

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861574

研究課題名(和文) P. gingivalis 歯性感染による NASH 病態増悪における TLR2 の役割

研究課題名(英文) The role of TLR2 in NASH progression caused by P. gingivalis odontogenic infection

研究代表者

古庄 寿子 (Hisako, Furusho)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：00634461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Pg 歯性感染で誘導される肝細胞やマクロファージ(M<sub>1</sub>)の活性化における TLR2 の役割を明らかにすることを目的に検討を行った。TLR2 経路を遮断した TLR2KO マウスでは、WT マウスの高脂肪食群でみられた Pg 歯性感染による脂肪化、M<sub>1</sub> 増加、炎症性サイトカイン産生は減弱していた。TLR2 阻害薬は脂肪化肝細胞・M<sub>1</sub> における Pg-LPS 誘導サイトカイン発現増加を顕著に抑制した。以上により、脂肪肝では、TLR2 は肝細胞の脂肪化および M<sub>1</sub> の増加を介し、Pg に対する反応性を高めることに関わり、過剰な炎症反応を起こすことで NASH の病態増悪につながる事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：I aimed to clarify roles of TLR2 (a Pg-LPS receptor) in activating hepatocytes and macrophages (M<sub>1</sub>) caused by Pg-odontogenic infection. In vivo experiment, WT and TLR2KO mice were 8-week-fed by Chow Diet (CD) and High Fat Diet (HFD), then the half of each mice were infected Pg from pulp, compared to non-infected groups. After 6-week-infection, immunoexpression of TLR2 and Mac2-positive M<sub>1</sub> infiltrating area in liver were analyzed. In WT-HFD groups, TLR2-expression in liver and M<sub>1</sub>-infiltrating area was significantly increased, compared to WT-CD groups. However, in TLR2KO mice, M<sub>1</sub>-area was unchanged. In vitro experiment, I used human hepatocytes and M<sub>1</sub> cell lines. TLR2 inhibitor suppressed proinflammatory cytokine expression caused by Pg-LPS stimulation. In fatty liver, TLR2 is related to steatosis and recruitment of M<sub>1</sub>, and to increasing Pg-reactivity, cause of marked inflammation. It was shown the association between TLR2 and NASH progression.

研究分野：口腔病理学

キーワード：TLR2 NASH P.gingivalis

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は本邦で増加傾向にある代表的な慢性肝疾患である。NASHは肥満による脂肪肝から発生し、肝硬変、肝癌に進行する可能性があるため、予防・加療が必要とされているが、まだ有効な治療法は無い。近年、脂肪肝の形成に関わる“first hit”、それに続く酸化ストレスなどの要因である“second hit”がNASHの病態を増悪させるという“two-hit theory”が提唱され、second hitに腸内細菌由来リポポリサッカライド(LPS)が挙げられるようになった。一方、歯周炎病巣では、歯周病原細菌および歯周病原細菌由来LPSが血流を介し、全身の健康状態に悪影響を及ぼすことが多く報告されている。特に、*Porphyromonas gingivalis*(*P.gingivalis*)は心・血管系疾患、糖尿病、早期低体重児出産などと関係するとされている。私は、これまで*P.gingivalis*菌性感染がNASH病態を増悪することを、*in vivo*実験および*in vitro*実験により明らかにした。*in vitro*実験において、ヒト肝組織構成細胞株(肝細胞、肝筋線維芽細胞、マクロファージ)を用いて作成した脂肪化細胞モデルでは、*P.g.*-LPS刺激が加わることで炎症性サイトカインやインフラマソームのmRNA発現が上昇していた。*P.gingivalis*-LPS(*P.g.*-LPS)の受容体の一つであるToll-like receptor 2 (TLR2)の著しい発現上昇が脂肪化肝細胞でみられた。肝筋線維芽細胞、マクロファージでは非脂肪化/脂肪化にかかわらずTLR2が高発現していた。以上により、TLR2経路の活性化がNASH病態増悪の因子となっている可能性が示唆された。

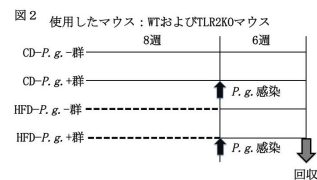
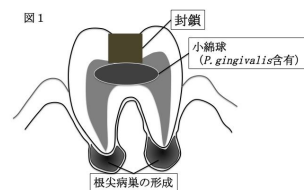
### 2. 研究の目的

これまでの研究で、*P.gingivalis*菌性感染により血流内へ侵入した*P.gingivalis*および*P.g.*-LPSが、TLR2発現上昇を伴う脂肪肝に到達し、刺激を加えることで、炎症性サイトカインの発現上昇、インフラマソームの活性化により、線維化が亢進することでNASHの病態増悪につながる事が明らかとなった。*P.g.*-LPSは他のグラム陰性菌LPS(例えば、大腸菌)と異なり、主にTLR2に作用する特殊なLPSであることから、TLR2ノックアウトマウスを用い、高脂肪食誘導脂肪肝モデルマウスを作成し、根尖病変および肝組織病変を野生型マウスと比較することで、TLR2経路の関与について検討する。さらに、脂肪化肝細胞、脂肪化マクロファージモデルを用いて、*P.g.*-LPS刺激による炎症性サイトカイン発現増強に対するTLR2抗体投与の影響を検討し、肝臓の脂肪化に伴うTLR2発現上昇の重要性を検討する。以上により、*P.gingivalis*菌性感染によるNASH病態増悪メカニズムにおけるTLR2の役割について明らかにすることを目的とし、研究を行った。

### 3. 研究の方法

1)TLR2 ノックアウトマウスを用いた*P.gingivalis*菌性感染によるNASH病態増悪におけるTLR2の関与についての検討

野生型(WT)およびTLR2ノックアウトマウス(TLR2KO)に対し、通常食(CD)および高脂肪食(HFD)を8週間投与し、通常マウスおよび高脂肪食誘導脂肪肝マウスをそれぞれ作成した。(WT-CD/HFD群、TLR2KO-CD/HFD群)各群の半数に対し、第1臼歯歯髄を歯科用切削器具(ラウンドバー)で露髄させたのち、*P.gingivalis*(W83株) $10^7$ 個を含ませた綿球を留置し、感染群とした(*P.g.*+群)(図1)。もう一方を非感染群とし(*P.g.*-群)、図2に示すように、計8群を作成した。感染6週後に肝臓および顎骨を回収した。



WTマウス肝組織における、TLR2発現の比較検討

回収したWTマウス肝臓の一部により、肝組織標本を作成し、TLR2抗体を用いて、免疫組織化学染色を行い、4群に発現の差があるか、組織学的に検討した。また、肝臓から抽出したmRNAを用いて、リアルタイムPCRにより、TLR2発現に差が見られるか、比較検討した。

TLR2ノックアウトによる肝組織の変化の検討

回収した肝臓の一部により、肝組織標本を作成した。HE染色を行い、組織学的な変化を比較検討するとともに、Mac2(抗マクロファージ抗体)による免疫組織化学染色を行い、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)数およびマクロファージ陽性細胞の面積を測定し、TLR2ノックアウトによる肝臓の変化を観察した。また、回収した肝臓からmRNAを回収し、炎症性サイトカインmRNA(IL-1 $\beta$ 、MCP-1など)の発現について比較検討を行った。

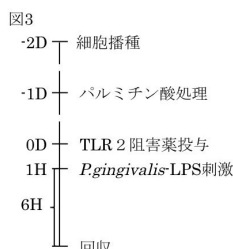
TLR2ノックアウトによる根尖部歯周組織の変化の検討

回収した顎骨により、顎骨標本を作成し、HE染色を行い、根尖部歯周組織の変化を比較検討した。

2) TLR2 阻害薬の *P.gingivalis*-LPS により誘導サイトカイン発現に及ぼす影響について

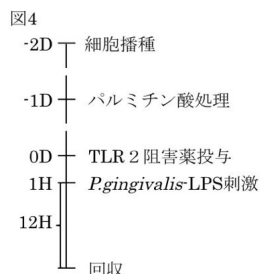
#### 脂肪化肝細胞の反応性への影響について

ヒト脂肪化肝細胞(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)0.2mM 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とした。それぞれの細胞に TLR2 阻害薬(抗 TLR2 抗体)を作用させ、*P.gingivalis*-LPS により刺激を加えた。TLR2 阻害薬を加えていない細胞に対しても同様に *P.gingivalis*-LPS 刺激を行った。6 時間後に回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1)について比較検討した。(図 3)



#### 脂肪化マクロファージの反応性の影響について

ヒトマクロファージ(THP-1 細胞株に対し PMA 処理を行った)を用いて、パルミチン酸 0.2mM で 18 時間処理し、脂肪化マクロファージ細胞を作成した。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とした。それぞれの細胞に TLR2 阻害薬(抗 TLR2 抗体)を作用させ、*P.gingivalis*-LPS により刺激を加えた。TLR2 阻害薬を加えていない細胞に対しても同様に *P.gingivalis*-LPS 刺激を行った。12 時間後に培養上清を回収し、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )産生量を ELISA 法により比較検討した。(図 4)



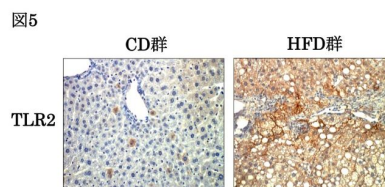
## 4. 研究成果

1) TLR2 ノックアウトマウスを用いた

*P.gingivalis* 菌性感染による NASH 病態増悪における TLR2 の関与についての検討

WT マウス肝組織における、TLR2 発現の比較検討

免疫組織化学染色により、WT マウスの高脂肪食(HFD)誘導により脂肪化した肝組織では、通常食(CD)投与した正常群と比較して TLR2 の顕著な上昇が見られた。(図 5: Furusho et al. 2013 で報告)



また、リアルタイム PCR の結果により、同様に HFD 群では CD 群と比較して顕著な TLR2 発現が見られた。

TLR2 ノックアウトによる肝組織の変化の検討

WT-HFD 群では、WT-CD 群と比較して、顕著な脂肪化が見られた。CD-*P.g.*-群および CD-*P.g.*+群では明らかな組織学的変化は見られなかった。一方、HFD-*P.g.*-群と比較して、HFD-*P.g.*+群では炎症巣が増加していた。Mac2 免疫組織化学標本を用いて、CLS 数を計測したところ、WT-HFD 群では、WT-CD 群と比較して、CLS 数が上昇していた。WT-HFD-*P.g.*+群では、他群(WT-CD-*P.g.*-/+群および WT-HFD-*P.g.*-群)と比較して CLS 数が増加していた。同じ標本を用いて Mac2 陽性細胞の面積を計測したところ、同様に WT-HFD-*P.g.*+群では他群と比較し高い数値を示していた。

TLR2 ノックアウト (TLR2KO) -HFD 群では、WT-HFD 群で見られた脂肪化の亢進は観察されなかった。また、Mac2 陽性 CLS 数および Mac2 陽性細胞面積を比較検討したところ、全群 (TLR2KO-CD-*P.g.*-/+群および TLR2-HFD-*P.g.*-/+群)で数値が低く、各群での差は見られなかった。

また、RT-PCR によるサイトカイン発現の検討では、WT-HFD-*P.g.*-/+群でみられた IL-1 $\beta$ 、MCP-1 の発現上昇は、TLR2-HFD-/+群では認められなかった。

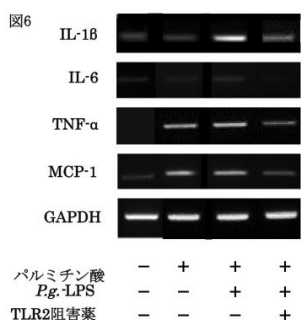
TLR2 経路の遮断により、脂肪化、肝細胞における炎症性サイトカイン発現上昇やマクロファージの動員が改善された。よって、TLR2 経路は *P.gingivalis* 菌性感染による NASH 病態増悪に関与していることが明らかになった。

TLR2 ノックアウトによる根尖部歯周組織の変化の検討

WT および TLR2KO 全群(CD-Pg-/+群および HFD-Pg-/+群)の根尖部歯周組織を HE 染色で観察したが、根尖部での炎症の程度に大きな差は認めなかった。

2) TLR2 阻害薬の *P.gingivalis*-LPS により誘導サイトカイン発現に及ぼす影響について

脂肪化肝細胞の反応性への影響について



私は、以前、ヒト脂肪化肝細胞では、脂肪化により TLR2 発現上昇が起こることを示した。TLR2 は *P.gingivalis*-LPS の受容体の一つである。脂肪化によっても炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1) の mRNA 発現の上昇が見られるが、TLR2 発現の上昇した脂肪化肝細胞に *P.gingivalis*-LPS 刺激が加わることで顕著な発現上昇を認めることを報告した。今回の実験で、TLR2 阻害剤の作用により、これらの炎症性サイトカイン発現が顕著に低下していることが示された。以上により、TLR2 は脂肪肝における肝細胞において *P.gingivalis* および *P.gingivalis*-LPS の刺激により炎症性サイトカインの発現上昇が起こることで亢進される NASH 病態増悪に TLR2 は重要な役割を持つことが示された。

脂肪化マクロファージの反応性の影響について

本研究の動物実験において TLR2 ノックアウトマウスでは有意にマクロファージの数が減少していたことから、脂肪化マクロファージにおける TLR2 を介した炎症性サイトカイン産生の重要性を検討した。ヒトマクロファージでは脂肪化/非脂肪化に関係なく、TLR2 発現は高く、*P.gingivalis*-LPS 刺激により培養上清中の炎症性サイトカイン (IL-1、TNF- $\alpha$ ) の産生量が増加していた。TLR2 阻害薬はこれらの炎症性サイトカイン産生量を有意に低下させた。以上のことから、TLR2 はマクロファージの炎症性サイトカイン産生の増加に重要な役割を持つことが明らかとなった。

本研究により、歯性感染により脂肪肝に到達した *P.gingivalis* および *P.gingivalis*-LPS は TLR2 経路を介して肝細胞やマクロファージ

といった肝構成細胞での炎症性サイトカイン産生を上昇させ、また、マクロファージの動員を誘導することで、炎症を増悪させ、NASH 病態を促進させることが明らかとなった。よって、TLR2 を標的とした治療は NASH 病態進行を抑制する新たな治療戦略となる可能性が示された。

## 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 4 件)

1. Enhanced Expression of Contractile-Associated Proteins and Ion Channels in Preterm Delivery Model Mice With Chronic Odontogenic *Porphyromonas gingivalis* Infection. Miyoshi H, Konishi H, Teraoka Y, Urabe S, Furusho H, Miyauchi M, Takata T, Kudo Y. *Reprod Sci*. 2015 Dec 20. pii: 1933719115620497. [Epub ahead of print] 査読あり

2. Osteodystrophy in Cholestatic Liver Diseases Is Attenuated by Anti-Glutamyl Transpeptidase Antibody. Kawazoe Y, Miyauchi M, Nagasaki A, Furusho H, Yanagisawa S, Chanbora C, Inubushi T, Hyogo H, Nakamoto T, Suzuki K, Moriwaki S, Tazuma S, Niida S, Takata T. *PLoS One*. 10(9):e0139620. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0139620. 査読あり

3. Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* induces preterm birth in mice. Ao M, Miyauchi M, Furusho H, Inubushi T, Kitagawa M, Nagasaki A, Sakamoto S, Kozai K, Takata T. *PLoS One*. 10(8):e0137249. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0137249. 査読あり

4. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. Ao M, Miyauchi M, Inubushi T, Kitagawa M, Furusho H, Ando T, Ayuningtyas NF, Nagasaki A, Ishihara K, Tahara H, Kozai K, Takata T. *PLOS ONE*. Oct 21; 9(10):e110519. 2014. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

1. TLR2 plays a key role in *P.gingivalis*-induced NASH progression. Furusho H, Miyauchi M, Nagasaki A, Sakamoto S, Takata T. 第 63 回 JADR 総会・学術大会 (博多), 2015 年 10 月 30-31 日

2. TLR2 plays a key role in *P.gingivalis*-induced NASH progression. Furusho H,

Miyauchi M, Nagasaki A, Sakamoto S,  
Takata T. 6th Hiroshima Conference on  
Education and Science in Dentistry (広島),  
2015年10月23-25日

3. Odontogenic infection of *Porphyromonas  
gingivalis* induces pathological progression of  
non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Furusho H,  
Miyauchi M, Takata T. 第5回環太平洋アジア  
トピックカンファレンス(神戸), 2014年10月  
21-22日

4. *Porphyromonas gingivalis* 菌性感染は非ア  
ルコール性脂肪性肝炎の病態を増悪させる。  
古庄寿子. 第25回日本臨床口腔病理学会総  
会・学術大会(新潟), 2014年8月27-29日

## 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