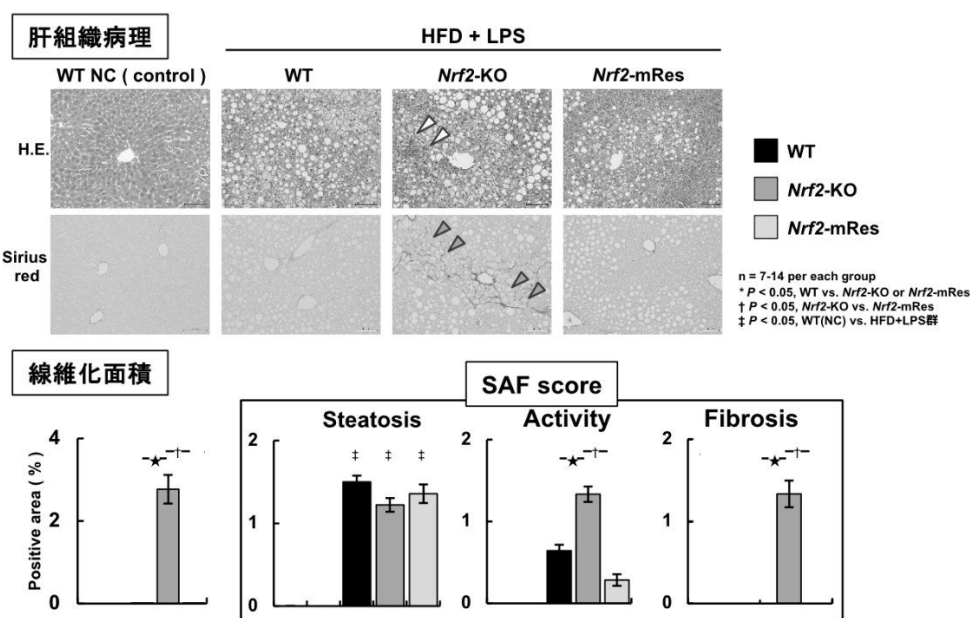


図 3 : 肝病理組織の解析

(2) 肝組織の定量的 PCR 解析において, HFD + LPS 群の比較では, *Nrf2*-KO は WT マウスと比べ LPS の炎症シグナル伝達に関与する *Toll-like receptor (Tlr) 2* と炎症性サイトカイン *Il-1β*, 肝線維化促進因子 *Tgfb1*, 肝線維化マーカー *αSMA* の発現が有意に増加したが, *Nrf2*-mRes ではそれらの増加が抑制された。

(3) 肝組織の LPS を推測するため LBP を, マクロファージ浸潤程度について F4/80 を immunoblot で解析した。さらに, 肝組織の酸化ストレスを酸化ストレスマーカーである hexanoyl lysine (HEL) の immunoblot と肝組織 GSSG/GSH によって評価した。LBP は肝臓により恒常的に産生されており, LPS の存在により産生量が増加する。HFD + LPS 群の比較では, LBP は *Nrf2*-KO マウスで有意に高く, WT マウスと *Nrf2*-KO マウスで抑制されていた (図 4)。

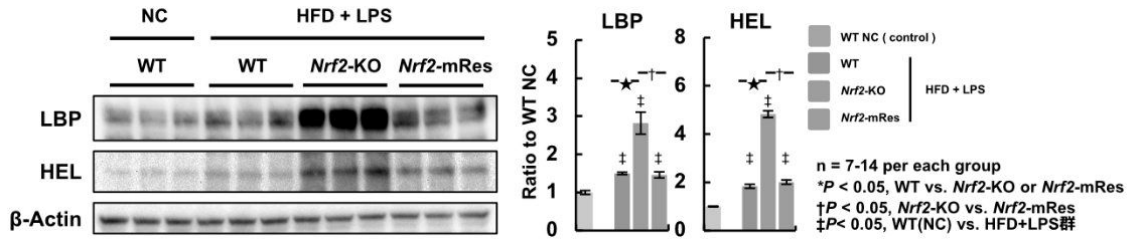


図4：肝における lipopolysaccharide binding protein (LBP) と hexanoyl lysine (HEL) の発現レベル

(4) DKO マウスの対照群 (C) と RNP⁰ 投与群 (R) では, mortality や体重変化, 解剖時の肝重量, 白色脂肪組織重量に差を認めなかった。肝病理評価 (SAF score) (図5)では, 脂肪化は S 群で高値である一方 (C: 0.9 ± 0.1 , S: 1.4 ± 0.2), 炎症には差はなく (C: 1.2 ± 0.1 , S: 1.0 ± 0.0), 線維化は S 群で有意に抑制されていた (C: 1.1 ± 0.1 , S: 0.2 ± 0.1)。血液生化学による肝障害は, 両群間で有意な差を認めなかった。高脂肪食摂取 DKO マウスでは, 対照群(HC)で 17 /52 例(33%)に肝癌が認められたのに対し, RNP⁰ 投与群(HR)では明らかな肝癌発生は認められなかった(0 /10 例)。また, HR 群の線維化は有意に抑制されていた (HC: 4.0 ± 0.0 , HS: 3.4 ± 0.2) (図5)。HR 群では, 肝臓における血清リポ多糖(LPS)濃度と LPS 結合タンパク質(LBP)の発現は, HC 群と比較して有意に低

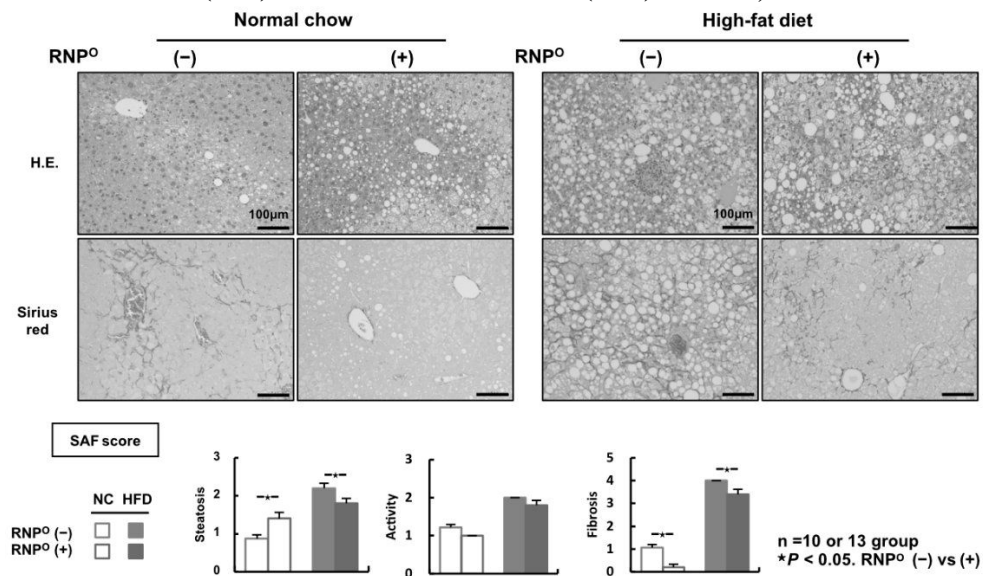


図5：RNP⁰ 投与は肝線維化を抑制する

値であった。

(5) 考察として, *P.g* 由来 LPS の腹腔内投与は, 血行性に Kupffer 細胞の炎症シグナルや肝星細胞の線維化シグナルを活性化し, 肝炎症線維化を進展させたと推測される。Kupffer 細胞に Nrf2 が発現することで, 肝臓における LPS の処理能力が回復し, 炎症シグナルとそれに続く線維化シグナルが抑制され, NASH 進展を防御したと考えられる。歯周病原細菌由来の LPS が誘導する NASH の進展において, マクロファージの Nrf2 は重要な防御因子と考えられる。

RNP⁰ は Nrf2 の発現低下により生体の抗酸化作用が低下した個体において, 肝炎症・線維化の進展を抑制する生体材料として有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Watahiki T, Okada K, Miura I, To K, Tanaka S, Warabi E, Kanno N, Yamagata K, Gotoh N, Suzuki H, Ariizumi S, Tsuchiya K, Nagasaki Y, Shoda J	4. 巻 11
2. 論文標題 Antioxidative Self-Assembling Nanoparticles Attenuate the Development of Steatohepatitis and Inhibit Hepatocarcinogenesis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11101939	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 Takasaki R, Yamagata K, Fukuzawa S, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Bukawa H	4. 巻 22
2. 論文標題 Convenient Decision Criteria for Surgery in Elderly Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Maxillofac Oral Surg	6. 最初と最後の頁 198-200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/dj11010006	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 Yamagata K, Fukuzawa S, Inoue Y, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Ito H, Bukawa H	4. 巻 22
2. 論文標題 A Case of Primary Intraosseous Squamous Cell Carcinoma Arising in Dentigerous Cyst of Mandible	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Maxillofac. Oral Surg	6. 最初と最後の頁 505-510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12663-022-01718-1	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 Transplanted neural lineage cells derived from dental pulp stem cells promote peripheral nerve regeneration	4. 巻 35
2. 論文標題 Shohei Takaoka, Fumihiko Uchida, Hiroshi Ishikawa, Junko Toyomura, Akihiro Ohyama, Miho Watanabe, Hideki Matsumura, Aiki Marushima, Seiichiro Iizumi, Satoshi Fukuzawa, Naomi Ishibashi-Kanno, Kenji Yamagata, Toru Yanagawa, Yuji Matsumura, Hiroki Bukawa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hum Cell	6. 最初と最後の頁 462-471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-021-00634-9	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 Seiichiro Iizumu, Fumihiko Uchida, Hiroki Nagai, Shohei Takaoka, Satoshi Fukuzawa, Naomi Ishibashi Kanno, Kenji Yamagata, Katsuhiko Tabuchi Toru Yanagawa, Hiroki Bukawa	4. 巻 7
2. 論文標題 MicroRNA 142-5p promotes tumor growth in oral squamous cell carcinoma via the PI3K/AKT pathway by regulating PTEN	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e08086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e08086	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 Kenji Yamagata, Satoshi Fukuzawa, Fumihiko Uchida, Kazuhiro Terada, Naomi Ishibashi-Kanno, Hiroki Bukawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Does the geriatric nutrition risk index predict prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Oral Maxillofac Surg	6. 最初と最後の頁 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjoms.2021.09008	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 Satoshi Fukuzawa, Kenji Yamagata, Makiko Okubo-Sato, Kazuhiro Terada, Fumihiko Uchida, Naomi Ishibashi-Kanno, Hiroki Bukawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Therapeutic Effect of Polidocanol Sclerotherapy on Oral Vascular Malformations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/d19100119	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 Miura I, Komine S, Okada K, Wada S, Warabi E, Uchida F, Oh S, Suzuki H, Mizokami Y, Shoda J	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of non-alcoholic steatohepatitis by long-term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Reps	6. 最初と最後の頁 e14859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14859	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山縣 憲司、菅野 直美、内田 文彦、福澤 智、武川 寛樹
2. 発表標題 顎骨骨肉腫に対する治療方針の検討
3. 学会等名 第40回口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高崎 稜、山縣 憲司、菅野 直美、福澤 智、内田 文彦、武川 寛樹
2. 発表標題 高齢口腔がん患者において手術選択に影響を及ぼす因子は？
3. 学会等名 第40回口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千原佳菜子、岡田浩介、内田文彦、福澤智、菅野直美、山縣憲司、柳川徹、武川寛樹
2. 発表標題 転写因子 Nrf2 は歯周病菌関連非アルコール性脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山縣憲司、福澤智、内田文彦、佐藤牧子、寺田和浩、菅野直美、生井友農、廣昌広実、武川寛樹
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌患者の予後予測におけるweighted lymph node ratioの有用性
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福澤智, 山縣憲司, 高崎稜, 武川幸太郎, 飯坂慶人, 寺田和浩, 佐藤牧子, 内田文彦, 菅野直美, 武川寛樹
2. 発表標題 口腔血管奇形に対するポリドカノール硬化療法の有効性と安全性について
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤石田玲衣, 山縣憲司, 佐藤智恵子, 寺田和浩, 飯坂慶人, 福澤智, 内田文彦, 菅野直美, 生井友農, 武川寛樹
2. 発表標題 薬剤関連性顎骨壊死stage2以上の患者における治療法選択に関する検討
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 綿引 隆久, 岡田 浩介, 正田 純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子 (RNP) はNASHモデルの肝線維化進展と肝発癌を抑止する
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 浩介, 綿引 隆久, 正田 純一
2. 発表標題 p62およびNrf2遺伝子二重欠失マウスは, 腸内細菌叢の変化に関連したlipopolysaccharide増加により脂肪性肝炎を自然発症する
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
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	鈴木 英雄 (Suzuki Hideo) (00400672)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	
研究分担者	内田 文彦 (Uchida Fumihiko) (70736008)	筑波大学・附属病院・病院講師 (12102)	
研究分担者	岡田 浩介 (Okada Kosuke) (80757526)	筑波大学・附属病院・病院講師 (12102)	
研究分担者	正田 純一 (Shoda Junichi) (90241827)	筑波大学・医学医療系・客員教授 (12102)	

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