

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893079

研究課題名(和文) 腸管を介した歯周炎-メタボリックシンドローム病因論 TRPチャネルの関与

研究課題名(英文) The Periodontal-Metabolic syndrome etiology via the intestine -the role of TRP channels-

研究代表者

野中 由香莉 (NONAKA, Yukari)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：40710520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎は歯周病原細菌による感染症であるが、糖尿病、動脈硬化性疾患、非アルコール性脂肪性肝疾患などの全身疾患のリスクファクターであることが明らかにされている。Ca透過性の陽イオンチャネルの一種であるTRPチャネルは炎症応答やメタボリックシンドロームの発症や進行において重要性が注目されている分子である。本研究結果から、歯周病原細菌感染に際しTRPV1は肝臓において炎症応答及び脂質代謝機能を制御する働きを持つことが示された。すなわち、歯周炎から全身に波及する病態形成にTRPチャネルが関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis as periodontal bacterial infection has been implicated as a risk factor for diabetes, atherosclerotic vascular diseases, and non-alcoholic fatty liver disease. TRP channels are Ca<sup>2+</sup> permeable cation channels, which play an important role in the pathogenesis and progression of inflammatory responses and metabolic disorders. The present study has demonstrated that TRPV1 can regulate inflammatory responses and lipid metabolism in the liver. This result suggests that TRP channel may affect the pathological mechanism of systemic diseases caused by periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 TRPチャネル

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎により冠動脈疾患、糖尿病など、メタボリックシンドロームと関連した疾患のリスクを高めることが疫学研究、症例対照研究、動物実験などで報告されている。因果関係を証明する生物学的メカニズムは明らかになっていないが、全身的な軽微な炎症状態が重視されている。我々の研究グループではこれまでに歯周炎とメタボリックシンドロームとの関連、さらにはメタボリックシンドロームと腸内細菌叢の変化が関係していることを示してきた。すなわち、細菌叢の変化が引き起こす透過性の亢進により腸管から体内に侵入したグラム陰性細菌由来リポ多糖(LPS)が血中で上昇する代謝性内毒素血症 (Metabolic endotoxemia) がひとつの原因となつて全身の臓器に炎症が誘導されていると考えている。これらの腸管を介した歯周病原細菌による全身への炎症誘導メカニズムを解明するにあたり、その鍵となる分子として TRP チャンネルがあげられる。TRP チャンネルはカルシウムイオンの流入を通して細胞の分化・増殖、細胞死、筋収縮といった多様な細胞応答に関与する分子であり、炎症反応や糖尿病、動脈硬化性疾患などの様々な疾患の発症や進行における TRP チャンネルの重要性が注目されている。TRP チャンネルは腸管だけでなくメタボリックシンドロームに関連する肝臓や脂肪組織などにおいても発現が報告されており、これらのチャンネルを介して歯周病原細菌感染によって誘導される炎症や脂質の代謝異常が調節されている可能性が考えられることから本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

歯周病原細菌が腸内細菌叢の変化を介して代謝性内毒素血症の誘導を引き起こすという仮説に基づき、感染により肝臓や脂肪組織などの代謝組織の異常が生じ、全身の臓器に炎症状態を惹起しているというメカニズムへの TRP チャンネルの関与を明らかとする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯周病原細菌感染モデルマウスにおける TRP チャンネル発現の解析

歯周病原細菌の経口感染モデルを使用する。菌の感染方法は6週齢の C57BL/6 マウスに代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* W83 株の生菌  $1 \times 10^9$  CFU をカルボキシメチルセルロースに懸濁させた状態でフィーディングニードルにて経口的に投与する。菌の接種は一週間に2回、計10回行う。感染終了後、腸管、肝臓、脂肪組織などの各組織サンプルを回収し、TRP チャンネルの遺伝子発現の変動を q-PCR 法にて解析した。

#### (2) 肝細胞における TRPV1 チャンネルの機能解析

ヒト肝臓由来細胞株である HepG2 を用い、各種 TLR 刺激を加え、TRPV1 遺伝子発現の変動を検討した。さらに、炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  の産生、また脂質代謝関連遺伝子発現への TRPV1 チャンネルの関与を明らかとするため、TRPV1 アゴニスト及びアンタゴニストを加えたときの各遺伝子の発現変動を q-PCR 法にて解析した。

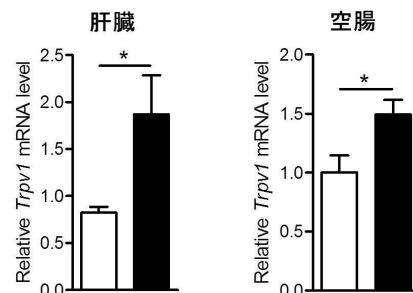
### 4. 研究成果

#### (1) 歯周病原細菌感染モデルマウスにおける TRP チャンネル発現の解析

歯周病原細菌経口感染モデルマウスを用いて、腸管、肝臓、脂肪組織など各臓器における各種 TRP チャンネルの発現について解析を行った。

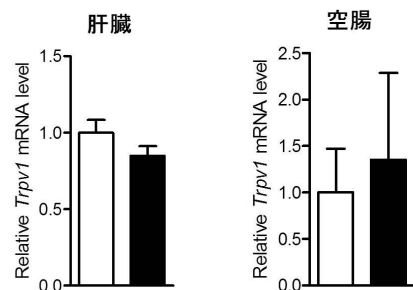
その結果、*P. gingivalis* 生菌感染により肝臓における TRPV1 チャンネルの発現が有意に上昇した。また、空腸においても感染による TRPV1 チャンネルの発現の上昇が認められた。脂肪組織においては有意な差は認められなかった。(図1)

(図1) 生菌感染時の肝臓、空腸における TRPV1 発現



また、熱処理を加えた死菌を用いて同様の方法で感染を行ったところ、生菌感染で認められた発現の変化は認められなかった(図2)。

(図2) 死菌感染時の各臓器における TRPV1 発現

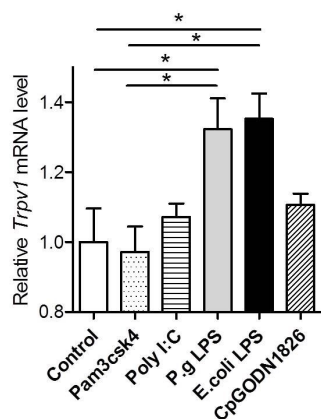


以上の結果から、*P. gingivalis* の経口感染により TRPV1 チャンネルの発現が肝臓や腸管において誘導されること、またこれらの TRPV1 チャンネル発現の上昇には菌の生死による菌体成分の変化や誘導される炎症の強さが関係している可能性が示唆された。

(2) 肝細胞における TRP チャンルの機能解析

上記(1)で明らかになった感染により TRPV1 発現が誘導されるメカニズム及び、感染時における TRPV1 の機能を明らかとするため、in vitro でヒト肝臓由来細胞株である HepG2 を用い、各種 TLR 刺激を加えた際の TRPV1 発現の変動を q-PCR 法にて検討した。その結果、TLR4 リガンドである LPS によって発現が有意に上昇することが明らかとなった。(図3)

(図3) 各種 TLR 刺激による TRPV1 発現

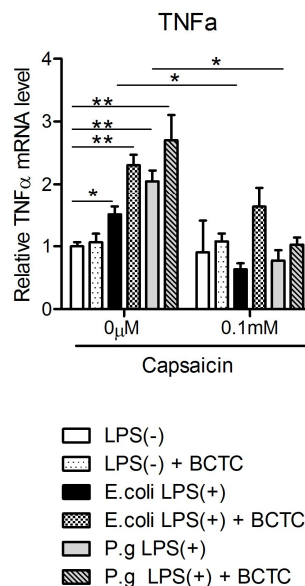


さらに、このとき LPS 刺激によって誘導される炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  の産生に TRP チャンルが関与しているのかを明らかとするため、TRPV1 チャンルに対するアゴニスト (Capsaicin)、アンタゴニスト (BCTC) を使用し、細菌由来の刺激に対する TRP チャンルの炎症調節作用について遺伝子レベルでの解析を行った。その結果、TRPV1 アゴニストにより TNF $\alpha$  の発現は抑制され、反対にアンタゴニストにより発現が促進された(図4)。

すなわち、TRPV1 チャンルの活性化により炎症性サイトカイン産生が抑制されることが示された。ここから、TRPV1 チャンルは肝細胞において、細菌由来の刺激に対する炎症応答についてネガティブフィードバックの働きを持つことが示唆された。

また、肝臓においては *P. gingivalis* 感染により脂質代謝異常が引き起こされることが明らかとなっているが、これに関連して、HepG2 における脂質代謝関連遺伝子発現に TRPV1 が与える影響を検討した。その結果、LXR $\beta$  や LDLR の発現が TRPV1 アゴニストによって抑制されることが明らかとなった。すなわち TRPV1 は肝臓において炎症応答だけでなく脂質代謝機能も制御する働きをもつことが示唆された。

(図4) TRPV1 アゴニスト、アンタゴニストによる TNF $\alpha$  発現の変動



以上より、TRPV1 は肝臓において炎症応答だけでなく脂質代謝機能も制御する働きを持ち、歯周病原細菌感染時に全身に起こる炎症応答や脂質異常症の病態形成に参与している可能性が示唆された。

今後は、各種サイトカイン刺激による TRPV1 発現の変動及び機能の変化を検討するとともに、歯周病原細菌感染時の腸管における TRP チャンルの機能についても更なる検討を行っていく。

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 2 件)

(1) Okui T, Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Yamazaki K.

The Role of Distinct T Cell Subsets in Periodontitis- Studies from Humans and Rodent Models.

Curr Oral Health Rep. 1, 114-123, 2014. 査読有り

DOI: 10.1007/s40496-014-0013-z

(2) Aoki-Nonaka Y, Nakajima T, Miyauchi S, Miyazawa H, Yamada H, Domon H, Tabeta K, Yamazaki K

Natural killer T cells mediate alveolar bone resorption and a systemic inflammatory response in response to oral infection of mice with *Porphyromonas gingivalis*.

J Periodontal Res. 49(1), 69-76, 2014. 査読有り

DOI: 10.1111/jre.12080

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野中 由香莉 (NONAKA Yukari)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号：40710520