

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 18 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390482

研究課題名(和文) 脂肪組織の老化が歯周疾患の病態に及ぼす影響の解明と予防・治療方法への応用

研究課題名(英文) Effect of senescent adipose tissue on periodontal disease states

研究代表者

秋房 住郎 (Akifusa, Sumio)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40295861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円、(間接経費) 3,960,000円

研究成果の概要(和文)：J774.1細胞とRAW264.7細胞は共にAPJを発現していた。APJをより強く発現していたJ774.1細胞を用い、代謝を受けにくいイソ型の[Pyr1]-apelin-13で前刺激をすると、LPS刺激が誘導するIL-1 $\beta$ 、ICAM-1遺伝子発現およびICAM-1のタンパク発現が抑制された。これらの結果より、apelinはLPS刺激が誘導するマクロファージの炎症反応を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：we investigated whether newly identified adipokine apelin had an inhibitory effect on inflammatory response in lipopolysaccharide (LPS)-treated macrophage. Pretreatment with apelin significantly reduced the production of proinflammatory cytokines in LPS-treated macrophage-like cell line, J774.1 cell. In addition, apelin pretreatment significantly reduced the LPS-induced phosphorylation of p38 MAPK and JNK, but not ERK. To the best of our knowledge, this is the first report that the apelin peptide family has anti-inflammatory effects against bacterial LPS stimulation in macrophages.

研究分野：社会系歯科学

科研費の分科・細目：予防歯科

キーワード：アディポカイン apelin 歯周疾患

1. 研究開始当初の背景

先進諸国で肥満に起因する疾病が大きな健康課題となって久しく、アメリカでは死亡の13%がBMI(体格指数)25以上の肥満に起因していると推定されている。一方、40~59歳を対象とした我が国の多目的コホート研究(Japan Public Health Center-based prospective Study)の研究結果では、もっとも死亡リスクの低いBMIは男性で23~27、女性では19~25であり、他諸国で肥満との関連が指摘されていない肺・胃・肝臓のがんや、低栄養で起こりやすい脳出血での死亡が多かったことから、日本人の死因とBMIの関連は、欧米人と異なることが指摘されている(International Journal of Obesity, 26, 2002)。

また、日本人の2型糖尿病患者の特徴の解明を研究目的としたJapan Diabetes Complications Studyの成果から、白人の2型糖尿病患者のBMI値は29.5と高いのに対し、日本人の値は23.1と低く、合併症が多かったことから(Lancet, 361, 2003)、肥満と疾病の間に日本人特有の病態があることが明らかになりつつある。

歯周疾患と糖尿病をはじめとするメタボリックシンドロームとの関連については、我々のグループを含む、国内外の多くの研究グループが報告しているが、分子生物学的研究はあまり報告がなく、特にアディポカインの免疫機能における役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

歯周疾患とメタボリックシンドロームの関連を検討するため、新規アディポカインのapelinについて、マクロファージおよび血管内皮細胞の免疫に与える影響について分子生物学的手法により解析することを目的とする。

apelinはオルファン受容体APJのリガンドとして同定された新規のアディポカインである。APJはGタンパク共役受容体で、アンジオテンシン1型受容体と相同性が高いがアンジオテンシンと結合しない。apelinは77アミノ酸の前駆体として脂肪細胞をはじめとする様々な細胞で産生され、C末端36アミノ酸の部分が成熟型として血中に存在する。活性を示すアイソフォームはapelin-36、-17、-13、-12が知られているが、C末端から13番目のグルタミンがピログルタミン酸に置換した[Pyr1]-apelin-13も生体内に存在し、分解を受けにくいことから最も高い活性を示す(Pharmacol Rev, 62(3): 331-342, 2010)。apelinは水分調節、血圧調整、心血管機能、血管新生、グルコース代謝など多面的な生理学的活性を示す。脾臓細胞や血球系細胞がAPJを発現していることから、免疫機能にも関与していることが指摘されているが、その詳細は不明な点が多い。

本研究では、新規アディポカインのapelinがマクロファージおよび血管内皮細胞の免疫機能に及ぼす影響についてin vitroにより検討した。

3. 研究の方法

(1) 試薬

[Pyr1]-apelin-13はPeptide Institute Inc、大腸菌由来リポ多糖(LPS)はSigma-Aldrich、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)はMolecular Probes、抗マウスAPJはGeneTex Inc、抗マウスactin抗体、抗マウスphosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase(p-p38 MAPK)抗体、抗マウスphosphorylated p44/42 MAPK(p-Erk1/2)抗体、抗マウスphosphorylated stress-activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase(p-SAPK/JNK)抗体、抗マウスIκB抗体、及び抗マウスICAM-1抗体はCell Signaling Technology, Incから購入した。

(2) 細胞

マクロファージ様細胞株は、マウス由来のJ774.1細胞(Japanese Cancer Research Resources Bank)およびRAW 264.7細胞(American Type Culture Collection)を用いた。また、血管内皮様細胞株としてマウス血管内皮細胞由来のUV 2細胞(RIKEN Cell Bank)を用いた。細胞培養は、J774.1細胞及びRAW 264.7細胞にはRPMI-1640を、UV 2細胞にはDulbecco's Modified Eagle Mediumにて、熱非働化10%ウシ胎児血清、penicillin G(100 U/mL)、streptomycin(100 μg/mL)をそれぞれ添加した液体培地により、37℃、5%CO<sub>2</sub>環境下で培養した。

(3) リアルタイム RT-PCR

RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit(Qiagen)にて調製したRNAをq-Script cDNA Supermix reagents(Quanta BioSciences)30分、42℃で逆転写した後、FastStart Essential DNA Green Master(Roche Diagnostics)を用いてLightcycler<sup>®</sup> Nono(Roche Diagnostics)にてリアルタイム RT-PCRを行った。mRNA量はGAPDHを基準としてΔΔCTにより算出した。用いたプライマーを表1に示す。

表1 使用したプライマー

primer	配列	上段: forward	下段: reverse
GAPDH	GACGCGGCATCTTCTTGA		
	CACACCGACCTTACCAATTT		
IL-1β	AGTTGACGGACCCAAAAGA		
	GGACAGCCAGGTCAAAGG		
IL-6	CCACGGCCTTCCCTACTTC		
	TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA		
ICAM-1	TGGCGGAAAGTTCCTGTT		
	TCCAGCCGAGGACCATAACA		

(4) ウェスタンブロット法

Protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) 含有 Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) にて、細胞溶解液を調製し、DC protein assay kit (Bio-Rad) でタンパク濃度を測定した。12.5%アクリルアミドゲルで SDS 電気泳動をした後、PVDF膜に転写し、30 分間 Blocking One (NACALAI TESQUE) にてブロッキングし、一次抗体で 4 °C にて一昼夜処理した。Horseradish peroxidase 結合二次抗体で処理後、ECL Prime Western Blotting Reagent (GE Healthcare) で発光させ、GelDoc XR Plus (Bio-Rad) にて検出した。

(5) ELISA

マクロファージ様細胞の培地への IL-6 の分泌量を mouse IL-6 ELISA kit (Thermo Fisher Scientific) にて検出した。検出にあたっては培地を 10 ~ 50 倍に希釈した。

(6) 統計解析

Student の t 検定を行い、 $P < 0.05$  を有意な差とした。

4. 研究成果

(1) APJ の発現について

J774.1 細胞、RAW 264.7 細胞及び UV 2 細胞はともに apelin の受容体である APJ を発現していた (図 1)。一方、LPS や [Pyr]1-apelin-13 による刺激により APJ の発現に変化は認められなかった。UV 2 細胞も同様に APJ を発現していた (data not shown)。

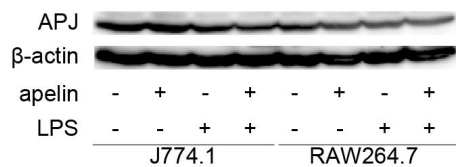


図 1 APJ の発現

(2) LPS が誘導する炎症性サイトカインの産生に対する apelin の効果

マクロファージ

1 μM の [Pyr]1-apelin-13 で 16 時間前培養した J774.1 細胞に 10 ng/ml の LPS にて 2 ~ 4 時間刺激したところ、前培養していない細胞と比べると、インターロイキン (IL) -1β と IL-6 の発現がそれぞれ  $65.2 \pm 4.2\%$  及び  $63.3 \pm 2.6\%$  低下した (図 2)。また、IL-6 の分泌量も有意に低下していた (図 3)。

血管内皮細胞

これに加えて、UV 2 細胞を TNF-α 1 及び 5 ng/ml で 30 分間刺激すると、ICAM-1 の mRNA は、未刺激を 1 とした場合それぞれ  $2.7 \pm 0.8$  倍、 $2.9 \pm 1.4$  倍発現が上昇した。一方、[Pyr]1-apelin-13 100 μM で一昼

夜処理した UV 2 細胞では、TNF-α 1 及び 5 ng/ml で刺激した群でそれぞれ、 $0.8 \pm 0.1$ 、 $1.4 \pm 0.1$  倍であった (図 4)。

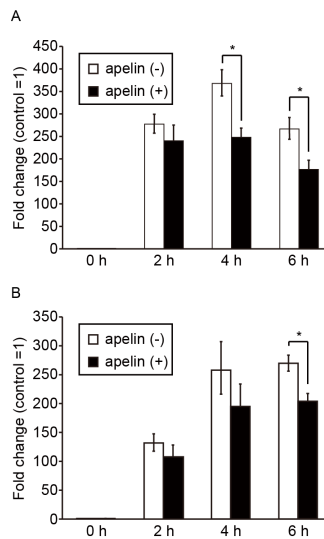


図 2 LPS が誘導する IL-1β (A) と IL-6 (B) の mRNA 発現量に対する apelin 前処理の効果

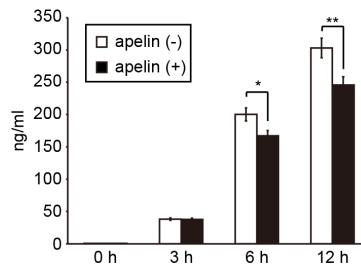


図 3 LPS が誘導する IL-6 の分泌量に対する apelin 前処理の効果

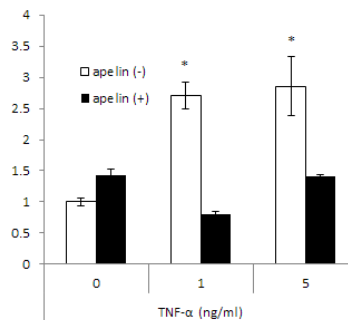


図 4 TNF-α が誘導する ICAM-1 の発現に及ぼす apelin 前処理の効果

(3) LPS が誘導する炎症性細胞内シグナルに対する apelin 前処理の効果

1 μM の [Pyr]1-apelin-13 で 16 時間前培養した J774.1 細胞に 10 ng/ml の LPS で 30 分間刺激した際の細胞内シグナルの変化についてウェスタンブロットにより解析した。図 5 に示すように、LPS 刺激により誘導された p38 MAPK および JNK のリン酸化は、[Pyr]1-apelin-13 の前処理により有意

に低下した。一方、ERK のリン酸および IκB の分解は抑制しなかった。

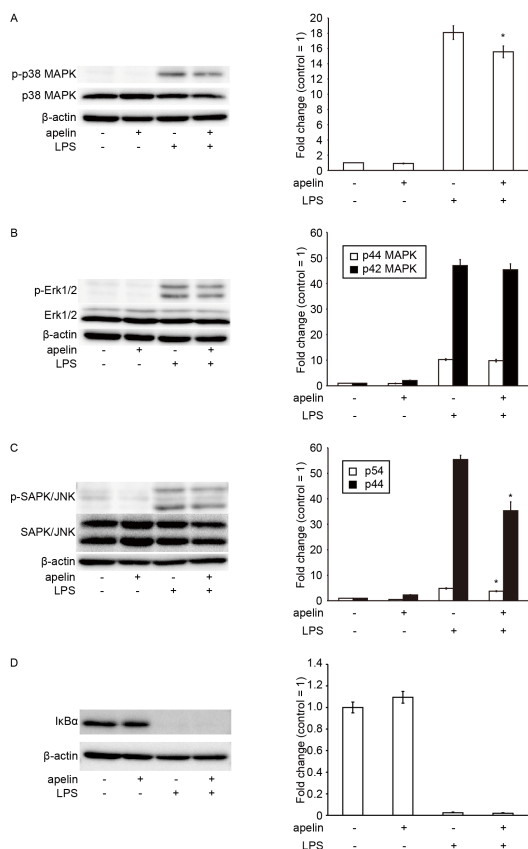


図 5 LPS が誘導する炎症性細胞内シグナルに対する apelin 前処理の効果

## 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 10 件)

1. Furuta M, Shimazaki Y, Takeshita T, Shibata Y, Akifusa S, Eshima N, Kiyohara Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Mukai N, Nagata M, Yamashita Y.: Gender differences in the association between metabolic syndrome and periodontal disease: the Hisayama Study. *J Clin Periodontol.* 40(8): 2013, 743-752. 査読あり doi: 10.1111/jcpe.12119.
2. Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A, Fujii H, Fujisawa R, Sonoki K.: High-level activities of daily living and disease-specific mortality during a 12-year follow-up of an octogenarian population. *Clin Interv Aging.* 8: 2013, 721-728. 査読あり doi: 10.2147/CIA.S43480.
3. Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A, Sonoki K.: Activities of daily living dependency and

disease-specific mortality during 12-year follow-up in an 80-year-old population. *Aging Clin Exp Res.* 25(2): 2013, 193-201. 査読あり doi: 10.1007/s40520-013-0029-6.

4. Takata Y, Ansai T, Soh I, Awano S, Nakamichi I, Akifusa S, Goto K, Yoshida A, Fujii H, Fujisawa R, Sonoki K.: Body mass index and disease-specific mortality in an 80-year-old population at the 12-year follow-up. *Arch Gerontol Geriatr.* 57(1): 2013, 46-53. 査読あり doi: 10.1016/j.archger.2013.02.006.
  5. Kikutani T, Yoshida M, Enoki H, Yamashita Y, Akifusa S, Shimazaki Y, Hirano H, Tamura F.: Relationship between nutrition status and dental occlusion in community-dwelling frail elderly people. *Geriatr Gerontol Int.* 13(1): 2013, 50-54. 査読あり doi: 10.1111/j.1447-0594.2012.00855.x.
  6. Okinaga T, Ariyoshi W, Akifusa S, Nishihara T.: Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Med Microbiol Immunol.* 202(2): 2013, 167-174. 査読あり doi: 10.1007/s00430-012-0282-x.
  7. Furuta M, Komiya-Nonaka M, Akifusa S, Shimazaki Y, Adachi M, Kinoshita T, Kikutani T, Yamashita Y. Interrelationship of oral health status, swallowing function, nutritional status, and cognitive ability with activities of daily living in Japanese elderly people receiving home care services due to physical disabilities.: *Community Dent Oral Epidemiol.* 41(2): 2013, 173-181. 査読あり doi: 10.1111/cdoe.12000.
  8. Shimazaki Y, Akifusa S, Takeshita T, Shibata Y, Doi Y, Hata J, Ninomiya T, Hirakawa Y, Kiyohara Y, Yamashita Y.: Effectiveness of the Salivary Occult Blood Test as a Screening Method for Periodontal Status. *J Periodontol.* 82(4) 2011, 581-587. 査読あり doi: 10.1902/jop.2010.100304.
  9. Kamio N, Akifusa S, Yamashita Y.: Diacylglycerol kinase alpha regulates globular adiponectin-induced reactive oxygen species. *Free Radic Res.* 45(3) 2011, 336-341. 査読あり doi: 10.3109/10715762.2010.532495.
  10. Fujimoto A, Akifusa S, Hirofujii T, Yamashita Y.: Involvement of suppressor of cytokine signaling-1 in globular adiponectin-induced granulocyte colony-stimulating factor in RAW 264 cell. *Mol Immunol.* 48(15-16): 2011, 2052-2858. 査読あり doi: 10.1016/j.molimm.2011.06.440.
- [学会発表](計 4 件)
1. 小原 成将: 新規アディポカイン apelin による炎症応答に対する影響. 日本歯科基礎医学会 2013 年 9 月 22 日、岡山
  2. 小原 成将: 新規アディポカイン apelin

は LPS によるマクロファージの炎症反応を抑制する．日本歯周病学会（春季）2013 年 6 月 1 日、昭和大学

- 3．小原 成将：新規アディポカイン apelin の免疫機能に対する影響について、2013 年 5 月 18 日、九州歯科大学
- 4．沖永 敏則：歯周病細菌感染が誘導するアポトーシスにおける SOCS 因子の役割．九州歯科学会 2011 年 5 月 28 日、九州歯科大学

〔図書〕(計 2 件)

1. Takata, Y., Ansai, T., Soh, I., Awano, S., Yoshitake, Y., Kimura, Y., Nakamichi, I., Akifusa, S., Goto, K., Yoshida, A., Fujisawa, R., Sonoki, K., Nishihara, T. InTech, Association of disease-specific mortality with fitness measurements and nonparticipation in an 80-year-old population. In: Geriatrics. 2012: 59-82.
2. Akifusa, S., Yamashita Y NOVA Science Publishers. Adiponectin: Production, Regulation and Roles in Disease. Chapter 4 - Adiponectin and macrophage. 2012: 39-48

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

秋房 住郎 (Sumio Akifusa)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40295861

### (2)研究分担者

高田 豊 (Yutaka Takata)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40163208

西原 達次 (Tatsuji Nishihara)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80192251