

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893287

研究課題名(和文) 歯周病が脂肪組織の拡大に及ぼす影響に関する細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Cell biological research on the effects of periodontal disease on the expansion of adipose tissue

研究代表者

中井 久美子 (NAKAI, Kumiko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50736725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪組織の肥大化に影響する細胞外マトリックスタンパクのリモデリングと歯周病罹患者の肝臓で増加するCRPに着目し、脂肪細胞のタンパク分解酵素であるmatrix metalloproteinases (MMPs) とその内因性阻害剤であるtissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) 発現に及ぼすCRPの影響を調べた。その結果、CRPは脂肪組織中の成熟脂肪細胞のFc 受容体を介してMMPsとTIMPsの発現を誘導し、間質中の細胞外マトリックスタンパクのリモデリングを促進し、脂肪組織を肥大化させる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Elevated blood levels of C-reactive protein (CRP) have been reported in patients with severe periodontitis. Epidemiological studies have indicated the association between periodontitis and metabolic syndrome, which arises from visceral fat-type obesity. In this study, we focused on turnover of extracellular matrix (ECM) protein in adipose tissue and examined the effects of CRP on the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and its inhibitors (TIMPs). CRP increased the expression of MMP-1, -2, -3, -9, -11, -13, -14 and TIMP-1, but not TIMP-2. These results suggest that CRP inclines ECM turnover to the resolution, which may be involved in spread of adipose tissue area, via upregulation of multiple MMPs in adipocyte.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：脂肪細胞 歯周病 CRP

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積を基盤として、高血糖、高脂血症、高血圧を合わせもつ状態であり、動脈硬化性疾患の最大のリスク因子である。近年、我が国では、心疾患および脳血管疾患による死亡が全体の約 1/3 に及んでいる。また、一命を取り留めたとしても社会復帰の障害となる後遺症を残すケースが多いため、動脈硬化性疾患の第 1 次予防の観点からメタボリックシンドロームの予防が重要視されている。一方、歯周病は軽微な慢性炎症として全身の健康に影響すると考えられており、疫学研究では糖尿病や肥満と歯周病との関係性が報告されている。申請者が所属する講座では、職域成人を対象とした前向きコホート疫学研究において、歯周ポケットを保有している人は、現在は健康でも、将来メタボリックシンドロームの発症リスクが高くなることを明らかにした (Morita et al., J Periodontol, 2010)。しかしながら、歯周病がメタボリックシンドロームの発症を誘導するメカニズムを調べた細胞生物学研究はごくわずかであり、その詳細は不明である。

歯周病原菌由来の内毒素や免疫担当細胞が産生する抗体は、血流を介して肝臓に集積し、Kupffer 細胞や脂肪細胞による Interleukin (IL)-6 や Tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカイン産生を促進する。また、IL-6 は肝細胞に作用し炎症マーカーである C-reactive protein (CRP) 産生を誘導する。事実、歯周病罹患者は非罹患者に比べて、血清中の TNF- α や IL-6, CRP レベルが高いことが報告されている (Gorska et al., J Clin Periodontol, 2003, Yamazaki et al., J Periodont Res, 2005, Saito et al., J

Periodontol, 2003)。一方、脂肪細胞は未分化間葉系幹細胞から発生し、分化した前脂肪細胞は外膜である基底膜を発達させ、細胞質内に多量の脂質を蓄積し肥大化する。脂肪組織の増加には、脂肪細胞の増殖・分化・成熟、血管の新生、および細胞外マトリックスタンパクのリモデリングによる脂肪組織の再編成が重要と考えられている (Crandall DL et al., Microcirculation, 1997)。しかしながら歯周病を想定して、炎症性サイトカインや CRP が脂肪組織形成に及ぼす影響を詳細に調べた報告は少なく、科学的根拠に乏しい状態にある。

2. 研究目的

代表者は、歯周病が、メタボリックシンドロームの基盤因子である脂肪蓄積に影響するメカニズムを解明することを目的として、脂肪組織の肥大化に影響する細胞外マトリックスタンパクのリモデリングと歯周病罹患者の肝臓で増加する CRP に着目した細胞研究を実施した。すなわち、成熟脂肪細胞へと分化誘導した 3T3L-1 細胞を CRP で刺激し、タンパク分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) とその内因性阻害剤である tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) の発現を調べた。さらに、メタボリックシンドロームに関連する研究として、血圧上昇因子のアンギオテンシン (Ang) II で、骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を刺激し、骨芽細胞分化関連転写因子である Runx2, Osterix, Msx2, Dlx5, および細胞外マトリックスタンパクである、I 型コラーゲン、骨シアロタンパク、オステオポンチン、オステオカルシンの発現、ならびに石灰化物形成レベルについても調べた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

細胞は、10%ウシ胎児血清および1%抗生物質を含む培地で37℃、5%CO₂存在下で培養した。3T3-L1細胞では、細胞がconfluentになった2日後に、培地に脂肪細胞分化誘導因子である10 μl/ml Insulin, 5 μl/ml Dexamethasone および1 μl/ml Isobutylmethylxanthine を加えて、2日間分化誘導培養した後、5 μl/ml の Insulin のみを加えた培地に交換して分化を維持した。3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化程度は、oil-red-O染色で評価した。ROS17/2.8細胞による石灰化物形成は、10 mM β-グリセロリン酸と50 μg/mL アスコルビン酸を添加した培養液で7日間培養後、アリザリンレッド染色で評価した。また、石灰化物中のカルシウム蓄積量は、calcium assay kit を用いて調べた。

(2) 細胞の刺激

3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化を確認後、ウシ胎児血清非添加の培地にCRPを加えて24時間、刺激培養した。また、CRP誘導性のMMPとTIMPの発現変化に関するCRP受容体を検索するために、FcγRIIおよびFcγRIIIをブロックする抗CD16/CD32抗体の存在下での刺激培養も行った。一方、ROS17/2.8細胞は、ウシ胎児血清添加の培地にAng IIを加えて7日間、刺激培養した。なお、細胞を刺激するCRPの濃度は、3T3-L1細胞のIL-6およびTNF-α発現に及ぼすCRP刺激の影響を調べた研究(Yuan et al., Biochem Biophys, 2012)を、Ang IIの濃度は、ROS17/2.8細胞のMMPとTIMPの発現に及ぼすAng II刺激の影響を調べた研究(Nakai et al., Biocimi, 2013)をもとに決定した。

(3) 遺伝子およびタンパク発現の検討

遺伝子発現検索では、細胞から全RNAを回収後、逆転写酵素でmRNAからcDNAを作成し、SYBER-Green Iを用いたintercalater法でreal-time PCRを行なったのち、あらかじめ作成した検量線をもとに遺伝子の増幅量を求め、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の増幅量で補正した値をmRNA発現量とした。一方、タンパク発現の検討では、回収後の細胞を超音波処理して全タンパクを回収後、4-20% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGE電気泳動した。ゲル内のタンパクをPVDF膜に転写後、Western blottingは、各標的タンパクに対する1次抗体を用いて、2次抗体としてビオチン標識の各免疫動物に対する抗体を用いて行なった。さらに、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン溶液を加えて化学発光反応を行い、X線フィルムに感光させて得られたバンドをscannerとdigital image analysis softwareを用いて半定量し、β-tubulin発現量で補正して求めた。

4. 研究の成果

(1) 成熟脂肪細胞に分化した3T3-E1細胞をCRPで刺激した結果、MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-11, MMP-13, MMP-14およびTIMP-1の発現が有意に増加した。MMP-1とMMP-13はコラゲナーゼとして、コラーゲン分子の三重らせん構造をN末端から4分の3の位置で2つの断片に分解する。一方、MMP-2およびMMP-9は、それぞれゼラチナーゼAおよびBとして、主にゼラチン化したコラーゲン断片を分解する。MMP-3とMMP-11はストロムライシンとして、またMMP-14は細胞膜の表面上に発現する膜型MMPとしてそれぞれ幅広

い基質特異性を有し、コラーゲン性タンパクだけでなく、ラミニンやフィブロネクチンなどの非コラーゲン性タンパクを分解する。また、TIMP-1は、複数の活性型 MMPs に強く結合してそれらの酵素活性を阻害する。一方、脂肪組織が肥大化する過程では、脂肪滴の蓄積により脂肪細胞がその大きさを増すとともに、細胞間質における細胞外マトリックスタンパクのリモデリングも促進する。高脂肪食を負荷したマウスでは、脂肪組織が肥大化するとともに複数のサブタイプの MMPs と TIMPs の発現が増加することが知られており、さらに最近、MMPs によって分解された VI 型コラーゲン断片が、脂肪細胞の悪玉化の原因となる細胞間質へのマクロファージの浸潤と組織の線維化を誘導する可能性が指摘されている。これらの知見と本研究結果から CRP 刺激は、成熟脂肪細胞の MMPs と TIMP-1 の産生増加を介して細胞外マトリックスタンパクリモデリングを誘導して脂肪組織を肥大化させるとともに、VI 型コラーゲンの断片化を介して脂肪細胞の悪玉化を促進する可能性が考えられた。

(2) CRP 刺激で増加した MMP-2, MMP-9 および MMP-14 発現は、抗 CD16/CD32 抗体によって CRP 未刺激レベルまで低下した。また、CRP 誘導性の MMP-1, MMP-3, MMP-13, および TIMP-1 発現増加も CD16/CD32 抗体で抑制されたが、未刺激レベルまでは低下せず、その効果は MMP-2, MMP-9 および MMP-14 に比べて低かった。これらの結果から、CRP は、成熟脂肪細胞上に発現する Fc II および Fc III を介して MMP-2, MMP-9 および MMP-14 の発現を誘導することが、さらに、CRP 刺激による MMP-1, MMP-3, MMP-13 および TIMP-1 の発現増加には、Fc II および Fc III に加えて他のサブタイプの Fc が関与する可能性が考えられた。一

方、CRP 刺激による MMP-11 発現誘導は、CD16/CD32 抗体の存在下でより強く認められた。本研究結果から、成熟脂肪細胞の Fc II および Fc III は MMP-11 発現に全く関与しないと考えられた。すなわち、CRP と Fc II および Fc III との結合が CD16/CD32 抗体で阻害されることで、MMP-11 発現に関する他のサブタイプの Fc と CRP の結合が促進し、CRP 刺激による MMP-11 発現誘導が強まった可能性が考えられた。以上の結果から、歯周病罹患者の肝臓で増加する CRP は、近接する内臓脂肪組織中の成熟脂肪細胞の複数の Fc 受容体を介してタンパク分解酵素とその内因性阻害剤の発現を誘導し、間質中の細胞外マトリックスタンパクのリモデリングを促進するとともにマクロファージの浸潤を促進し、脂肪組織を肥大化・悪玉化させる可能性が考えられた。(図1)

(3) ROS17/2.8 細胞を Ang II で刺激した結果、骨芽細胞分化を促進する転写因子である Runx2 および Msx2, ならびに、非コラーゲン性の細胞外マトリックスタンパクであるオステオカルシンの発現は低下した一方で、骨芽細胞分化を抑制する転写因子である AJ18 の発現は増加した。なお、転写因子の Osterix と Dlx5, 細胞外マトリックスタンパクの I 型コラーゲン、骨シアロタンパクおよびオステオポンチンの発現には Ang II 刺激の影響は認められなかった。次に、ROS17/2.8 細胞による石灰化物形成と、それに含まれるカルシウム蓄積量に及ぼす Ang II の影響を調べたところ、石灰化物形成とそれに含まれるカルシウム量は Ang II 刺激で減少した。さらに、Ang II type 1 受容体 (AT1) 拮抗剤は、Ang II 刺激による Runx2, Msx2 および OCN の発現低下と AJ18 の発現増加を完全に抑制した。以上の結果から、Ang II は、ROS17/2.8 細胞の AT1

に結合し, Runx2 および Msx2 発現を減少させる一方 AJ18 発現を増加させ, 骨芽細胞分化を抑制すると考えられた。さらに, Ang II は OCN 発現を低下させて, ROS17/2.8 細胞の石灰化物形成を抑制することが示唆された。

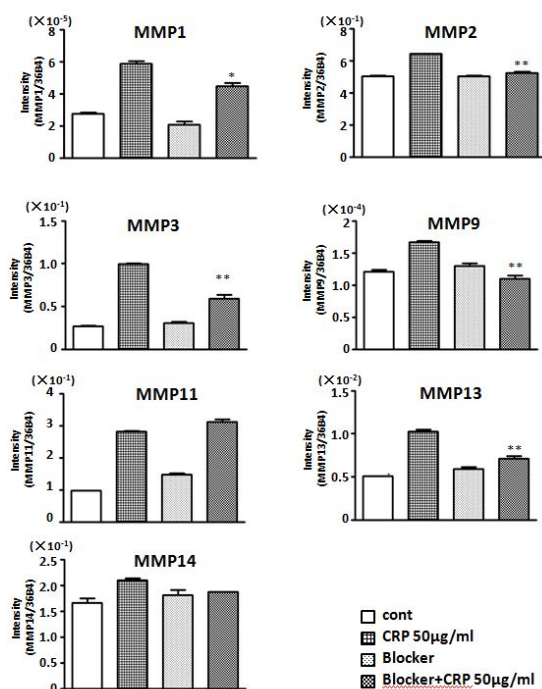


図1. CD16/CD32抗体がCRPによって誘導されたMMPsおよびTIMPs発現に及ぼす影響

<引用文献>

Morita T, Yamazaki Y, Mita A, Takada K, Seto M, Nishinoue N, Sasaki Y, Motohashi M, Maeno M, A cohort study on the association between periodontal disease and the development of metabolic syndrome, J Periodontol, 81, 2010, 512-9

Górska R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K, Relationship between

clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis, J Clin Periodontol, 12, 2003, 1046-52.

Yamazaki K, Honda T, Oda T, Ueki-Maruyama K, Nakajima T, Yoshie H, Seymour GJ, Effect of periodontal treatment on the C-reactive protein and proinflammatory cytokine levels in Japanese periodontitis patients, J Periodontal Res, 40, 2005, 53-8.

Saito T, Murakami M, Shimazaki Y, Oobayashi K, Matsumoto S, Koga T, Association between alveolar bone loss and elevated serum C-reactive protein in Japanese men, J Periodontol, 74, 2003, 1741-6.

Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG, A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives, Microcirculation, 4, 1997, 211-32.

Yuan G, Jia J, Di L, Zhou L, Dong S, Ye J, Wang D, Yang L, Wang J, Li L, Yang Y, Mao C, Chen M, Effects of C-reactive protein on adipokines genes expression in 3T3-L1 adipocytes, Biochem Biophys Res Commun, 424, 2012, 462-8.

Nakai K, Kawato T, Morita T, Iinuma T, Kamio N, Zhao N, Maeno M, Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT(1) receptor in osteoblasts, Biochimie,

95、2013、922-33.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakai K, Kawato T, Morita T, Yamazaki Y, Tanaka H, Tonogi M, Oki H, Maeno M (2015) Angiotensin II suppresses osteoblastic differentiation and mineralized nodule formation via AT₁ receptors in ROS17/2.8 cells. Archives of Medical Science, Arch Med Sci、査読有り、11、628-37.

〔学会発表〕(計2件)

中井久美子, 川戸貴行, 高橋由美, 梶 純也, 原田修成, 岡 仁, 森田十誉子, 山崎洋治, 富樫久美, 柏木 勝, 前野正夫、CRPは脂肪細胞による細胞外マトリックスタンパク代謝の分解系を促進する、第64回日本口腔衛生学会・総会、2015年5月28日、つくば国際会議場(茨城つくば市)

中井久美子, 川戸貴行, 田中秀樹, 森田十誉子, 前野正夫、CRPが脂肪細胞の細胞外基質タンパク分解酵素とその内因性阻害剤の発現に及ぼす影響、第24回硬組織再生生物学会学術大会・総会、2015年8月22日、大阪歯科大学創立100周年記念館(大阪府枚方市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 久美子 (NAKAI, Kumiko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50736725