

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05060

研究課題名(和文) 口腔微生物由来血中TLRリガンドによる糖尿病性腎症の発症機構の解明と予防への展開

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic mechanism of diabetic nephropathy by oral microorganism-derived blood TLR ligand and development for prevention

研究代表者

沢 禎彦 (SAWA, YOSHIHIKO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70271666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病の方が歯周炎になると腎症になる可能性が高まることが知られていますが、その仕組みはわかりません。私たちは、糖尿病マウスを用いた実験で、糖尿病になると腎の糸球体と呼ばれる尿生成装置の血管が、toll-like receptorと呼ばれる細菌成分を認識する受容体を発現するようになること、歯周病原菌成分を糖尿病マウス口腔の粘膜に注射すると腎症を起こすことを見出しました。歯周病原菌が口腔の血管に入って全身を巡り、腎に入り受容体に結合して腎症を起こしたと考えられます。歯周炎ではハミガキで簡単に血管に細菌が入ります。糖尿病の方は歯周炎の予防が腎症の合併を予防することが考えられました。

研究成果の概要(英文)：Diabetes is known to increase the possibility of becoming nephropathy when it comes to periodontitis, but the mechanism is not known. In an experiment using diabetic mice, we found that blood vessels of a urine generating device, called glomeruli of the kidney, express 'toll-like receptors' that recognize bacterial components when it comes to diabetes. We also found that injection of periodontal disease pathogen into mucosa of diabetic mouse oral cavity causes nephropathy. It is thought that germs of periodontal disease enter the blood vessels of the oral cavity, go around the body, enter the kidney and bind to the receptor and cause nephropathy. In periodontitis, bacteria easily enter the blood vessel with tooth brushing. For people with diabetes, prevention of periodontitis is considered to prevent the diabetic nephropathy.

研究分野：解剖学、脈管学、疫学、分子生物学、腫瘍生物学

キーワード：歯周病 糖尿病性腎症 toll-like receptor Porphyromonas gingivalis 糸球体硬化

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省 2012 年国民健康・栄養調査における糖尿病の有病者数は約 950 万人に上る。その 40% に合併する糖尿病性腎症を発症した患者は、歯周疾患有病率が非腎症糖尿病患者より有意に多いこと、重度歯周疾患を有する糖尿病患者は歯周疾患をもたない患者と比べて腎症を合併する危険性が 2-3 倍高いことが喫緊の問題となっている。糖尿病性腎症の病態像は糸球体硬化であるがその分子メカニズムは未解決である。2013 年、臨床サンプルと糖尿病マウスを用いて、I 型・II 型糖尿病性腎症の糸球体毛細血管内皮細胞が toll-like receptor (TLR)2 と TLR4 を発現することを見出した (Takata et al, Acta Histochem Cytochem, 2013)。TLR は貪食細胞が発現する自然免疫受容体で、一般組織血管、また糖尿病腎でも糸球体以外の腎血管では発現は見られない。ところが、糸球体は糸玉状の特殊構造のため病原因子や免疫複合体が沈着し易く、糖尿病で発生した Nε-carboxymethyl-lysine (CML) など免疫原性のある終末糖化産物 advanced glycosylated end-products (AGE) が糸球体血管に沈着し慢性的に刺激して、内皮細胞に白血球接着因子や TLR など免疫分子の発現をもたらすと考えられた。TLR2 はグラム陽性菌成分 lipoteichoic acid (LTA) を、TLR4 はグラム陰性菌成分 lipopolysaccharide (LPS) を認識してサイトカイン産生を誘導する。2014 年、クルードで TLR2/4 リガンドとなる歯周病原細菌 *Porphyromonas (P.) gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) を定期的投与した糖尿病マウスが同様に投与した健常マウスの全生存期間内に、全マウスが腎症で humane endpoints に達したことを報告した (Sawa et al, PLoS One, 2014)。腎症を合併した糖尿病マウスでは、糸球体血管における炎症性サイトカイン IL-1β, IL-6 と TNF-α の産生、メサングウム細胞にコラーゲン産生を促す TGF-β の産生、またメサングウムにおける大

量の 1 型コラーゲンの蓄積、強い蛋白尿、血清検査でのクレアチニンと尿素窒素異常が観察された。健常マウスに *P. gingivalis* LPS を投与しても観察されなかった。また腎はリンパ管が乏しく腎実質に入った微生物の排出が構造的に難しいこと、糖尿病性腎症のマウスでは腎に浮腫が発生しリンパ管増生が起こることを見出した (Uchiyama et al, Acta Histochem Cytochem, 2013)。腹部消化管で循環系に入った細菌は門脈を經由して肝臓で処理されるが、頭頸部で血中に入った細菌は直接体循環から腎循環に入るため、例えば慢性扁桃炎は連鎖球菌と IgA の免疫複合体が糸球体に蓄積する IgA 腎症を起こす。そこで本研究の課題である歯周病に起因する糖尿病性腎症の発症仮説『歯周疾患ではブラッシングで容易に菌血症が起こる。糖尿病で血中に入った *P. gingivalis* LPS は構造の複雑な糸球体から排除できず、糸球体内皮の TLR を介して糖尿病性腎症を発症させる』ことを予想した。

## 2. 研究の目的

1. 口腔微生物由来 TLR リガンドによる糖尿病性腎症の発症機構の解明

歯周病原細菌 *P. gingivalis* 由来 LPS (Pg-LPS) が糖尿病環境で糸球体毛細血管内皮細胞の TLR シグナル伝達活性化とメサングウム細胞のコラーゲン過剰産生による糸球体硬化を誘導することを明らかにする。

2. TLR 阻害による糖尿病性腎症の抑制・予防効果の解析

Pg-LPS 投与糖尿病マウスが TLR4 拮抗剤 Eritoran によって腎症を免れるか検討する。

3. 歯周疾患を有する糖尿病患者の腎症合併率、歯周疾患が糖尿病患者に腎症を引き起こす相対危険度を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1. 口腔微生物由来 TLR リガンドによる糖尿

## 病性腎症の発症機構の解明

### (1) 糖尿病モデルマウス

Streptozotocin (STZ) 投与膵ランゲルハンス島破壊型 I 型糖尿病 ICR マウス、遺伝的 II 型糖尿病 KK/Ta・KK/AyJcl マウスを作出した。

### (2) CML 誘導 TLR 発現

CML(Toronto Research Chemicals)腹腔投与 ICR マウス TLR 発現亢進を検討した。

### (3) Pg-LPS の TLR2/4 活性化

Pg-LPS (Wako) の TLR2/4 活性化を他の Pg-LPS と比較した。NF- $\kappa$ B 依存性ホタルシフェラーゼレポーター、アクチンプロモーター依存性ウミシイタケルシフェラーゼレポーター、ヒト TLR2/TLR1、ヒト TLR4 のプラスミドをコトランスフェクションした HEK293 細胞を LPS 添加培養し、デュアルルシフェラーゼアッセイレポーターシステムにて NF- $\kappa$ B 依存性ホタルシフェラーゼ活性のアクチンプロモーター依存性ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対する比活性を測定した。

### (4) Pg-LPS (Wako) リガンドによる糖尿病性腎症の誘発

*P. gingivalis* LPS 頬粘膜投与糖尿病マウスの腎症発症を尿と血清のタンパク・糖、血中クレアチニンと尿素窒素測定、humane endpoints 判定、および生存曲線によって決定する。IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , および TGF- $\beta$  とコラーゲン産生を検討した。

## 2. Pg-LPS 投与糖尿病マウスに対する TLR 阻害による腎症予防効果の解析

### 1) 統計学的生命予後解析

TLR2/4 リガンド Pg-LPS 頬粘膜下投与糖尿病マウスの TLR4 阻害剤 Eritoran による腎症の予防効果を血清・尿・組織検査と統計学的生命予後解析によって検討した。Eritoran (Eisai)は LPS によるエンドトキシンショックの特効薬として開発され、第 III 相臨床試験まで通過した TLR 競合的拮抗剤で、10ng/ml LPS に対する白血球応答反応を 10nM で 100%

阻止する、IC<sub>50</sub>=1.6nM の強力な TLR4 アンタゴニストである。本研究の遂行のため無償で供給された (83142-1:2013-0162: Eritoran/E5564, Eisai Inc. USA)。

### 3. 歯周疾患を有する糖尿病患者の腎症合併率に関する疫学的解析と腎症の予防への展開

現在、透析病院との連携により糖尿病患者の歯周疾患の程度を非浸襲性に調べ、歯周疾患が糖尿病患者に腎症を引き起こす相対危険度を調べている (調査継続中)。

### 4. 研究成果

*P. gingivalis* は鉄要求性であるため高・低濃度 hemin 存在下で培養した *P. gingivalis* 由来の Pg-LPS, Invivogen から購入した Pg-LPS, 宿主低応答性 Pg-LPS1435, Invivogen から購入した TLR4 agonist の大腸菌 LPS、および TLR2 agonist の合成リポタンパク Pam3CSK4(Pam) を対照として、本研究で用いた Pg-LPS (Wako) の TLR2/4 活性化を検討したところ、TLR2 の活性化は Pam が最大で、Wako Pg-LPS は中等度、Pg-LPS1435 と大腸菌 LPS が弱い活性を示した。TLR4 の活性化は大腸菌 LPS が最大で、すべての Pg-LPS は弱い活性を示した (図 1)。従って、本実験で使用した *P. gingivalis* LPS は TLR2 を主に活性化とすると予想された。

CML あるいは Pg-LPS 投与糖尿病マウスは、humane endpoints に影響しない微量の LPS 投与非糖尿病マウスの全生存期間内に、全数が humane endpoints に達し、尿タンパク・尿糖所見と血清窒素・クレアチニン値から腎症と判定された。糖尿病マウスと Eritoran 投与マウスの生存率は、それぞれ 87.5%と 38.5%だった。Pg-LPS が TLR2 agonist であるにもかかわらず、Pg-LPS 投与糖尿病マウスにおける腎症の発症は TLR4 antagonist である Eritoran によって抑制された。しかし、生命予後をほとんど好転させなかったこと、humane endpoints

と解剖所見から、糖尿病マウスへの Pg-LPS 投与は腎症のみならず腸炎・フレイルなどを発症させたことが考えられた (図2)。

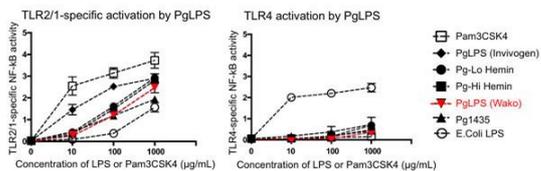


図1

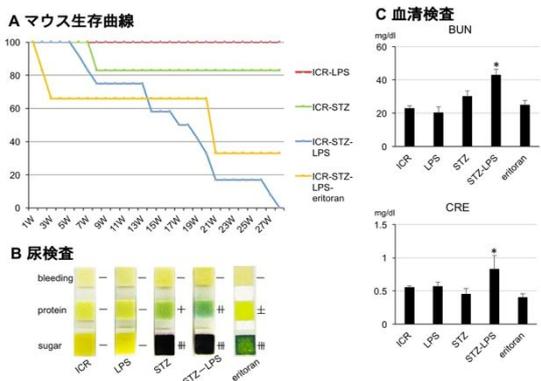


図2

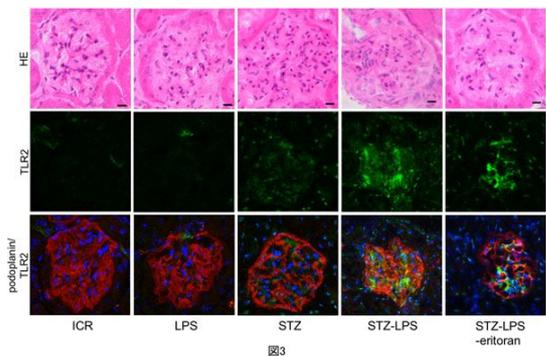


図3

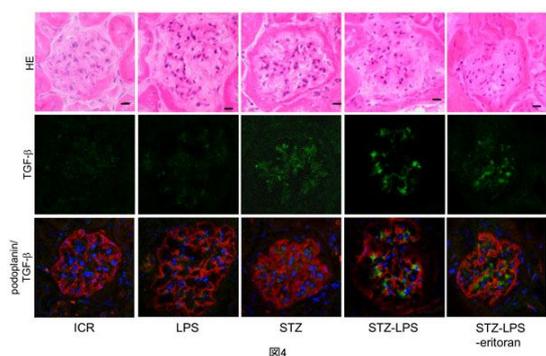


図4

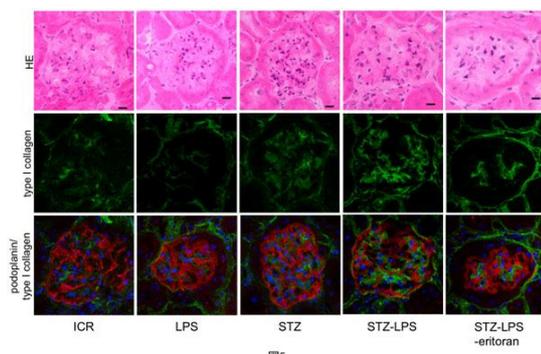


図5

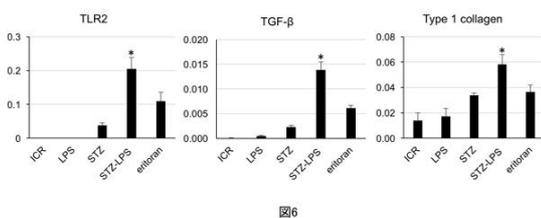


図6

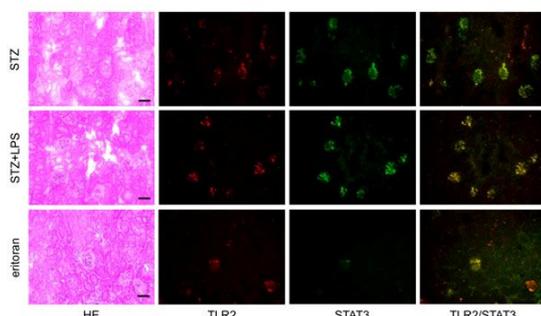


図7

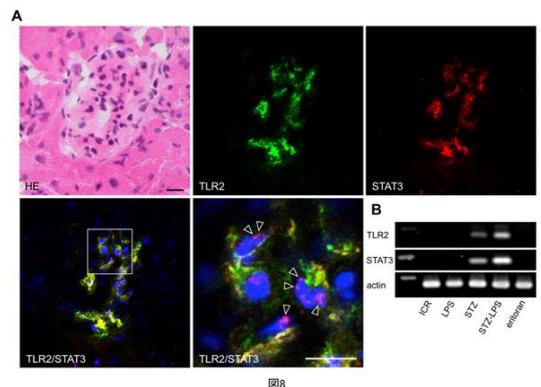
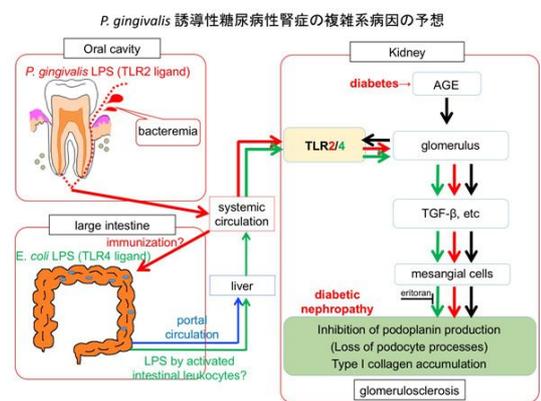


図8



マウス腎系球体血管の TLR2 (図3 緑) TGFβ

(図4 緑) 1型コラーゲン(図5 緑) STAT3 (図7,8 緑) および糸球体上皮マーカー podoplanin (図3-5,7,8 赤) の免疫染色で、糖尿病マウス糸球体には、健常マウスで見られない TLR2 と TGF $\beta$  の発現が見られ、Pg-LPS 投与糖尿病マウスでこれらの発現が増大した。また Eritoran と Pg-LPS 両者を投与した糖尿病マウスでは TLR2 の発現が抑制された(図6)。TLR2 上流の転写因子 STAT3 は糖尿病マウスと LPS 投与糖尿病マウス糸球体血管で陽性、Eritoran-LPS 投与糖尿病マウスで抑制された(図7)。共焦点レーザー顕微鏡では LPS 投与糖尿病マウス腎糸球体血管内皮細胞における STAT3 の核内移行が観察され、組織 RT-PCR で STAT3 mRNA の増大が示された(図8)。

エリトランは TLR2 を阻害できないため腎症予防効果は無いはずであった。ところが劇的な効果が見られ(図2,6)、腎症は STAT3-TLR2 経路で誘発されることも明らかとなった。さらに、腎症マウスに腸炎が確認され、強力な TLR4 リガンドである腸内細菌 *Escherichia coli* LPS の腎循環への侵入が考えられた。以上より、糖尿病環境で血中に入った *P. gingivalis* は体循環から腎循環に入り、構造の複雑な糸球体毛細血管に蓄積し、TLR2 経路で腎症の引き金を引くと同時に、糖尿病性フレイルによる腸管免疫の攪乱により TLR4 経路を併せた複雑系を構築すると考えられた。疫学解析は、H29.2.28 の個人情報改正に伴い再度倫理審査を受け、また代表者の異動により岡山大学主管、福岡歯科大学を共同機関として継続中である。糖尿病性腎症の透析患者は歯周疾患有病率が高く、歯周疾患は糖尿病患者の腎症合併の独立危険因子である可能性が明らかとなってきている。

##### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件, \*責任著者, 全査読有)

1. Miyazaki A, Nakai H, Sonoda T, Kaneko MK, Kato Y, Sawa Y\*, Hiratsuka H.

LpMab-23-recognizing cancer-type podoplanin is a novel predictor for a poor prognosis of early stage tongue cancer. *Oncotarget*, 2018;9(30):21156-21165. doi: 10.18632/oncotarget.24986.

2. Takenawa T, Kanai T, Kitamura T, Yoshimura Y, Sawa Y\*, Iida J. Expression dynamics of podoplanin in the mineralization of cultured osteoblasts with mechanostress. *Acta Histochem. Cytochem.* 2018;51(1):41-52. doi: 10.1267/ahc.17031.
3. Kajiwaru K, Takata S, To T, Takara K, Hatakeyama Y, Tamaoki S, Darveau RP, Ishikawa H, Sawa Y\*. The promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via toll-like receptors. *Diabetol Metab Syndr.* 2017;9:73. doi: 10.1186/s13098-017-0271-8.
4. Takara K, Maruo N, Oka K, Kaji C, Hatakeyama Y, Sawa N, Kato Y, Sawa Y\*. Morphological study of tooth development in podoplanin-deficient mice. *PLoS One.* 2017; e0171912. doi: 10.1371/journal.pone.0171912.
5. Matsuda Y, Hatakeyama Y\*, Sawa Y. Effects of a chemically synthesized leucine-rich amelogenin peptide (csLRAP) on chondrogenic and osteogenic cells. *J. Hard Tissue Biol.* 2017; 26: 51- 60. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhtb/26/1/26\\_51/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhtb/26/1/26_51/_article/-char/ja/)
6. Matsuda Y, Kamogashira N, Hatakeyama Y\*, Sawa Y. Distinct role of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factors in human ameloblastoma epithelial cell proliferation. *Biochem. Mol. Biol.* 2017; 2: 1-5. <http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/>
7. Maruo N, Sakagami R, Yoshinaga Y, Sawa Y\*. Differentiation of apical bud cells in a newly

- developed apical bud transplantation model using GFP transgenic mice as donor. PLoS One. 2016;11(3):e0150766. doi: 10.1371/journal.pone.0150766.
8. Higa A, Oka K\*, Tatsuoka M, Tamura S, Itaya S, Toda M, Ozaki M, Sawa Y. Intracellular Signaling pathway activation via TGF- $\beta$  differs in the anterior and posterior axis during palatal development. Journal of Hard Tissue Biology. 2016; 25(2): 195-204. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhtb/25/2/25\\_195/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhtb/25/2/25_195/_article/-char/ja/)
9. Tatsuoka M, Oka K,\* Tsuruga E, Sawa Y. Immunohistochemical expression of Fibrillin-1 and Fibrillin-2 during tooth development. Periodontal Res. 2015; 50(6): 714-720. doi: 10.1111/jre.12256.
- [学会発表](計6件)
1. Takata S, Kajiwara K, Hatakeyama Y, Ishikawa H, Sawa Y. The cytokine inductions in glomerular endothelial cells with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide through TLR2. 94th International Association of Dental Research (IADR), Seoul, JUN 2016. J. Dent. Res. 94(S).
2. Kajiwara K, Takata S, Hatakeyama Y, Sawa Y. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide promote diabetic nephropathy through TLR2. 94th IADR, Seoul, JUN 2016.
3. Kaji C, Takara K, Sawa Y. The distribution of podoplanin in the tooth and craniofacial bone. 94th IADR, Seoul, JUN 2016.
4. Takara K, Kaji C, Hatakeyama Y, Sawa Y. The morphological investigation of head and neck organs in the systemic podoplanin knockout mice. 94th IADR, Seoul, JUN 2016.
5. Maruo S, Kajiwara K, Ishikawa H, Sawa Y. Study for the apical bud differentiation model using green mice. 94th IADR, Seoul, JUN

2016.

6. Takenawa S, Kim T, Takakusaki Y, Sato Y, Iida J, Sawa Y. The expression of podoplanin and bone-associated proteins after mechanical stress. 94th IADR, Seoul, JUN 2016.

【その他】平成 27 年度日本学術振興会外国人研究者招聘プログラムにて Prof. R.P. Darveau, Chair Dep. Periodontics, Univ. Washington とシンポジウム『歯周病原細菌の LPS を含む表層物質の構造と機能』を開催 (2015 年 7 月 16 日、福岡歯科大学、福岡市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

沢禎彦 (SAWA YOSHIHIKO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70271666

### (2)研究分担者

・坂上竜資 (SAKAGAMI RYUJI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：50215612

・加藤幸成 (KATO YUKINARI)

研究者番号：00571811

東北大学・医学研究科・教授

・畠山雄次 (HATAKEYAMA YUJI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：40302161

・福島秀文 (FUKUSHIMA HIDEHUMI)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：70412624