

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 13日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592322

研究課題名（和文） 歯周病がメタボリックシンドロームに及ぼす直接作用の解析

研究課題名（英文） Direct involvement of periodontal disease on metabolic syndrome

研究代表者

松原 達昭（MATSUBARA TATSUAKI）

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：30209598

研究成果の概要（和文）：歯周病がメタボリックシンドロームに及ぼす直接作用を証明する目的で、ラットに実験的歯周病を誘導した。正常ラットおよび歯周病誘導ラットの体重、血糖、血清コレステロール値は違いを認めなかったが、実験的歯周病惹起4週間後のトリグリセリド値が、歯周炎誘導群において有意に高かった。歯周炎の存在は、動脈におけるTNF- $\alpha$ の遺伝子発現を増強し、動脈内膜の血管内皮細胞表面への単球接着を有意に増加させた。

研究成果の概要（英文）：To investigate a direct involvement of periodontal disease on metabolic syndrome, we developed ligature-induced periodontitis in rats. Serum triglyceride was significantly higher in periodontitis rats compared with normal rats. The mRNA expressions of TNF- $\alpha$  and monocyte adhesion to endothelial cells were significantly increased in aorta of periodontitis rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：メタボリックシンドローム、歯周病

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームが心筋梗塞、脳梗塞といった動脈硬化性疾患の危険因子であることについては論を俟たない。メタボリックシンドロームの主体は、内臓脂肪蓄積であるが、近年、内臓脂肪蓄積の進展に炎症機転が関与することが注目されている。脂肪組織から分泌される生理活性物質であるアディポサイトカインのうち、TNF- $\alpha$ 、インターロイキンなどは、動脈硬化促進、炎症惹起物質であり、一方、アディポネクチンは抗動脈硬化作用を有すると考えられている。また、動脈硬化進展に働くレジスチンは炎症性細

胞であるマクロファージから分泌されるという事実も含め、脂肪組織における炎症機転が動脈硬化進展と直接結びつく可能性を示唆している。

歯周病は歯周ポケット内に存在する細菌などの感染によって歯周組織が破壊される炎症性疾患であるが、炎症の進行により歯槽骨が吸収され、症状が重篤化すると歯は動揺し、支持を失った歯は脱落する。近年、歯周病が全身の炎症機転に関与することが指摘されている。メタボリックシンドロームの構成要素である、内臓脂肪蓄積（肥満）、高血圧、脂質代謝異常、耐糖能異常と歯周病が関

連しているとの臨床的報告はあるが、詳細なメカニズムは未だ明らかでない。

## 2. 研究の目的

本研究では、メタボリックシンドロームにおける歯周病の直接作用について、実験的に証明することを目的として、ラットに歯周病を誘導し、体重、耐糖能、脂質代謝、大動脈における遺伝子発現解析等について経過を追って観察し、歯周病の直接的な影響を明らかにした。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯周病モデルラットの作成(図1)

ラットを正常ラットと歯周病誘導ラットの2群に分け、歯周病誘導ラットは上顎第2臼歯に絹糸を巻きつけ、プラークの停滞しやすい環境を人工的に作成した。



図1. 実験的歯周炎の作成

### (2) 実験的歯周病の評価

実験的歯周炎作成を実施し一定期間後の歯周炎の評価は、以下の方法で行った。

#### ① mRNA 発現解析

上顎第2臼歯周囲の歯周組織を摘出し、直ちに液体窒素にて凍結した後、ハンマーを用いて冷却下に粉碎、既報に従いRNAを抽出した。遺伝子発現については、real time PCR法により解析した。

#### ② 病理組織学的検討

糸巻きによる歯周病誘導一定期間後、上顎第1-3臼歯周囲の歯周上顎骨とともに一塊として組織を摘出固定した。得られた組織は、OCTコンパウンドに包埋凍結し、凍結組織は脱灰することなく薄切し、HE染色および免疫組織染色を行った。本方法により、抗原性を低下させることなく免疫組織染色を行うことが可能であった。

#### ③ 歯槽骨吸収測定

マイクロCTを用いて、摘出した歯槽骨の吸収を観察し、セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定した。

### (3) 歯周病が全身に及ぼす影響の検討

実験的歯周炎作成一定期間後に以下の項目について評価した。

#### ① 体重、血糖、白血球数、血清総コレステロール値、血清トリグリセリド値の測定

#### ② 大動脈における mRNA 遺伝子発現解析

大動脈を摘出し、大動脈における炎症性サイトカインを中心とした遺伝子発現解析を

real time PCR法にて実施した。

## 4. 研究成果と考察

(1) 歯肉における炎症性サイトカイン遺伝子発現は歯周炎の誘導により有意に増加した。すなわち、歯周病誘導ラットの歯肉では、正常ラットの歯肉と比較し、TNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-6の遺伝子発現が有意に増加していた(それぞれ1.8倍(P<0.05)、4.2倍(P<0.01)、2.1倍(P<0.05))。

(2) 歯周炎誘導歯肉においては、炎症性細胞浸潤の著明な増加を認めた(図2)。

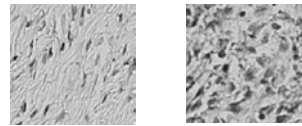


図2. 正常ラット 歯肉 / 歯周炎誘導ラット 歯肉

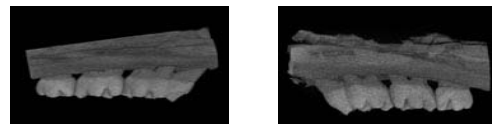
### (3) マイクロCTによる歯槽骨吸収測定

実験的歯周炎惹起2週間後の歯槽骨について、マイクロCTを用いて検討した。歯周炎惹起により歯槽骨の吸収が認められ、歯周炎惹起2週間後には、正常ラット歯槽骨と比較し、歯槽骨吸収を表わすセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離が有意に増加していた(図3)。

図3. 正常ラット 歯槽骨 / 歯周炎誘導ラット 歯槽骨

### (4) 体重および血液データ

正常ラットおよび歯周炎ラットの体重測定、血液検査を実施したところ、実験的歯周炎惹起2週間後の体重および血糖はともに有



意差を認めなかった。白血球数については、歯周炎ラットにおいて有意な増加を認めた。

また、血清コレステロール値は変化を認めなかったが、実験的歯周炎惹起4週間後の血糖、トリグリセリド値が、歯周炎誘導群において有意に高値であった。

### (5) 大動脈に及ぼす歯周炎の影響

#### ① 血管内皮細胞表面への単球接着

歯周炎惹起4週間後に胸部大動脈を摘出し、動脈における歯周炎惹起の影響を検討したところ、歯周炎の存在は動脈内膜の血管内皮細胞表面への単球接着を有意に増加させた(正常ラット;  $41 \pm 8 / \text{mm}^2$ , 歯周炎誘導ラット; 76

±9 /mm<sup>2</sup>).

## ② 大動脈における遺伝子発現解析

歯周炎惹起4週間後に胸部大動脈における炎症性サイトカインmRNA遺伝子発現を検討したところ、歯周炎誘導ラットの動脈においてTNF- $\alpha$ の有意な増加を認めた。

## (6) 考察

本研究において、ラットにおける実験的歯周炎の惹起により、血糖や血清脂質が上昇することが観察された。さらに、動脈硬化初期病変である単球の血管内皮細胞への接着を増加させ、動脈における炎症性サイトカイン発現も増加させることが明らかとなった。以上の結果は、歯周炎がメタボリックシンドロームに対し直接的に影響を及ぼすことを示唆しており、動脈硬化発症・進展といった観点から、歯周炎治療の重要性が示されたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 33 件)

- ① Hata M, Naruse K(2番目/12名), Kobayashi Y(4番目), Matsubara T(12番目), et al. Mechanical stretch increases the proliferation while inhibiting the osteogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Tissue Engineering: Part A*. 査読有、19巻、2013、pp625-633  
DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0099.
- ② Sato B, Matsubara T(15番目/17名), et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, and carotid intima-media thickness in patients with coronary artery disease. *International Journal of Cardiology*. 査読有、163巻、2013、pp214-216  
DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.06.094.
- ③ Naruse K. Nerve growth factor: Does this have the potential to become a miraculous treatment for diabetic heart? *Journal of Diabetes Investigation*. 査読有、3巻、2012、pp233-234  
DOI: 10.1111/j.2040-1124.2012.00215.x
- ④ Nisikawa T, Naruse K(2番目/14名), Kobayashi Y(3番目), Kikuchi T(6番目), Noguchi T(13番目), Matsubara T(14番目), et al. Involvement of nitrosative stress in experimental periodontitis in diabetic rats. *Journal of Clinical Periodontology*. 査読有、39巻、2012、pp342-349  
DOI:10.1111/j.1600-051X.2011.01848.x.
- ⑤ Uchida Y, Matsubara T(10番目/11名), et al. Impact of metabolic syndrome on various aspects of microcirculation and major adverse cardiac events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation Journal*. 査読有、76巻、2012、pp1972-1979  
DOI: 10.1253/circj.CJ-11-1299
- ⑥ Ishii H, Matsubara T(12番目/14名), et al. Impact of diabetes and glycaemic control on peripheral artery disease in Japanese patients with endstage renal disease: long-term follow-up study from the beginning of haemodialysis. *Diabetologia*. 査読有、55巻、2012、pp1304-1309  
DOI: 10.1007/s00125-012-2473-9.
- ⑦ Matsubara T(1番目/15名), Naruse K(2番目), et al. Impact of pitavastatin on high-sensitivity C-reactive protein and adiponectin in hypercholesterolemic patients with the metabolic syndrome: The PREMIUM Study. *Journal of Cardiology*. 査読有、60巻、2012、pp 389-394  
DOI: 10.1016/j.jjcc.2012.07.012.
- ⑧ Uetani T, Matsubara T(15番目/16名), et al. Impact of insulin resistance on post-procedural myocardial injury and clinical outcomes in patients who underwent elective coronary interventions with drug-eluting stents. *Journal of American College of Cardiology: Cardiovascular Interventions*. 査読有、5巻、2012、pp1159-1167  
DOI: 10.1016/j.jcin.2012.07.008.
- ⑨ Morita I, Noguchi T(4番目/10名), Matsubara T(5番目), et al. Relationship between periodontal status and level of glycated hemoglobin. *Journal of Dental Research*. 査読有、91巻、2012、pp161-166  
DOI: 10.1177/0022034511431583
- ⑩ Uchida Y, Matsubara T(10番目/11名), et al. Impact of plaque burden in the left main coronary artery determined by intravascular ultrasound on cardiovascular events in a Japanese population undergoing percutaneous coronary intervention. *American Journal of Cardiology*. 査読有、109巻、2012、pp352-358  
DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.09.021
- ⑪ Kumagai S, Matsubara T(15番目/16名), et

- al. Impact of chronic kidney disease on the incidence of peri-procedural myocardial injury in patients undergoing elective stent implantation. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 査読有、27巻、2012、pp1059-1063  
DOI: 10.1093/ndt/gfr411
- ⑫ Sakakibara T, Matsubara T(14番目/15名), et al. Sirolimus-eluting stent vs. everolimus-eluting stent for coronary intervention in patients on chronic hemodialysis. *Circulation Journal*, 査読有、76巻、2012、pp351-355  
DOI: 10.1253/circj.CJ-11-0814
- ⑬ Ishii H, Matsubara T(11番目/12名), et al. Percutaneous coronary intervention with bare metal stent vs. drug-eluting stent in hemodialysis patients. *Circulation Journal*, 査読有、76巻、2012、pp1609-1615  
DOI: 10.1253/circj.CJ-12-0078
- ⑭ Hayano S, Matsubara T(9番目/10名), et al. Relation between estimated glomerular filtration rate and composition of coronary arterial atherosclerotic plaques. *American Journal of Cardiology*, 査読有、109巻、2012、pp1131-1136  
DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.11.052.
- ⑮ 森田一三, 野口俊英(4番目/8名), 松原達昭(5番目), 他. 5年間の追跡調査による歯周組織の状態とHbA1cの関連研究. *厚生*の指標、査読無、59巻、2012、pp1-8
- ⑯ Harada K, Matsubara T(12番目/13名), et al. Cardiac 64-multislice computed tomography reveals increased epicardial fat volume in patients with acute coronary syndrome. *American Journal of Cardiology*, 査読有、108巻、2011、pp1119-1123  
DOI: 10.1016/j.amjcard.2011.06.012
- ⑰ Amano T, Matsubara T(2番目/12名), et al. Impact of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids on coronary plaque instability: an integrated backscatter intravascular ultrasound study. *Atherosclerosis*, 査読有、218巻、2011、pp 110-116  
DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.030
- ⑱ Himeno T, Naruse K(3番目/17名), et al. Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes*, 査読有、60巻、2011、pp2397-2406  
DOI: 10.2337/db10-1462
- ⑲ Sugiura S, Noguchi T(10番目/11名), et al. Valproic acid increases susceptibility to endotoxin shock through enhanced release of HMGB1. *Shock*, 査読有、36巻、2011、pp494-500  
DOI: 10.1097/SHK.0b013e31822f7e58
- ⑳ Amano T, Matsubara T(2番目/12名), et al. Lipid-rich plaque predict non-target-lesion ischemic events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. — Insights from integrated backscatter intravascular ultrasound —. *Circulation Journal*, 査読有、75巻、2011、pp157-166  
DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0612
- ㉑ Hamaguchi Y, Matsubara T(4番目/5名), et al. Imipramine inhibition of TPRM-like plasmalemmal  $Mg^{2+}$  transport in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 査読有、15巻、2011、pp593-601  
DOI:10.1111/j.1582-4934.2010.01024.x.
- ㉒ Nakatochi M, Naruse K(9番目/12名), Matsubara T(10番目), et al. The ratio of adiponectin to homeostasis model assessment of insulin resistance is a powerful index of each component of metabolic syndrome in an aged Japanese population: Results from KING Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 査読有、92巻、2011、e61-e65  
DOI: 10.1016/j.diabres.2011.02.029.
- ㉓ Nakamura N, Naruse K(2番目/15名), Matsubara T(13番目), et al. High glucose impairs the proliferation and increases the apoptosis of endothelial progenitor cells by suppression of Akt. *Journal of Diabetes Investigation*, 査読有、2巻、2011、pp262-270  
DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00093.
- ㉔ Suzuki J, Naruse K(4番目/13名), et al. Palmitate induces apoptosis in Schwann cells via both ceramide-dependent and independent pathways. *Neuroscience*, 査読有、176巻、2011、pp188-198  
DOI:10.1016/j.neuroscience.2010.11.035.
- ㉕ Ando H, Matsubara T(3番目/14名), et al. Comparison of tissue characteristics between acute coronary syndrome and stable angina pectoris: An integrated backscatter intravascular ultrasound analysis of culprit and non-culprit lesions. *Circulation Journal*, 査読有、75巻、2011、pp383-390  
DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0815
- ㉖ Tanimura D, Naruse K(13番目/15名), Matsubara T(14番目), et al. Relation of

- a common variant of the adiponectin gene to serum adiponectin concentration and metabolic traits in an aged Japanese population. *European Journal of Human Genetics*, 査読有、19巻、2011、pp262-269  
DOI: 10.1038/ejhg.2010.201
- ②⑦ Naruse K(1番目/13名), Kobayashi Y(6番目), Matsubara T(11番目), et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy *PLoS One* 6:e27458, 2011.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0027458.
- ②⑧ Harada K, Matsubara T(12番目/13名), et al. Accuracy of 64-slice multidetector computed tomography for classification and quantitation of coronary plaque: Comparison with integrated backscatter intravascular ultrasound. *International Journal of Cardiology*, 149巻、2011、pp95-101  
DOI: 10.1016/j.ijcard.2010.04.002.
- ②⑨ Yamada S, Matsubara T(17番目/18名), et al. Prognostic value of reduced left ventricular ejection fraction at start of hemodialysis therapy on cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease patients. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, 査読有、5巻、2010、pp1793-1798  
DOI: 10.2215/CJN.00050110.
- ③⑩ Arai K, Matsubara T(14番目/15名), et al. Volumetric analysis of coronary plaque characterization in patients with metabolic syndrome using 64-slice multi-detector computed tomography. *Circulation Journal*, 査読有、74巻、2010、pp2146-2151、  
DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0219
- ③⑪ Nakashima E, Naruse K(5番目/11名), et al. Association of resistin polymorphism, its serum levels and prevalence of stroke in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Diabetes Investigation*, 査読有、1巻、2010、pp154-158  
DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00040.x
- ③⑫ Kikuchi T(1番目/9名), et al. Anti-phosphorylcholine opsonized low-density lipoprotein promotes rapid production of proinflammatory cytokines by dendritic cells and natural killer cells. *Journal of Periodontal Research*, 査読有、45巻、2010、pp720-730  
DOI:10.1111/j.1600-0765.2010.01292.x
- ③⑬ 菊池 毅(1番目/4名)、野口俊英(4番目)、他. 糖尿病と歯周病の関係は？、糖尿病の人は歯周病になりやすいですか？Q&A 分かる肥満と糖尿病. 査読無、19巻、2010、pp724-726
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Miyajima S: Periodontitis Activates Tumor Necrosis Factor-Alpha-Mediated Inflammatory Responses and Increases Monocyte Adhesion to Aortic Endothelial Cells. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (Yokohama), 2013.3.23.
- ② Nakamura N: Impact of insulin on experimental periodontitis in diabetic rats. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Kyoto), 2012.11.27.
- ③ Naruse K: Impact of human dental pulp stem cell transplantation on diabetic polyneuropathy. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (Kyoto), 2012.11.27.
- ④ Uetani T: Association between estimated GIR, novel marker of insulin sensitivity and lipid-rich coronary plaques: An integrated backscatter intravascular ultrasound (IB-IVUS) analysis. American Heart Association, Scientific Sessions 2012(Los Angeles), 2012.11.5.
- ⑤ Hata M: Effect of human dental pulp stem cell transplantation on diabetic polyneuropathy. 48th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes(Berlin), 2012.10.4.
- ⑥ Naruse K: Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves sensory disorders in the early stage of streptozotocin-induced diabetes in rats. 48th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes(Berlin), 2012.10.4.
- ⑦ Naruse K: Transplantation of human dental pulp stem cells ameliorates diabetic polyneuropathy in mice. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (Yokohama), 2012.6.15.
- ⑧ Hayano S: Tissue characterization of coronary plaque in patients with

- renal dysfunction. American Heart Association, Scientific Sessions 2011 (Orlando), 2011.11.15.
- ⑨ Kumagai S: Differences in pathophysiology of plaques between target lesion and non-target lesion events after successful percutaneous coronary intervention : Insights from integrated backscatter intravascular ultrasound. American Heart Association, Scientific Sessions 2011 (Orlando), 2011.11.15.
- ⑩ Harada K: Differential association of epicardial fat with coronary plaque in patients with acute coronary syndrome or stable angina pectoris : Analysis by integrated backscatter in intravascular ultrasound. American Heart Association, Scientific Sessions 2011 (Orlando), 2011.11.15.
- ⑪ Nishikawa T: Mechanisms of the progress in periodontitis under the diabetic condition. American Academy of Periodontology, Annual Meeting 2011 (Miami Beach), 2011.11.13.
- ⑫ Nishikawa T: Mechanisms of the progress in periodontitis under the diabetic condition. 71st Scientific Sessions American Diabetes Association (San Diego), 2011.6.26.
- ⑬ 松原達昭: 歯周病と心臓病 「歯周病の予防が全身の健康を守る! ~ 医科と歯科の立場から」. 第8回日本口腔ケア学会総会・学術大会 市民公開シンポジウム(東京)、2011.6.18.
- ⑭ Ishii H: Prognostic values of C-reactive protein levels on clinical outcome after endovascular therapy in hemodialysis patients with peripheral artery disease. American Heart Association, Scientific Sessions 2010 (Chicago), 2010.11.15.
- ⑮ Amano T: The ratio of eicosapentaenoic acid to arachidonic acid is associated with lipid-rich coronary plaque. American Heart Association, Scientific Sessions 2010 (Chicago), 2010.11.15.
- ⑯ 小林泰子: 歯周病患者における歯周病の重症度と血糖関連パラメーターの関係. 第25回日本糖尿病合併症学会 (大津)、2010.10.23.
- ⑰ Naruse K: mRNA Expression levels of aldose reductase in peripheral blood-derive mononuclear cells influences

intima-media thickness in type 2 diabetic patients. 70th Scientific Sessions American Diabetes Association (Orlando), 2010.6.27.

〔図書〕 (計3件)

- ① 成瀬桂子、医学書院、今日の治療指針 2011、2011、pp643-647
- ② 松原達昭、時事通信社、糖尿病 UP・DATE 賢島セミナー 対糖尿病戦略のイノベーション- 成因から管理、治療まで-. 2010、pp42-51
- ③ 成瀬桂子、血管内皮細胞機能、糖尿病性細小血管症(第2版) - 発症・進展抑制の最前線-. 2010、pp568-572

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 歯肉炎の予防又は治療のための医薬  
 発明者: 松原達昭, 成瀬桂子, 野口俊英,  
 大野紀和, 水谷誠, 西川徹,  
 日比千尋

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-83439

出願年月日: 2012.4.2

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 達昭 ( MATSUBARA TATSUAKI )  
 愛知学院大学・歯学部・教授  
 研究者番号: 30209598

### (2) 研究分担者

成瀬 桂子 ( NARUSE KEIKO )  
 愛知学院大学・歯学部・准教授  
 研究者番号: 30387576  
 小林 泰子 ( KOBAYASHI YASUKO )  
 愛知学院大学・歯学部・講師  
 研究者番号: 40418926  
 野口 俊英 ( NOGUCHI TOSHIHIDE )  
 愛知学院大学・歯学部・教授  
 研究者番号: 50014262  
 菊池 毅 ( KIKUCHI TAKESHI )  
 愛知学院大学・歯学部・講師  
 研究者番号: 40421242