

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659823

研究課題名(和文) 肝炎誘発性口腔細菌の同定とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of oral bacteria on hepatitis

研究代表者

和田 孝一郎 (WADA, Koichiro)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90263467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：我々は肝炎を誘発する可能性のある口腔細菌、口腔細菌由来物質の同定と、そのメカニズムの解析を目的として研究を行った。この結果、*P. gingivalis* が高脂肪食負荷したマウスに脂肪性の肝炎を誘発することを見出した。更に脂肪食負荷を続けると、ヒトの非アルコール性脂肪肝炎と同様の病状を示すことを見出した。これらの病態は歯周病菌自体が肝臓に到達しなくても、歯周病菌の産生するエンドトキシン(LPS)自体によっても肝炎が起こることも見出した。これらのLPSによるNASH発症の分子メカニズムの解明も行い、多くの国際的学術雑誌に報告したほか、多数の学会でも報告した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of oral bacteria-related substances on the development of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). We found that *P. gingivalis*-related substances such as lipopolysaccharide (LPS) induced the pathogenesis of NASH on mice under high-fat diet condition. We found the potential mechanisms about the high-fat diet-induced and LPS-stimulated NASH on mice like that leptin-mediated hypersensitivity against LPS was involved in the mechanism. These findings are very important for the prevention of NASH, and we reported such findings to many high-level journals such as "Cell Metabolism".

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：肝炎 口腔細菌 LPS NASH 患者 マウス 脂肪蓄積 レプチン

1. 研究開始当初の背景

肝臓の炎症を主症状とする肝炎は、臨床ももっとも頻度が高い疾患の一つである。その主な原因としてアルコール性、薬物性、ウイルス性、脂肪性などが挙げられるが、原因不明の肝炎もかなりの割合を占めている。慢性的な肝炎は、肝硬変など重篤な状態に進展する場合が多い。それ故に肝炎の発症原因を明らかにし、その発症を予防することは、医療全体において非常に重要である。

最近我々は、特殊な口腔細菌が脳出血を引き起こすことを発見し、**Nature Communications** に報告した。これらの一連の研究過程で、特殊な口腔細菌が肝臓の細胞内に生存状態で取り込まれていることを見出した。しかしながらこの取り込みにより肝炎が誘発されるのか、また、取り込まれる口腔細菌の特徴とメカニズムは何か、など不明な点が多いのが現状である。

この様に、これまでに肝炎と口腔細菌との直接的な関連性を証明した報告は全くなく、また、当然のことながらそのメカニズムなども報告されていない。本研究により得られる成果は、将来的な肝炎発症リスクの軽減につながる可能性が高く、単に歯科分野だけでなく臨床分野への応用も期待でき、国民の健康福祉増進にとって非常に意義があると考えられた。それ故に本課題に関する研究を行う価値は高いと考えられた。

2. 研究の目的

近年、口腔細菌による全身疾患誘発に注目が集まっている。我々は脳出血を誘発する特殊な口腔細菌が存在することを発見し、**Nature Communications** に報告した。この菌の保菌者は脳出血のリスクが4倍に高まることが確認された。この他にも循環系を中心に研究がすすめられているが、他の疾患発症への関与については不明な点が多い

我々は特殊な口腔細菌が肝臓の細胞内に生存状態で取り込まれていることを見出した。この肝実質細胞内への取り込みにより炎症性サイトカインの産生が増加しており、肝炎を誘発している可能性が考えられた。そこで本研究では、これまで我々が得た知見とノウハウを基に、「口腔細菌の肝臓への取り込み」の可能性と、その結果としての「肝炎誘発メカニズムの解明」を主な目的とする挑戦的な研究である。

3. 研究の方法

本研究の計画としては、「肝臓へ特異的に取り込まれる口腔細菌の同定とその特徴」、「肝臓への特異的取り込みメカニズムと、肝炎誘発メカニズムの解明」、という二つの方面を軸として、これまで我々が得た知見とノウハ

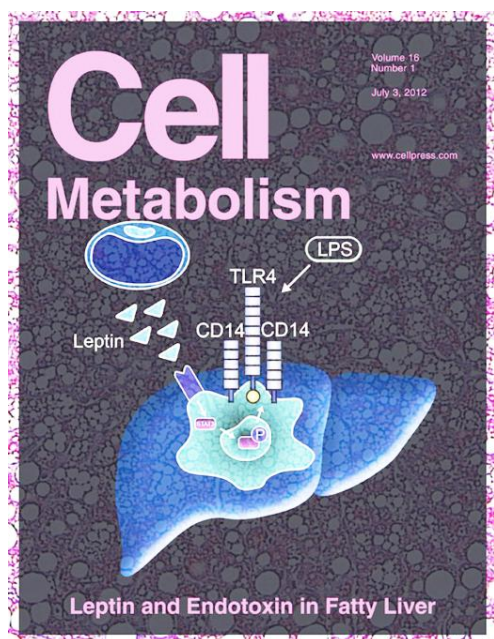
ウを基に研究を進めた。まず初めに、発症原因が明らかでない肝炎患の唾液から特殊な高病原性口腔細菌が検出できるかどうかを検討した。患者唾液サンプルの解析は厚生労働省の基準に合致した倫理委員会の審査・認可を得たうえで行った。また、資料提供においては十分なインフォームドコンセンツの後、文書による同意を得た上で行った。次にこれらの高病原性の口腔細菌の性状を検討したうえで、同時に単離した特殊な口腔細菌を動物モデルに投与し、実際に肝炎が発症するかどうかの確認を行った。さらに肝臓への特異的取り込みメカニズム・肝炎発症メカニズムの解明のため、「*in vitro*」での検討、「*in vivo*」動物モデルでの評価、「臨床サンプルを用いた解析」、などを多元的に組み合わせて研究を遂行した。

4. 研究成果

我々は肝炎を誘発する可能性のある口腔細菌、あるいは口腔細菌由来物質の同定と、そのメカニズムの解析を目的として研究を進めてきた。この結果、歯周病菌のうちで *Porphyromonas gingivalis* が肝炎患者の唾液中で高頻度に検出された。特にヒトの非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) では、健常人に比べて約4倍のオッズ比が認められた。そこでこの *Porphyromonas gingivalis* を高脂肪食負荷したマウスに感染させたところ、劇的な脂肪性肝炎を誘発することを見出した。更に歯周病菌投与後、高脂肪食負荷を一定期間続けると、ヒト NASH と同様の病状を示すことを見出した。NASH は近年、その患者数が劇的に増加しており、その発症メカニズムを解明し、予防・治療法を確立することが急務となっている。それ故に我々の見出した知見は非常に重要であると考えられる。

さらに研究を進めた結果、NASH の病態は、歯周病菌自体が肝臓に到達しなくても、歯周病菌や腸内細菌などのグラム陰性菌が産生するエンドトキシン (Lipopolysaccharide, LPS) 自体によっても肝炎が起こることを見出した。すなわち、高脂肪食負荷のマウスにごく微量の LPS を投与することにより、ヒトの病態に近い脂肪性肝炎を誘発することができた。これらの LPS による NASH 発症の分子メカニズムの解明を行ったところ、レプチンによるシグナル伝達が肝臓での表面高原 CD14 の発現を増加させ、その結果として LPS の感受性を大きく高めることを明らかにした。この結果、ヒト NASH と同じ病態をマウスで再現することができた。すなわち口腔細菌や腸内細菌が産生するごく微量の LPS が大きな反応性を示すことが明らかになった。さらにヒト患者サンプルを用いた解析から、我々の提示したメカニズムの正確性が証明された。

これらの成果を多くの国際学会、ならびに外国雑誌に発表したが、そのうちの一つ **Cell Metabolism** に掲載された我々の論文は非常に高い評価をうけ、その表紙を飾ることとなった (挿入図 参照)。



さらに研究を進めた結果、LPS のシグナルを授受する表面高原の一種の CD14 が一部可溶化し、血液中に流出する可能性も見出した。この可溶性の CD14 が NASH 発症を予測する重要なマーカーとなりうる可能性も明らかとなった。

これまで口腔細菌が全身疾患の発症に関連している可能性が指摘されていたが、肝炎発症との因果関係は明らかではなかった。本研究から我々は、「口腔細菌による肝炎誘発」という新しい疾患の概念を提唱することができた。その成果は「胃潰瘍における *Helicobacter pylori*」と同じように、特殊な肝炎誘発性細菌も将来的な除菌療法適応の対象となる可能性を提唱するものであり、臨床的な意義は非常に大きいと考えられる。今後、本研究をさらに発展させることにより、肝炎の発症予防・劇症化の治療へとつながる可能性が高いと考えられ、国民の健康福祉にさらなる寄与ができるものと考えられる。

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 11 件)

1. Imajo K, Yoneda M, Fujita K, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Shinohara Y, Sekino Y, Mawatari H, Nozaki Y, Kirikoshi H, Taguri M, Toshima G, Takahashi J, Saito S, Wada K,

Nakajima A.: Oral choline tolerance test as a novel noninvasive method for predicting nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Gastroenterology* 49: 295-304, 2014. (査読あり)
doi: 10.1007/s00535-013-0776-3.

2. Imajo K, Yoneda M, Ogawa Y, Wada K, Nakajima A.: Microbiota and nonalcoholic steatohepatitis. *Seminars in Immunopathology* 36: 115-132, 2014. (査読あり)
doi: 10.1007/s00281-013-0404-6.
3. Lee D, Wada K, Taniguchi Y, Al-Shareef H, Masuda T, Usami Y, Aikawa T, Okura M, Kamisaki Y, Kogo M.: Expression of fatty acid binding protein 4 is involved in the cell growth of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 31: 1116-1120, 2014. (査読あり)
doi: 10.3892/or.2014.2975.
4. Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Shinohara Y, Kato S, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Kirikoshi H, Maeda S, Saito S, Wada K, Nakajima A.: Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 8(6): e65211, 2013. (査読あり)
doi: 10.1371/journal.pone.0065211.
5. Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Maeda S, Sumida Y, Hyogo H, Eguchi Y, Wada K, Nakajima A.: Rodent models of nonalcoholic Fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 21833-21857, 2013. (査読あり)
doi: 10.3390/ijms141121833.
6. Hirata K, Wada K, Murata Y, Nakajima A, Yamashiro T, Kamisaki Y.: Critical role of leukotriene B4 receptor signaling in mouse 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Lipids in Health and Disease*. 12: 122, 2013. (査読あり)
doi: 10.1186/1476-511X-12-122.
7. Imajo K, Fujita K, Yoneda M, Shinohara Y, Suzuki K, Mawatari H, Takahashi J, Nozaki Y, Sumida Y, Kirikoshi H, Saito S, Nakamura M, Matsuhashi N, Wada K, Nakajima A.: Plasma free choline is a novel non-invasive biomarker for early-stage non-alcoholic steatohepatitis: A multi-center validation study. *Hepatology Research* 42: 757-766, 2012. (査読あり)

- doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00976.x.
8. Hirata K, Katayama K, Nakajima A, Takada K, Kamisaki Y, **Wada K**: Role of leukotriene B4 receptor signaling in human preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 429: 197-203, 2012. (査読あり)
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.110.
 9. Ishimoto S, **Wada K**, Usami Y, Tanaka N, Aikawa T, Okura M, Nakajima A, Kogo M, Kamisaki Y.: Differential expression of aquaporin 5 and aquaporin 3 in squamous cell carcinoma and adenoid cystic carcinoma. *International Journal of Oncology* 41: 67-75, 2012. (査読あり)
doi: 10.3892/ijco.2012.1445.
 10. Ogawa Y, Yoneda M, Tomeno W, Imajo K, Shinohara Y, Fujita K, Shibata W, Kirikoshi H, Saito S, **Wada K**, Maeda S, **Nakajima A**.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma exacerbates Concanavalin A-induced liver injury via suppressing the translocation of NF-kB into the nucleus. *PPAR Research*. 2012: 940384, 2012. (査読あり)
doi: 10.1155/2012/940384.
 11. Imajo K, Fujita K, Yoneda M, Nozaki Y, Ogawa Y, Shinohara Y, Kato S, Mawatari H, Shibata W, Kitani H, Ikejima K, Kirikoshi H, Nakajima N, Saito S, Maeyama S, Watanabe S, **Wada K**, **Nakajima A**.: Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metabolism* 16: 44-54, 2012. (査読あり)
doi: 10.1016/j.cmet.2012.05.012.

[学会発表] (計 5 件)

1. 村田由香, **和田孝一郎**, 平田佳永, 山城隆. マイクロRNAによる脂肪細胞分化の制御. 第 87 回日本薬理学会年会. 3/19-21, 2014. 仙台.
2. Kessoku T, Imajo K, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Yoneda M, Kirikoshi H, Saito S, **Wada K**, **Nakajima A**. Resveratrol improves pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis through inhibition of endotoxin-induced liver damage. The 64th Annual Meeting of the

American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2013. 11/1-5, 2013, Washington DC, USA.

3. Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Tomeno W, Ogawa Y, Mawatari H, Kirikoshi H, Sumida Y, Hyogo H, Eguchi Y, **Wada K**, **Nakajima A**. Small dense low-density lipoprotein as a useful biomarker for predicting arteriosclerotic diseases in nonalcoholic steatohepatitis. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2013. 11/1-5, 2013, Washington DC, USA.
4. Imajo K, Hotta K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Shinohara Y, Suzuki K, Shibata W, Kirikoshi H, Saito S, **Wada K**, **Nakajima A**. Association between estrogen receptor alpha gene polymorphism and development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2012. 11/9-13, 2012, Boston, USA.
5. **和田孝一郎**. ここまでわかった口腔内細菌による全身疾患: 最新の研究と臨床知見: 非アルコール性脂肪肝炎発症のリスクファクターとしての口腔内細菌. 長崎市歯科医師会招待 教育講演. 9/13, 2012, 長崎.

[図書] (計 1 件)

1. **中島 淳**, 今城健人, 米田正人, **和田孝一郎**: 「非アルコール性脂肪肝炎におけるレプチンと腸内細菌の役割—レプチンによるエンドトキシン感受性の制御を中心として」. *糖尿病学 2013* (門脇 孝 編). 医学書出版 診断と治療社, 東京, pp 29-35, 2013.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 孝一郎 (WADA Koichiro)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：90263467

(2) 研究分担者

中島 淳 (NAKAJIMA Atsushi)
横浜市立大学・附属病院・教授
研究者番号：30326037