

平成 26 年 6 月 9 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：2012～2013

課題番号：24890138

研究課題名(和文) 歯性感染による非アルコール性脂肪性肝炎病態増悪メカニズムの解明と歯科治療の効果

研究課題名(英文) Elucidation of of non-alcoholic steatohepatitis exacerbation mechanism by dental infection and effects of dental treatment

研究代表者

古庄 寿子 (Furusho, Hisako)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：00634461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) が非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に及ぼす影響について検討した。P.g.由来物質(リポポリサッカライド:LPS、鞭毛成分、DNA)は自然免疫経路(TLR2,4,5,9)を活性化し、サイトカインやインフラマソームの発現を上昇させた。TLR2発現が上昇した脂肪肝ではTLR2のリガンドであるP.g.-LPSに対する感受性が高まり強い病原性を発揮すると考えられた。またP.g.歯性感染NASHモデルマウスの感染除去が肝臓の炎症性サイトカイン発現や炎症を改善し、歯科治療がNASHの治療戦略の1つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effect of *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) on non-alcoholic steatohepatitis (NASH) were examined. Various bacterial components (lipopolysaccharide;LPS, flagellin and DNA) activate natural immune pathways through TLR2, 4, 5 and 9, resulting in upregulation of inflammatory cytokine expression and inflammasome activation. In fatty liver, showing upregulation of TLR2 expression, the increased sensitivity of P.g.-LPS, which is TLR2 ligand, may cause stronger pathogenesis. Moreover, elimination of P.g.-odontogenic infection in P.g.-infected / high fat diet induced NASH mouse model reduced inflammatory cytokines expression and inflammatory cytokines expression and inflammation in liver. It indicates that dental therapy may have beneficial impact on management of NASH.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：P.gingivalis 歯性感染 NASH 免疫

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) は代表的慢性肝疾患で肥満に伴う脂肪肝から発生する。本邦でも内臓脂肪蓄積型肥満者やメタボリックシンドローム患者の増加に伴い NASH 発生率も増加傾向を示している (約 200 万人)。NASH は肝硬変・肝癌に進行する可能性があるため、予防・加療が必要であるが、まだ有効な治療法は無い。近年、NASH の病態進行と腸内細菌由来のリポポリサッカライド (LPS) との関連が注目されている。一方で歯周炎病巣では、歯周病原細菌および歯周病原細菌由来の LPS が血管に侵入し、全身健康状態に悪影響を及ぼすことが分かってきた。様々な歯周病原細菌のなかでも *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は心・血管系疾患、糖尿病、早期低体重児出産などに関係することが報告されているが、肝臓に対する影響は明らかにされていない。私はこれまでに歯性感染させた *P. gingivalis* がマウス脂肪肝において炎症や線維化を促進することを明らかにした。

2. 研究の目的

これまでの研究で、*P. gingivalis* を歯髄から感染させた高脂肪食誘導脂肪肝マウスの肝臓において、免疫組織化学的に肝細胞や Kupffer 細胞内に *P. gingivalis* が検出されることや、血清中の LPS 濃度が有意に上昇をすることを明らかにし、歯髄から感染した *P. gingivalis* が、血流を介して肝臓に至り、NASH の病態を進行させる可能性を示唆した。そこで本研究では、*P. gingivalis* が肝臓の炎症と線維化を促進するメカニズムを *in vitro* で明らかにするとともに、歯科治療による歯性感染原病巣の除去が NASH 形成・進行抑制に関わる可能性について調べることで、NASH 患者における歯科治療の意義を明らかにし、歯周病原細菌を標的とした新しい NASH の治療法方法の可能性を見出すことを

目的とする。

3. 研究の方法

1) *P. gingivalis* の病原因子が肝組織構成細胞に及ぼす影響の検討

肝組織構成細胞であるヒト肝細胞 (HC3716-hTERT 株)、ヒト肝筋線維芽細胞 (NPC2-hTERT 株)、ヒトマクロファージ (THP-1 株) を、*P. gingivalis* の病原因子 (LPS (1 μ /ml)、フラジェリン (100ng/ml)、CpG-DNA (1 μ M)) で刺激し、図 1 に示すように細胞回収を行い、炎症や線維化に関わるサイトカインの mRNA 発現を RT-PCR で調べた。

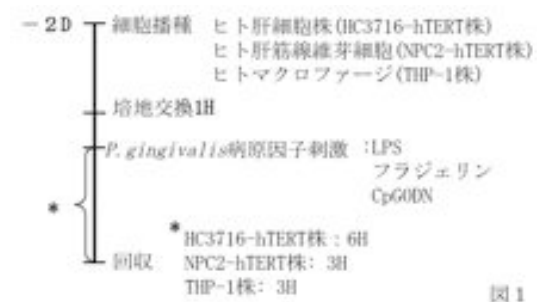


図 1

2) 肝細胞での脂肪化が *P. gingivalis* の誘導するサイトカイン発現に及ぼす影響の検討

ヒト肝細胞 (HC3716-hTERT 株) をパルミチン酸 (肥満者の血中で上昇する代表的な遊離脂肪酸) 0.4mM で 18 時間処理し、脂肪化肝細胞を作成した。パルミチン酸処理を行っていない細胞を非脂肪化肝細胞細胞とした。それぞれの細胞に *P. gingivalis*-LPS 刺激を加え、6 時間後に回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-2) について比較検討した (図 2)。

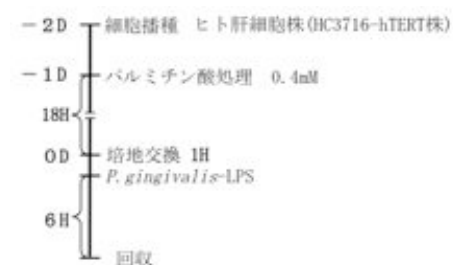


図 2

3) *P. gingivalis*-LPS および *E. coli*-LPS の脂肪化肝細胞における反応性の比較検討

非脂肪化, 脂肪化ヒト肝細胞(HC3716-hTERT株), ヒト肝筋線維芽細胞(NPC2-hTERT株), ヒトマクロファージ(THP-1株)に対し, *P. gingivalis*-LPS (1 μ g/ml) および *E. coli*-LPS (100ng/ml) 刺激を加え, 図3に示すように細胞回収を行い, 炎症性サイトカイン mRNA 発現を調べた.



4) *P. gingivalis* 菌性感染巣除去が高脂肪食誘導脂肪肝モデルマウスの肝臓へ及ぼす影響の検討

高脂肪食誘導脂肪肝モデルマウスの上顎第1臼歯歯髄を歯科用切削器具で露髄させた後(図4), *P. gingivalis* (W83株) 10^7 個を含ませた綿球を留置することで感染させた菌性感染後4週で感染菌を抜去することで感染巣を除去し, 処置群とした. また半数は感染巣を除去しない未処置群とした(図5). 処置2週後に肝臓を回収し, 各群における肝臓での炎症性サイトカイン mRNA 発現およびNLRP3活性化をRT-PCRで調べた. 肝組織標本を作成し, crown-like structure (CLS; 脂肪壊死に陥った肝細胞に対するマクロファージ集簇) 数を測定した.

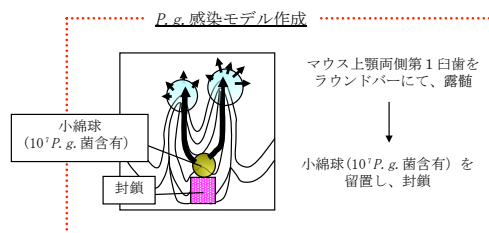


図4

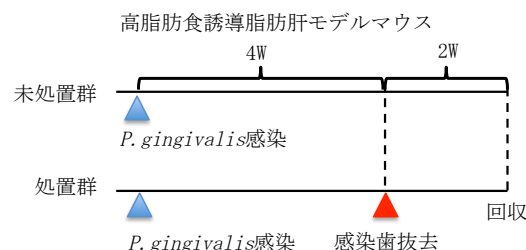


図5

4. 研究成果

1) *P. gingivalis* の病原因子が肝組織構成細胞に及ぼす影響の検討

ヒト肝細胞, ヒト肝筋線維芽細胞およびヒトマクロファージにおいて, LPS, フラジェリン, CpGODN 刺激で IL-1 β , IL-6 などの炎症性サイトカイン mRNA の発現上昇が誘導されたが, 細胞および病原因子により反応性の違いが見られた.

血清を介し肝臓に *P. gingivalis* の LPS だけではなく, フラジェリン, CpGODN 等の他の病原因子もまた自然免疫経路の活性化を介し肝組織構成細胞に対し影響を与え, 炎症の成立と線維化の促進に関わることが明らかとなった.

2) 肝細胞での脂肪化が *P. gingivalis* の誘導するサイトカイン発現に及ぼす影響の検討

パルミチン酸による脂肪化で *P. gingivalis*-LPS 受容体である TLR2 が著しく上昇した(図6). また, 脂肪化肝細胞では, IL-1 β , IL-6 等の炎症性サイトカインおよび NLRP3, Caspase-1(Casp1) 等のインフラマソ

ーム mRNA が軽度上昇していた (図 7). さらに, 非脂肪化肝細胞に比べ, 脂肪化肝細胞では *P. gingivalis*-LPS 刺激により IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α 等の炎症性サイトカインや NLRP3, Caspase-1 等のインフラマソーム mRNA 発現が著しく上昇した (図 7). よって, 脂肪化により肝細胞では TLR2 発現が上昇し, 肝細胞の *P. gingivalis*-LPS に対する感受性が高まり, 顕著な炎症性サイトカイン産生や NLRP3 インフラマソームの活性を誘導することが明らかとなった. 我々は以前, 高脂肪食誘導脂肪肝モデルマウスの肝組織において, *P. gingivalis*-LPS 受容体である TLR2 発現が著しく上昇していることを示している. 肥満者の脂肪肝では脂肪蓄積により, TLR2 発現上昇した肝細胞自体も, NASH 進行に積極的に関わると推察された. よって TLR2 経路をターゲットとした NASH 病態進行制御の可能性が示唆される.

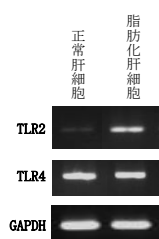


図 6 脂肪化による TLR2 の発現上昇

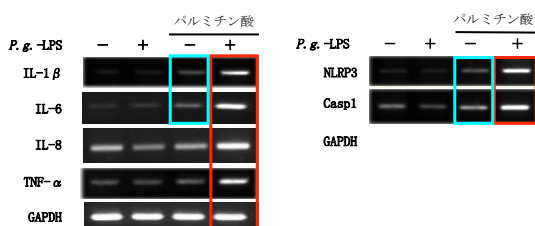


図 7 脂肪化肝細胞における

P. gingivalis-LPS 刺激の影響

3) *P. gingivalis*-LPS および *E. coli*-LPS の脂肪化肝細胞における反応性の比較検討

NASH 病態形成・進行に関与すると報告されて

いる大腸菌由来 LPS (*E. coli*-LPS) は *P. gingivalis*-LPS とは異なり, TLR4 を主に受容体とする. *E. coli*-LPS 刺激により検討した肝組織構成細胞での炎症性サイトカイン mRNA 発現は上昇したが, いずれの細胞においても脂肪化の影響は認められなかった (図 8). 一方, *P. gingivalis*-LPS 刺激時の炎症性サイトカイン mRNA 発現は非脂肪化細胞ではあまり変化しなかったが, 脂肪化した細胞では *P. gingivalis*-LPS 刺激で *E. coli*-LPS 刺激による発現に匹敵する著しい発現上昇が見られた. このことから脂肪肝では TLR2 経路を介し, 炎症や線維化により強く関わるという *P. gingivalis*-LPS の特殊性が明らかになった.

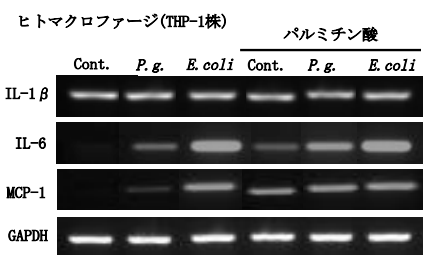
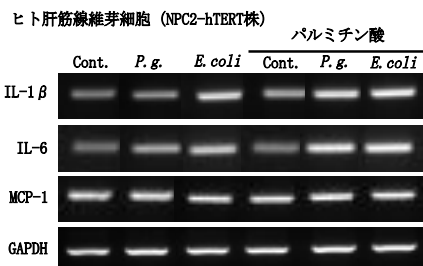
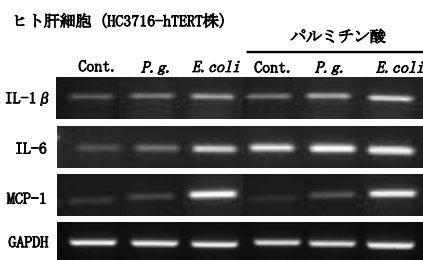


図 8 脂肪化肝構成細胞における *P. gingivalis* および *E. coli* LPS 刺激に対する反応の比較

4) *P. gingivalis* 菌性感染巣除去が高脂肪食誘導脂肪肝モデルマウスの肝臓へ及ぼす影響の検討

処置群の肝臓では、組織学的にマクロファージ、好中球などの炎症細胞浸潤の減少を認めた。図9はCLS数を示す。感染歯の抜去を行った5例中3例においてCLS数の減少がみられた。特に、組織学的に良好な改善の見られた2例では肝組織での炎症性サイトカイン(IL-1 β)およびインフラマソーム関連遺伝子(NLRP3)mRNAが顕著に減少していた(図9赤枠)。

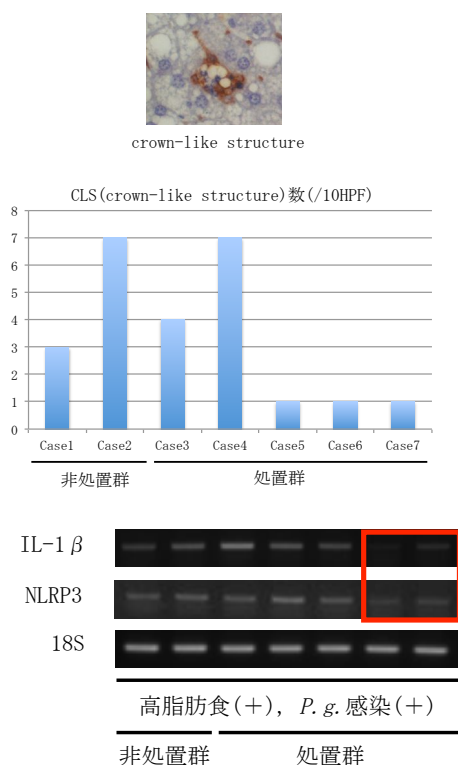


図9 感染歯抜去による肝組織への影響

以上の結果から歯性感染により肝臓に到達した *P. gingivalis* および *P. gingivalis*-LPS は、脂肪肝において TLR2-NF- κ B 経路や NLRP3-IL-1 β 経路を介して炎症性サイトカイン産生を上昇させ、炎症を増悪し、線維化を誘導することで NASH 病態を促進させることが明らかとなった。また、歯科治療による感染巣の除去は NASH の病態を改善する可能性が示唆された。よって歯科治療は NASH の病態進行を制御するための有効な治療戦略の1つとなる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. [Furusho H](#), Miyauchi M, Hyogo H, Inubushi T, Ao M, Ouhara K, Hisatune J, Kurihara H, Sugai M, Hayes CN, Nakahara T, Akikata H, Takahashi S, Chayama K, Takata T. Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol.* 2013 Nov;48(11):1259-70. doi: 10.1007/s00535-012-0738-1. Epub 2013 Jan 11. (査読あり)

[学会発表] (計1件)

1. [Furusho H](#), Miyauchi M, Ao M, Inubushi T, Takata T. Effect of *Porphyromonas gingivalis* on the progression non-alcoholic steatohepatitis. International Association of Dental Research General Session. (Seattle), March 20-23, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古庄 寿子 (FURUSHO, Hisako)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教
 研究者番号：00634461