

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862010

研究課題名(和文) 口腔細菌が関与する小児肥満における病原メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenic mechanisms related to child obesity associated with oral bacteria

研究代表者

仲 周平 (Naka, Shuhei)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10589774

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)：近年、アルコール非摂取者において過剰栄養摂取で生じる非アルコール性脂肪肝炎が注目されている。本研究では、非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスにおいて、高脂肪食によって軽度の肥満を誘発した状態である種の歯周病原性細菌や齲蝕病原細菌を頸静脈より投与した。すると、肝臓において酸化ストレスや炎症誘発に関連するサイトカインの発現上昇が生じ、通常48週程度で認められる脂肪肝炎の症状が、8週程度という短期間で生じた。これらのことから、ある種の口腔細菌の血液中への侵入が、非アルコール性脂肪肝炎の病状を悪化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) occurring in individuals who do not drink alcohol but consume excess calories has recently received attention. In the present study, several oral bacterial strains known to cause periodontitis or dental caries were administered via the jugular vein in NASH model mice in which slight obesity was induced by a high-fat diet. NASH conditions generally develop after 48 weeks in this model. However, elevated levels of cytokines associated with oxidative stress and inflammatory induction were identified within approximately 8 weeks after administration of specific oral bacterial strains. Thus, we speculated that NASH is aggravated following invasion of bloodstream by specific oral strains.

研究分野：小児歯科学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 歯周病 齲蝕 口腔細菌 サイトカイン マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯科領域における二大疾患の一つとして認識されており、デンタルプラーク中に存在している様々なグラム陰性細菌種による複合感染と考えられている。主な歯周病原性細菌としては、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Prevotella intermedia*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Tannerella forsythia*、*Campylobacter rectus* などが挙げられている。その中で、*P. gingivalis* が最も有力な歯周病原性細菌種であることは多くの研究者の支持する見解である。*P. gingivalis* はプラーク細菌、上皮細胞、歯周ポケット内成分などに付着することにより口腔へ定着するとされており、これらへの付着は、線毛 (フィンブリリン、FimA)、タンパク分解酵素、ペシクルなどの菌体表層成分を介した結合によるものであると考えられている。一方で、歯周病と各種全身疾患との関連が最近取りざたされており、歯周病原性細菌が糖尿病や動脈硬化等を引き起こすメカニズムが明らかになってきている。

齲蝕も歯科の二大疾患の一つとして広く認識されており、グラム陽性細菌の *Streptococcus mutans* が主要な病原細菌として知られている。一方で、*S. mutans* は抜歯などの侵襲的な歯科処置によって血液中に侵入すると、感染性心内膜炎を誘発する可能性があると考えられている。さらに、最近の研究成果からは、ある種の脳血管疾患や消化器疾患の増悪化にも関連している可能性が示されている。*S. mutans* の菌体表層には、歯面への初期付着に関連するタンパクである分子量約 190 kDa の Protein antigen (PA) や I 型コラーゲンに対する結合能を有する分子量約 120 kDa のコラーゲン結合タンパク (Cnm) の存在が明らかにされており、齲蝕に対する病原性の関与が示されている。

近年、生活習慣病の一つとされる脂肪肝に注目が集まっている。脂肪肝は大きくアルコール性と非アルコール性に分類され、非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、単純性脂肪肝 (Simple steatosis; SS) と非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) に分類されている。このうち NASH は、明確な飲酒歴が無いにもかかわらず、病理組織学的にアルコール性脂肪肝炎に類似する所見を呈するため、アルコール性肝障害とは全く違う病態として分類しようとして提唱されたのが始まりである。

NASH の発症に関しては、二つの段階を経て生じるという “Two-hit theory” という説が広く支持されている。まず、過剰栄養摂取によりメタボリックシンドロームに陥ってインスリン抵抗性が生じ、糖尿病や動脈硬化、高脂血症などが引き起こされるとともに SS が生じることがいわゆる “1st hit” とされている。その後、酸化ストレス、脂質過酸化

およびミトコンドリアの機能異常などの要因によって、肝臓における炎症性変化および線維化が誘発され、SS から NASH へと進展するのが、いわゆる “2nd hit” であると考えられている。

最近になって、歯科疾患と全身疾患との関連が注目され、これらを引き起こす口腔細菌が糖尿病や循環器系疾患に関わるメカニズムが明らかにされてきている。しかしながら、口腔細菌と脂肪肝との関連についての検討はほとんどなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯周病や齲蝕を引き起こす口腔細菌が NASH に与える影響に関して以下の点に注目して検討することにした。

- (1) NASH 患者口腔に存在する歯周病原性細菌種の検討
- (2) NASH モデルマウスにおける歯周病原性細菌株の及ぼす影響に関する検討
- (3) 齲蝕原性細菌との関連性の検討

## 3. 研究の方法

- (1) NASH 患者口腔に存在する歯周病原性細菌種の検討

研究に先立ち、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の審査を申請し承認を得た。また、研究に際しては、事前に研究内容を説明し同意を得た者のみを対象とした。

対象医療機関において NAFLD と診断を受けた患者 150 名 (NASH: 102 名、SS: 48 名) と大学職員のうち定期健康診断時の血清学的検査結果から脂肪肝であることが否定された 60 名から非刺激全唾液約 1mL の提供を受けた。この唾液サンプルから細菌ゲノム DNA の抽出を行い、6 種の歯周病原性細菌 (*P. gingivalis*、*T. denticola*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*、*T. forsythia*、*C. rectus*) に特異的なプライマーを用いた PCR 法にて、各菌種の存在を検討した。さらに、*P. gingivalis* 陽性サンプルに対しては、菌体表層の線毛 (FimA) をコードする *fimA* の遺伝子型を、それぞれの型に特異的なプライマーを用いた PCR 法によって特定した。

- (2) NASH モデルマウスにおける歯周病原性細菌株の及ぼす影響に関する検討

研究に先立ち、大阪大学大学院歯学研究科実験動物委員会に申請し承認を得た。

これまでに、6 週齢の C57BL/6J マウスに高脂肪食飼料 32 (総カロリーに占める脂肪由来カロリーの比率が 60% の高脂肪食) を摂取させ 48 週ほど経過すると、NASH に類似した所見を生じたとの報告がある。そこで、「*P. gingivalis* 株の静脈内投与が NASH の増悪化を引き起こすのではないかと」という仮説のもと、菌を投与後 8 週後や 12 週後といった比較的短い時期に屠殺をして解析するモデルを新規に構築した。また、この新規モデルに

においては、Two-hit theory でいうところの 2nd hit への関連の可能性を意識して、菌の投与に先立ち 4 週間ほど高脂肪食飼料 32 を摂取するものとした。使用する菌株としては、*P. gingivalis* のうち歯周病原性の強い株として知られている OMZ314 株とした。

### (3) 齶蝕原性細菌との関連性の検討

研究に先立ち、大阪大学大学院歯学研究科実験動物委員会に申請し承認を得た。

齶蝕原性細菌である *S. mutans* に関しては、口腔由来で様々な研究において広く標準株として用いられている MT8148 株および感染性心内膜炎患者からの血液分離株である TW871 株を用いて上記の新規構築モデルにおいて検討した。さらに、一定時間経過後に摘出した肝臓から RNA を抽出し、肝臓における発現遺伝子の変化をマイクロアレイによって網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) NASH 患者口腔に存在する歯周病原性細菌種の検討

NAFLD 群では *P. gingivalis* および *T. denticola* の保有率が対照群と比較して有意に高い値を示した。また、NAFLD 群における *P. gingivalis* 保有のオッズ比は 3.2 (95% 信頼区間: 1.6-6.3) であり、*T. denticola* 保有のオッズ比は 2.7 (95% 信頼区間: 1.2-5.7) であった。また、NAFLD 群の 150 名を NASH 群 102 名と SS 群 48 名に分類して再分析してみると、NASH 群の *P. gingivalis* の保有率は 52% となり、対照群の 22% と比較して有意に高い値を示した。また、NASH 群における *P. gingivalis* 保有のオッズ比は 3.9 (95% 信頼区間: 1.9-8.1) であった。一方で、SS 群の *P. gingivalis* の保有率は 35% であり、対照群より高い値を示したが有意差は認められなかった。これらのことから、*P. gingivalis* 等の歯周病原性細菌の保有が NASH の病態形成に影響している可能性が考えられた。

次に、NAFLD 群 150 名のうち *P. gingivalis* 陽性の 70 サンプルを用いて *fimA* の遺伝子型を特定したところ、その半数が II 型であり Ib 型および IV 型と続いた。これらの線毛タイプは、一般的に歯周病に対する病原性が高いものであるため、歯周病原性の高い *P. gingivalis* 株の保有が NASH の病態形成に関連している可能性が考えられた。

### (2) NASH モデルマウスにおける歯周病原性細菌株の及ぼす影響に関する検討

菌感染 8 週間および 12 週間におけるマウスを観察したところ、OMZ314 株感染群の体格は、いずれの期間でも対照群群と比較して大きく肥満しており、OMZ314 株感染群の体重はどの期間でも対照群と比較して有意に高い値を示した。また、OMZ314 株感染群の肝重量を測定すると、菌感染 8 週間および 12 週間において、対照群と比較して有意に高い

値を示した。屠殺時のマウスより採取した肝臓を観察したところ、いずれの週においても、OMZ314 株感染群の肝臓は対照群の肝臓と比較して明らかに肥大しており、表面は白色を呈していた。また、肝重量を体重比に換算し同様の分析を行った場合においても、OMZ314 株感染群の肝体重比は、どの期間でも対照群と比較して有意に高い値であった。さらに、菌感染 12 週後の OMZ314 株感染群の肝臓の病理組織学的診査からは、大滴性の脂肪化や著明な局所の炎症細胞浸潤をはじめ肝実質の局所においては初発線維化像が認められた。これらのことから、歯周病原性の高い *P. gingivalis* 株が血液中に侵入することにより、肝臓での脂肪蓄積の促進および線維化の誘発を引き起こし NASH を増悪化させる可能性が示唆された。

### (3) 齶蝕原性細菌との関連性の検討

TW871 株感染群の体重は、対照群および MT8148 株感染群と比較して有意に高い値を示した。また、屠殺時に採取した肝臓を観察したところ、TW871 株感染群では、対照群および MT8148 株感染群と比較して明らかに肥大して表面は白色を呈しており、肝臓重量は有意に高い値を示した。菌感染 12 週後の TW871 株感染群の肝臓では、大滴性の脂肪化を認めるようになった。菌感染 12 週後の TW871 株感染群の肝臓組織実質もしくは血管周囲において明確な線維化を認めた。さらに、TW871 株感染群の感染後のマウス肝臓組織における遺伝子発現の分析を行うと、酸化ストレスに関連するサイトカインであるメタロチオネイン、脂肪蓄積に関連するアポリポタンパク、炎症性サイトカインであるインターロイキンおよびインターフェロン・ガンマの上昇が認められた。以上のことから、過剰栄養摂取により脂肪肝となっている状態において、血液中に侵入した TW871 株は肝臓組織中の脂肪蓄積促進や炎症および酸化ストレスの促進に関与するサイトカインの発現を上昇させることで、病状を悪化させる可能性が示唆された。

## 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 7 件)

1. Nomura R, Naka S, Nemoto H, Inagaki S, Taniguchi K, Ooshima T, Nakano K. Potential involvement of collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* in infective endocarditis. Oral Dis. 19: 387-393, 2013.
2. Lapirattanakul J, Nomura R, Nemoto H, Naka S, Ooshima T, Nakano K. Multilocus sequence typing of *Streptococcus mutans* with *cbm* gene encoding a novel collagen-binding

- protein. Arch Oral Biol. 58: 989-996, 2013.
3. Nomura R, Naka S, Nemoto H, Otsugu M, Nakamura S, Ooshima T, Nakano K. Potential high virulence for infective endocarditis in *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins but lacking PA expression. Arch Oral Biol. 58: 1627-1634, 2013.
  4. Kojima A, Nomura R, Naka S, Okawa R, Ooshima T, Nakano K. Aggravation of inflammatory bowel diseases by oral streptococci. Oral Dis. 20: 359-366, 2014.
  5. Naka S, Nomura R, Takashima Y, Okawa R, Ooshima T, Nakano K. A specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. Oral Dis. 20: 700-706, 2014.
  6. Nomura R, Otsugu M, Naka S, Teramoto N, Kojima A, Muranaka Y, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, Nakano K. Contribution of the interaction of *Streptococcus mutans* serotype *k* strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. Infect Immun. 82: 5223-5234, 2014.
  7. 仲 周平 非アルコール性脂肪肝炎悪化に対して口腔細菌の及ぼす影響 小児歯誌 53: 365-370, 2015.

[学会発表] (計7件)

1. Naka S, Nomura R, Ooshima T, Nakano K. Specific *Streptococcus mutans* strain aggravates non-alcoholic fatty liver disease. 91st IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2013.3.20, Seattle, USA.
2. 仲 周平, 野村良太, 仲野和彦 非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスにおける *Streptococcus mutans* の病原性の検討 第51回日本小児歯科学会大会 2013.5.23, 岐阜.
3. Naka S, Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Virulence of *Streptococcus mutans* strains for the development of Non-alcoholic fatty liver disease. 60th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress, 2013.7.3, Liverpool, UK.
4. 仲 周平 非アルコール性脂肪肝炎における口腔細菌の役割に関する研究 第52回日本小児歯科学会大会 2014.5.16, 東京.
5. Naka S, Kajiwara R, Nomura R, Nakano K. Protein antigen of *Streptococcus mutans* contribute aggravation of Non-alcoholic steatohepatitis. 92nd IADR (International Association of Dental Research) Meeting,

- 2014.6.25-28, Cape Town, South Africa.
6. Naka S, Misaki T, Kuroda K, Nomura R, Nakano K. Prevalence of *Streptococcus mutans* with collagen-binding IgA-nephropathy patients. 93rd IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2015.3.11-14, Boston, USA.
7. Kajiwara R, Naka S, Nomura R, Nakano K. Immunochemical Evaluation of *Streptococcus mutans*-induced Non-alcoholic steatohepatitis mouse model. 93rd IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2015.3.11-14, Boston, USA.

[図書] (計0件)

[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

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/%7Epedo/research/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲 周平 (NAKA, Shuhei)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10589774