

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06802

研究課題名(和文) 口腔細菌が引き起こす糖尿病性腎症の発症機序とその予防に関するスタートアップ研究

研究課題名(英文) Start-up study for the promotion mechanisms of diabetic nephropathy by oral bacteria and the preventive dentistry

研究代表者

高田 俊輔 (Takata, Shunsuke)

福岡歯科大学・口腔歯学部・医員

研究者番号：10757826

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)：糖尿病の体内環境にある腎系球体がtoll-like receptor (TLR)を発現すること、歯周病原菌物質を定期的投与した糖尿病マウスが腎症になること、健康マウスは投与しても腎症にならないことを見出しました。TLRは主に白血球が発現して免疫を担う分子で、細菌を認識して炎症を起こします。血管は通常は発現しません。重い歯周病では菌が歯磨きで容易に血中に入るため、血中に入った菌が腎に辿り着き、糖尿病の系球体が発現するTLRと結合して腎症が起こることが考えられました。従って、糖尿病の方が歯周病を治療・予防することは、腎症を予防するのに大変重要であると結論されました。

研究成果の概要(英文)：We found that renal glomeruli in diabetic environment express toll-like receptors (TLR), and that diabetic mice administering periodontal pathogenic substances become nephropathy but healthy mice do not become nephropathy. TLR is an immune molecule that is primarily expressed on leukocyte, which recognizes bacteria and causes inflammation. Healthy blood vessels do not normally express. In heavy periodontitis, bacteria enter easily into the blood with brushing teeth, so it is thought that in human with both diabetes and periodontitis bacteria enter into the blood and arrive at the kidney, and nephropathy occurs by combining bacteria with TLR which is expressed in diabetic glomeruli. Therefore, it was concluded that treatment and prevention of periodontal disease in human with diabetes is very important for prevention of nephropathy.

研究分野：矯正歯科学

キーワード：糖尿病 腎症 Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide toll-like receptor

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

^{1,2)}。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。一方 toll-like receptor (TLR) は主に貪食細胞が発現する自然免疫受容体で、一般組織血管、また糖尿病の腎でも糸球体以外の腎血管は通常では発現は見られない。ところが、糸球体血管は糸玉状の特殊構造のため一般組織血管と比較して病原因子や免疫複合体が沈着し易く、糖尿病環境で発生した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、特異性をもたずに広く認識して TLR 発現細胞にサイトカイン産生を誘導する。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。重度の歯周疾患ではブラッシングで容易に菌血症が起こるため、血中に入った口腔微生物が腎に辿り着き糸球体内皮細胞の TLR と結合して糖尿病性腎症を発症させることは十分に考

えられる。以上を背景として、下記を遂

参考文献こととした。

- 1] Preshaw. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. Diabetologia 55:21-23, 2012
- 2] Shultis. Effect of periodontitis ...nephropathy end-

2. 研究の目的

歯周病原細菌由来の血中TLRリガンドによる糖尿病性腎症の発症機構の解明

糖尿病環境で発生した終末糖化産物が糸球体毛細血管に蓄積して内皮細胞に TLR 発現を誘導し、同時に慢性歯周疾患に起因して血中に入った歯周病原細菌成分の TLR リガンドが TLR を介して糸球体内皮細胞に認識され TGF- β 産生を促進することで、TGF- β 誘導性にメサンギウム細胞のコラーゲン過剰産生による糸球体硬化が誘導される機序を明らかにする。また、市販の歯周病原細菌由来 TLR リガンド投与糖尿病マウスに対する、TLR 拮抗剤による腎症予防効果を検討する。

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を応用した in vivo 解析

(1) 糖尿病モデルマウスの作製

Streptozotocin (STZ) 投与による膵ランゲルハンス島破壊型I型糖尿病ICRマウス、I型糖尿病 NOD マウス(九動) II型糖尿病の遺伝背景をもつ KK/Ta・KK/AyJcl マウス(九動)を高カロリー餌で飼育した II型糖尿病マウスを使用した。

(2) 糖尿病性腎症の誘発

糖尿病マウス頬粘膜下に口腔微生物成分の TLR リガンド (InvivoGen) を投与した *Porphyromonas gingivalis*

lipopolysaccharide

(Pg-LPS)。グルテストセンサーと検査紙でモニタリングしつつ、尿・血清のタンパク(アルブミン)糖、血中クレアチニンと尿素窒素測定を外注し、検査値から糖尿病性腎症の発症を判定した。また糖尿病性腎症の進行は、humane endpoint 判定、カプラン・マイヤー法、ログランク検定、ならびにコックス比例ハザードモデルを用いた計算と生存曲線によって決定した。

糖尿病マウスの TLR リガンドによる腎症の発症を肉眼解剖と組織像、および糸球体血管内皮細胞の TLR 活性化で産生される IL-6, TNF- α と IL-1 β などの炎症性サイトカインまた TGF- β の産生とコラーゲンの増生を免疫染色、染色領域のスキャンと ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD)による面積定量で解析した。

2) 培養細胞を応用した in vitro 解析

(1) 市販の腎系球体内皮細胞 (Primary Cell) を用いて CML (Toronto) など種々の AGE による AGE 受容体依存性 TLR2・4 の発現、TGF- β と I 型・IV 型コラーゲンの産生をリアルタイム PCR、ELISA 解析した。

(2) Pg-LPS による TLR シグナル伝達の活性化、また TLR 拮抗剤 Eritoran (Eisai Inc. USA) の TLR リガンド依存性シグナル伝達活性化に対するブロック効果を実験室 PCR によって証明した。Eritoran 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、 $IC_{50}=1.6nM$ の強力な TLR4 アンタゴニストで、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)。

2. 口腔微生物由来 TLR リガンド投与と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

I 型・II 型糖尿病マウスに TLR リガンドおよび Eritoran の類粘膜下投与群を設定し、腎症予防を血清・尿・組織検査と統計学的生命予後解析によって検討した。

2) 腎系球体組織解析

TLR2 と TLR4 の遺伝子発現を *in situ* hybridization (RNAscope 2.0 FFPE Assay, Advanced Cell Diagnostics) で免疫染色で確認した。I 型・IV 型コラーゲンとこれらの発現を誘導するサイトカインの発現を、組織 PCR、ELISA、ウェスタンブロットとイメージアナライザー、免疫染色の ImageJ による面積計算で定量し、糖尿病性腎症の発症抑制を検討した。

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

現在、福岡市透析センターとの連携により、糖尿病患者の歯周疾患の程度と腎症合併率を非浸襲性に調べ、多重変数解析・ロジスティック解析を行っている。

人権の保護及び法令等の遵守への対応

福岡市 11 透析施設における疫学調査は福岡歯科大学倫理審査臨床研究許可 316 号・利益相反審査 59 号。実験は倫理審査委員会承認 207 号・DNA 実験安全管理委員会承認 R12011 号、動物実験委員会承認 10023 号、遺伝子組換え生物安全委員会(第二種使用等拡散防止措置)承認 11003 号

4. 研究成果

申請者らは、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。TLR は主に貪食細胞が発現する自然免疫受容体で、一般組織血管、また糖尿病の腎でも糸球体以外の腎血管は通常では発現は見られない。ところが、糸球体血管は特殊構造のため免疫複合体が沈着し易く、糖尿病環境で発生した終末糖化産物 advanced glycosylated end-products (AGE) が糸球体に沈着し慢性的に刺激して、内皮細胞に TLR など免疫分子の発現をもたらすと考えられた。TLR 発現細胞では細菌成分の TLR を介した認識がサイトカイン産生を誘導する。申請者らは、TLR2 と TLR4 のリガンドの歯

周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (クルードでは TLR2 と TLR4 のリガンド) を定期的に微量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 endpoint に達したことを報告した。腎症を合併した糖尿病マウスでは、糸球体血管内皮細胞がコラーゲン産生を促す TGF- β の産生、メサンギウムにおける大量の type1 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、同様の LPS 投与を行った健常マウスでは見られなかった。現在、この *P. gingivalis* LPS による糖尿病性腎症モデルは STAT3 誘導性 TLR2 優位であり、TLR 阻害剤 Eritoran によって腎症の発症が予防できることまで明らかにしている (Eritoran は敗血症の特効薬として第 III 相臨床試験まで通過したもので、現在、無償で供給されている 83142-1:2013-0162:Eritoran/ E5564, Eisai Inc. USA)。さらに申請者らは、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、糸球体硬化では浮腫が発生しリンパ管増生が起こることを報告した。

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。重度の歯周疾患ではブラッシングで容易に菌血症が起こるため、血中に入った口腔微生物が腎に辿り着き糸球体内皮細胞の TLR と結合して糖尿病性腎症を発症させることは十分に考えられる。高血糖環境で発生する終末糖化産物 AGE は免疫原性があるため、AGE が糸球体に貯留し TLR の発現を誘導すると考えられる。この時、口腔に歯周病があれば、糸球体血管内皮細胞が TLR を介して血中の歯周病細菌成分を認識し TGF- β 産生と細胞外基質の増生が恒常的に起こることが予想された。糖尿病性腎症の病態はメサンギウム基質の増生と糸球体血管壁の肥厚による糸球体硬化である。糖尿病性腎症の発症機序と予防展開に口腔からアプローチした報告は国内外ともになく、糖尿病の腎糸球体における TLR 発現を示したのは申請者が初めてである。糖尿病性腎症の予防に口腔衛生学的方法論として歯周疾患の予防が重要であることを国民に発信できる。以上より、本研究によって、糖尿病環境誘導性にメサンギウム細胞のコラーゲン過剰産生 (糸球体硬化) が誘導される可能性

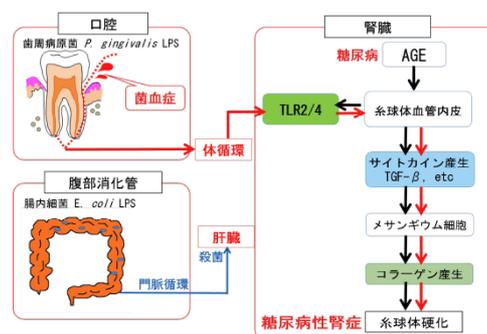


図1 歯周疾患と糖尿病性腎症の相関経路の仮説

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)

[論文](計 3 件)

1. Sawa, Y.,* Takata, S*, Hatakeyama, Y., Ishikawa, H., Tsuruga, E. Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. PLoS One 2014; 9(5): e97165.
2. Takata, S., Sawa, Y., Uchiyama, T., Ishikawa, H. Expression of Toll-Like Receptor 4 in Glomerular Endothelial Cells under Diabetic Conditions. Acta Histochem Cytochem. 2013; 46(1): 35-42.
3. Uchiyama, T., Takata, S., Ishikawa, H., Sawa, Y.*. Altered dynamics in the renal lymphatic circulation of type 1 and type 2 diabetic mice. Acta Histochem Cytochem. 2013; 46(2): 97-104.

[学会発表](計 19 件)

国際学会

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, Seoul, JUN 2016. J. Dent. Res. 94(S).
2. Kajiwara, K., Takata, S., Hatakeyama, Y., Ishikawa, H., Sawa, Y. *Porphyromonas Gingivalis*

lipopolysaccharide promote diabetic nephropathy through TLR2. 94th International Association of Dental Research, Seoul, JUN 2016. J. Dent. Res. 94(S).

3. Sawa, Y., Takata, S., Ishikawa H, Hatakeyama Y, Tsuruga E. Promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in diabetic kidney. 92th International Association of Dental Research, Cape Town, JUN 2014. J. Dent. Res. 92(S).
4. Takata, S., Kajiwara, K., Ishikawa, H., Sawa, Y. Promotion of diabetic nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* LPS. 62th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. Osaka, DEC 2014.

国内学会

1. 高田俊輔, 梶原弘一郎, 沢禎彦, 石川博之. 糖尿病マウス腎系球体における歯周病原菌由来 LPS による TLR2/4 依存性サイトカイン発現. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会. 千葉市, 2014年5月
2. 高田俊輔, 梶原弘一郎, 沢禎彦, 石川博之. Severe Periodontal Disease exacerbate Diabetic Nephropathy through Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. 第 57 回春季日本歯周病学会学術集会. 岐阜市, 2014年5月
3. 高田俊輔, 梶原弘一郎, 石川博之, 沢禎彦. 歯周病原菌由来 TLR リガンドによる糖尿病性腎症の促進. 第 56 回歯科基礎医学会, 福岡市,

2014年9月

4. 高田俊輔, 梶原弘一郎, 石川博之, 沢禎彦. 歯周病原性LPSによるTLRを介した糖尿病性腎症の促進について. 第41回福岡歯科大学学会総会, 福岡市, 2014年12月
5. 高田俊輔, 梶原弘一郎, 沢禎彦, 石川博之. *Porphyromonas gingivalis* 由来LPSは腎系球体のTLR2/4を介して糖尿病性腎症を促進する. 第73回日本矯正歯科学会大会, 福岡市, 2014年10月
6. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦. 糖尿病環境下の腎系球体内皮細胞におけるTLR2とTLR4の発現. 第55回歯科基礎医学会 学術大会・総会, 岡山市, 2013年9月
7. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦. 糖尿病環境下の腎系球体におけるToll-like receptor(TLR)2と4の発現. 第51回日本糖尿病学会九州地方会, 沖縄市, 2013年11月
8. 高田俊輔, 内山貴誠, 石川博之, 沢禎彦. 糖尿病モデルマウスの腎系球体におけるTLR2とTLR4の発現. 第40回福岡歯科大学学会総会. 福岡市, 2013年12月
9. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦. 糖尿病環境下の腎系球体におけるTLR2とTLR4の発現について. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 高松市2013年3月
10. 高田俊輔, 内山貴誠, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦. Expression of toll-like receptors in glomerular endothelial cells

under diabetic conditions. 第38回日本微小循環学会総会. 東京, 2013年2月

11. 高田俊輔, 内山貴誠, 石川博之, 沢禎彦. 糖尿病モデルマウス腎系球体におけるTLR2とTLR4の発現. 第28回日本糖尿病合併症学会. 旭川市, 2013年9月
12. 内山貴誠, 高田俊輔, 石川博之, 沢禎彦. 型と型糖尿病マウスにおける腎リンパ管増生について. 第51回日本糖尿病学会九州地方会. 沖縄市, 2013年11月
13. 内山貴誠, 高田俊輔, 石川博之, 沢禎彦. 型と型糖尿病モデルマウスにおける腎リンパ管新生について. 第40回福岡歯科大学学会総会. 福岡市, 2013年12月
14. 内山貴誠, 高田俊輔, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦. 糖尿病モデルマウスの腎リンパ管増生について. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 高松市2013年3月
15. 内山貴誠, 高田俊輔, 敦賀英知, 畠山雄次, 石川博之, 沢禎彦. 型と型糖尿病モデルマウスにおける腎リンパ管新生. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会. 岡山市, 2013年9月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田俊輔 (TAKATA, Shunsuke)
福岡歯科大学・口腔歯学部・医員
研究者番号: 10757826