

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11384

研究課題名(和文) エネルギー代謝調節遺伝子UCPの閉経後女性歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症への関与

研究課題名(英文) Uncoupling protein genes associated with periodontitis, diabetes, obesity and osteoporosis in postmenopausal women

研究代表者

杉田 典子 (Sugita, Noriko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30313547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア内膜の脱共役タンパク(Uncoupling protein; UCP)はエネルギーを熱へと変換させる。UCP1は脂肪組織に、UCP2は白血球に、UCP3は主に骨格筋に発現する。UCPは糖・脂質・骨代謝を制御し、炎症への関わりも示唆されてきた。そこで閉経後日本人女性を対象に歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症とUCP遺伝型との関連性を検索し、歯周炎における役割を細胞実験で解析した。その結果、UCP2およびUCP3遺伝型は他の因子とは独立に重度歯周炎に関連性を示した。また白血球において歯周病原細菌による刺激時の活性酸素とサイトカイン産生はUCP2によって抑制されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Uncoupling proteins (UCPs) are mitochondrial membrane transporters which regulate the metabolism of carbohydrate, lipid, and bone. Genetic polymorphisms in UCPs are risk factors for diabetes, obesity and osteoporosis. Periodontitis has been reported to be associated with the systemic diseases. Therefore, we investigated the associations among UCP polymorphisms, periodontitis, diabetes, obesity and osteoporosis. As a result, UCP2 and UCP3 polymorphisms were associated with severe periodontitis independently of the systemic diseases, though the prevalence of periodontitis was not associated with the polymorphisms. Moreover, to elucidate the biological role of UCP2 in periodontitis, we performed experiments in human macrophages. The suppression of UCP2 expression significantly elevated the levels of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. The results suggested that UCPs may play roles in the pathogenesis of periodontitis.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 脱共役タンパク 閉経後女性 遺伝子多型 歯周医学 マクロファージ 歯周病原細菌 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアにおける電子伝達系と ATP 合成は、内膜でのプロトン濃度勾配によって密に共役している。脱共役タンパク (Uncoupling protein; UCP) は、酸化リン酸化の脱共役を行うことにより、エネルギーを ATP 合成に利用させずに熱へと変換させる。そのため過食による肥満を抑制する。

これまでに UCP1 から 6 が同定されているが、そのうち分布と機能がよく研究されているのは UCP1、UCP2、および UCP3 である。UCP1 は褐色脂肪組織に、UCP2 は白血球をはじめ全身の組織に広く発現し、UCP3 は主に骨格筋や褐色脂肪組織に発現するが胸腺や脾臓にも分布している。

UCP は糖・脂質・骨代謝を調節する機能を有することが知られており、そのため糖尿病、肥満、骨粗鬆症において、重要な役割を有する。加えて、免疫・炎症への UCP の関わりも示唆されてきた。UCP2 欠損マウスにおいては活性酸素産生が著しく増強され、トキソプラズマ感染抵抗性であった。UCP3 欠損マウスでは胸腺や脾臓の細胞構成が野生型とは異なっていたとの報告がある。

ケース・コントロール研究の結果からは、UCP1、UCP2 あるいは UCP3 の遺伝子多型と、糖尿病・肥満・骨粗鬆症との有意な関連性が報告されてきた。ただし UCP2 と UCP3 遺伝子は 11 番染色体長腕に近接して存在し、これらの遺伝子多型は強い連鎖不平衡を示す。

一方、閉経後女性においては、エストロゲン分泌の低下に伴い、糖尿病、内臓脂肪型肥満、骨粗鬆症を発症しやすくなると考えられている。

歯周炎と糖尿病・肥満・骨粗鬆症との関連性が多くの論文で報告されてきたが、これらの疾患が歯周炎を悪化させるのみでなく、歯周炎がこれらの疾患のリスク因子あるいは増悪因子となり得ることが示唆されている。これらのことから、UCP 遺伝型は歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症の共通リスク因子となる可能性が高いと予想された。しかしながら、歯周炎の発症または進行において、UCP が何等かの役割を果たしているか否かを検討した研究報告はまだなかった。

報告者らは、それまでに閉経後女性において糖尿病・肥満・骨粗鬆症と炎症抑制に関わる核内レセプター PPAR の遺伝子多型が歯周炎と骨密度の関係に影響を与える可能性を示唆した。また歯周炎と高感度 CRP との関連性も PPAR 遺伝型によって異なっていた。PPAR と UCP は、ともに代謝調節分子であり、PPAR は UCP の発現を制御している。さらに PPAR と UCP は、共に炎症に抑制的に関与する。また UCP 遺伝型は糖尿病・肥満・骨粗鬆症リスク因子である。

これらのことから、報告者らは、UCP が歯周炎の発症や進行に抑制的に働き、したがって UCP 遺伝型は歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症の共通リスク因子であり、歯周炎と糖尿

病・肥満・骨粗鬆症の関連性を増強させる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、閉経後日本人女性を対象に、歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症と UCP1、UCP2、UCP3 遺伝子多型との関連性を解析し、さらに、UCP の歯周炎における役割を細胞実験で解明することにより、歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症の診断と治療の発展に寄与することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) UCP1、UCP2 および UCP3 遺伝子多型と歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症の関連性についての解析方法

新潟市横越地区の閉経後女性を対象とした。同地区の 55 歳から 76 歳のすべての女性に参加を呼びかけた結果、674 人が参加に同意した。両側性卵巣除去手術を受けた人および、無歯顎者、喫煙者、透析患者、ステロイド、ビスフォスフォネート、選択的エストロゲンモジュレーター、活性型ビタミン D アナログ、ビタミン K、エストロゲン、あるいはカルシトニンの投与を受けている人は対象から除外した。また、後述するすべての検査について、欠測のあるケースを除外した。最終的な対象者は 352 名の女性(平均年齢 64±5 歳)であった。

身長と体重を測定し Body Mass Index (BMI) を算出し、25kg/m² 以上を肥満と定義した。静脈血を採取し、高感度 CRP、HbA1c を測定した。HbA1c について NGSP 値で 6.5% 以上を糖尿病とした。腰椎および大腿骨の骨密度を測定し、若年成人女性平均値に対するパーセンテージ(YAM%)において 70%未満を骨粗鬆症、80%未満を低骨密度(骨減少症および骨粗鬆症)とした。

歯周検査については 2 名の歯科医師が行い、すべての近心および頬側における probing pocket depth (PPD)、clinical attachment level (CAL)、bleeding on probing (BOP) を記録した。歯周検査結果より、2012 年発表の CDC-AAP による歯周炎分類法を用いて、歯周炎の有無および重度歯周炎の有無を定義した。

UCP 遺伝型については、末梢血から抽出したゲノム DNA を用いて TaqMan 法にて UCP1 rs1800592、UCP2 rs659366 および UCP3 rs2075577 の遺伝型タイピングを行った。call rate は 99.7% であった。

統計解析法として、最初に UCP1、UCP2 および UCP3 それぞれの Dominant model、Recessive model および Over-dominant model について上記定義による肥満、骨粗鬆症、骨減少症、糖尿病、歯周炎、重度歯周炎との関連性を年齢のみで調整し解析した。次いで各疾患をアウトカムとした多変量ロジスティック回帰分析を行った。

本研究においては書面による同意を得ら

れた女性のみを対象とした。本研究の内容はヘルシンキ宣言に則しており、新潟大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。

(2) *Porphyromonas gingivalis* 由来 lipopolysaccharide (LPS) 刺激時の THP-1 由来マクロファージ様細胞における活性酸素産生および炎症性サイトカイン発現に対する UCP2 ノックダウンの影響の解析方法

ヒト単球系細胞 THP-1 を phorbol myristate acetate にて刺激しマクロファージ様細胞に分化させ実験に供した。コントロールあるいは UCP2 特異的 siRNA を Xfect transfection reagent (クオンテック社) を用いて細胞内にトランスフェクトした後、*Porphyromonas gingivalis* 381 由来の LPS にて 6~24 時間刺激した。活性酸素測定は DCFH-DA を含む発色キットを用いて reactive oxygen species (ROS) を蛍光プレートリーダーにて測定した。炎症性サイトカイン産生については IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、MCP-1 の mRNA 発現レベルを定量的 PCR にて測定した。いずれも、未刺激、コントロール siRNA と UCP2 特異的 siRNA の結果を比較した。

4. 研究成果

(1) UCP1、UCP2 および UCP3 遺伝子多型と歯周炎・糖尿病・肥満・骨粗鬆症の関連性についての解析結果

本研究対象者である閉経後女性において UCP1 rs1800592、UCP2 rs659366 および UCP3 rs2075577 の遺伝型分布はいずれも Hardy-Weinberg 平衡にあった。UCP2 と UCP3 の遺伝子多型間に強い連鎖不平衡が観察された ($D' = 0.93, r^2 = 0.773$)。UCP1、UCP2 および UCP3 遺伝型およびアレル間の比較を行った結果、年齢、糖尿病、肥満、骨粗鬆症、歯周炎の有無に関して有意差は認められなかった。しかし、低骨密度および重度歯周炎の有無について UCP2 および UCP3 遺伝型分布の有意な偏りが認められた。年齢で調整したそれぞれのオッズ比を示す(表1)。UCP1 についてはいずれの疾患についても、有意な関連性は認められなかった。なお UCP2 および UCP3 について年齢で調整した後も糖尿病、肥満、骨粗鬆症、歯周炎の有無と遺伝子型に有意な関連性が認められなかった。

表 1. 年齢で調整したオッズ比 (95%CI)

遺伝型	アウトカム	
	低骨密度	重度歯周炎
UCP2		
GGvsGA+AA	0.57(0.35-0.95)	1.00(0.48-2.08)
AAvsGA+GG	1.05(0.61-1.81)	2.41(1.20-4.82)
AA+GGvsGA	0.67(0.43-1.04)	1.99(1.03-3.87)
UCP3		
CCvsCT+TT	0.50(0.29-0.85)	1.34(0.65-2.76)
TTvsCT+CC	1.38(0.81-2.31)	2.71(1.39-3.30)
CC+TTvsCT	0.76(0.49-1.19)	3.15(1.56-6.40)

太字は有意な関連あり。

次いで、重度歯周炎と肥満、あるいは重度歯周炎と低骨密度との関係に UCP 遺伝型が影響を与えるか否かを調べた。この解析においては表1の結果より Over-dominant model を採用した。

表 2. 肥満あるいは低骨密度をアウトカムとした場合の重度歯周炎が示すオッズ比と 95%CI を各遺伝型間で比較 (年齢で調整)

遺伝型	アウトカム	
	肥満	低骨密度
UCP2		
AA+GG	0.72(0.27-1.94)	2.65(1.08-6.53)
GA	1.07(0.35-3.25)	0.90(0.29-2.78)
UCP3		
CC+TT	0.57(0.22-1.51)	2.60(1.09-6.19)
CT	1.78(0.53-5.90)	0.81(0.23-2.78)

太字は有意な関連あり。

次に、重度歯周炎をアウトカムとした場合に UCP 遺伝型が各疾患・検査値との関連性に影響を与えるか多変量解析にて調べた。投入する UCP 遺伝型としては、単変量解析において最も高いオッズ比を示すものを選択した。

表 3. 重度歯周炎をアウトカムとした多重ロジスティック回帰分析

	変数	オッズ比 (95%CI)
Model1	年齢	0.96(0.96-1.03)
	肥満	1.13(0.52-2.46)
	低骨密度	1.70(0.81-3.54)
Model2	年齢	0.97(0.90-1.04)
	肥満	1.20(0.55-2.63)
	低骨密度	1.72(0.82-3.61)
	UCP2 AA	2.32(1.14-4.72)
Model3	年齢	0.97(0.91-1.04)
	肥満	1.20(0.54-2.64)
	低骨密度	1.85(0.87-3.93)
	UCP3 CC+TT	3.20(1.56-6.60)

太字は有意な関連あり。

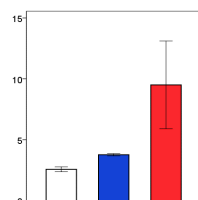
遺伝子多型関連研究の結果のまとめ：

閉経後日本人女性において、UCP2 および UCP3 遺伝型は他のリスク因子とは独立に重度歯周炎に関連性を示した。しかし歯周炎の有無とは関連性が認められなかった。

また、UCP2 および UCP3 遺伝型のうちホモ遺伝型保有者で低骨密度と重度歯周炎の強い関連性が認められたが、ヘテロ遺伝型保有者では有意な関連性が認められなかった。

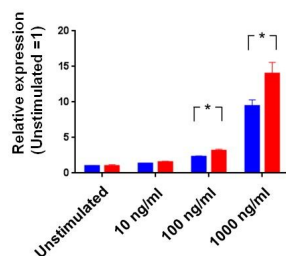
(2) THP-1 由来マクロファージ様細胞における *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS 刺激時の活性酸素産生および炎症性サイトカイン発現に対する UCP2 ノックダウンの影響

図1. THP-1 由来マクロファージ様細胞における *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS 刺激時の活性酸素 (ROS) 産生への UCP2 ノックダウンの効果



ROS 産生レベル. 100ng/ml の LPS にて 6 時間刺激した。白: 未刺激、青: コントロール siRNA、赤: UCP2 特異的 siRNA. 平均値±標準偏差。コントロールと UCP2 特異的 siRNA の間に有意差が認められた (n=6、p<0.05、t-test)。

図2. THP-1 由来マクロファージ様細胞において *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS 刺激時の炎症性サイトカイン産生への UCP2 ノックダウンの効果



UCP2 ノックダウンによる IL-1 β mRNA 発現レベルの増加. 10, 100, 1000ng/ml の LPS にて 24 時間刺激した。青: コントロール siRNA、赤: UCP2 特異的 siRNA. 平均値±標準偏差。コントロールと UCP2 特異的 siRNA の間に有意差が認められた (n=3、*p<0.05、**p<0.01、t-test)。IL-8 および TNF- α についても同様に有意な増加が認められた。IL-6 および MCP-1 については有意差が認められなかった。

細胞実験の結果のまとめ：

THP-1 由来マクロファージ様細胞において *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS 刺激時の活性酸素産生および炎症性サイトカイン産生は UCP2 mRNA の発現抑制によっていずれも増強された。

結論：

遺伝子多型関連研究ならびに細胞実験の結果より、UCP2 は歯周病原細菌 LPS 刺激時の活性酸素およびサイトカイン産生を抑制する機能を介して歯周炎の重症化において重要な役割を演じることが示唆された。なお、UCP3 遺伝子型も重度歯周炎に強い関連性を示したが、UCP2 と UCP3 遺伝子多型の連鎖不平衡が強いため、両遺伝子の機能のいずれの機能が主に関与しているのか、UCP3 による胸腺・脾臓の細胞構成への制御などを含めて今後の研究で解明する必要がある。ま

たヘテロ接合体において重度歯周炎抵抗性を示す結果となったことは *in vivo* 研究にて機序を解明する必要性を示唆している。

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6件)

Kuroki A, Sugita N, Komatsu S, Yokoseki A, Yoshihara A, Kobayashi T, Nakamura K, Momotsu T, Endo N, Sato K, Narita I, Yoshie H. Association of liver enzyme levels and alveolar bone loss: A cross-sectional clinical study in Sado Island. J Clin Exp Dent. 2018 Feb 1;10(2): e100-e106. doi: 10.4317/jced.54555. eCollection 2018.

Yoshihara A, Sugita N, Iwasaki M, Wang Y, Miyazaki H, Yoshie H, Nakamura K. Relationship between renal function and periodontal disease in community-dwelling elderly women with different genotypes. Journal of Clinical Periodontology 44(5);484-489.2017. doi: 10.1111/jcpe.12708.

Wang Y, Sugita N, Yoshihara A, Iwasaki M, Miyazaki H, Nakamura K, Yoshie H. PPARgamma gene polymorphism, C-reactive protein level, BMI and periodontitis in post-menopausal Japanese women. Gerodontology 33(1):44-51.2016. doi: 10.1111/ger.12110.

杉田典子、吉江弘正. 閉経後女性における歯周炎. 日本歯周病学会会誌 57 巻 4 号 p143-148. 2015.

Yoshihara A, Sugita N, Iwasaki M, Wang Y, Miyazaki H, Yoshie H, Nakamura K. The interaction between beta-3 adrenergic receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene polymorphism to periodontal disease in community-dwelling elderly Japanese. Journal of Periodontology 86(8);955-963 2015. doi: 10.1902/jop.2015.140472.

Hanai Y, Sugita N, Wang Y, Yoshihara A, Iwasaki M, Miyazaki H, Nakamura K, Yoshie H. Relationship between IL-6 polymorphism, low BMD and periodontitis in postmenopausal women. Archives of Oral Biology 60(4);533-539. 2015. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.12.005.

[学会発表](計11件)

車玉蘭、杉田典子、高橋直紀、吉江弘正. ヒト歯根膜線維芽細胞における歯周病原細菌由来 LPS 刺激による MAEA 発現変動とその機能の解析. 日本歯周病学会 60 周年記念京

都大会 2017/12/16 京都市.

杉田典子、車玉蘭、高橋直紀、高見澤圭、吉江弘正. *P. gingivalis* LPS 刺激 THP-1 細胞における UCP2 の炎症制御機能. 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 2017/12/16 京都市.

黒木歩、杉田典子、葭原明弘、小林哲夫、吉江弘正. 佐渡在住の成人における歯槽骨吸収度と血中肝機能マーカーとの関連性について. 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 2016/5/20 鹿児島市.

Che Y, Sugita N, Yoshihara A, Hanai Y, Iwasaki M, Miyazaki H, Yoshie H. The relationship between macrophage erythroblast attacher (MAEA) gene polymorphism and periodontitis in postmenopausal Japanese women. 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 2016/5/20 鹿児島市.

Che Y, Sugita N, Takahashi N, Yoshihara A, Hanai Y, Iwasaki M, Miyazaki H, Nakamura K, Yoshie H. Macrophage erythroblast attacher gene polymorphism and periodontitis in postmenopausal Japanese women. General Session & Exhibition of the IADR 2016/3/23 ソウル、韓国.

Sugita N, Takahashi N, Che Y, Yoshie H. Regulation of UCP2 by *Porphyromonas gingivalis* LPS in THP-1 macrophages. 94th General Session & Exhibition of the IADR 2016/3/23 ソウル、韓国.

杉田典子、葭原明弘、花井悠貴、岩崎正則、宮崎秀夫、吉江弘正 UCP2 遺伝子多型が閉経後女性の歯周炎と腎機能の関性に及ぼす影響. 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会 2015/9/12 浜松市.

Che Y, Sugita N, Hanai Y, Yoshihara A, Wang Y, Iwasaki M, Miyazaki H, Nakamura K, Yoshie H. The effect of macrophage erythroblast attacher (MAEA) gene polymorphism on the relationships between periodontitis and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. EuroPerio8 2015/6/5 ロンドン、英国.

Kuroki A, Sugita N, Yoshihara A, Kobayashi T, Yoshie H. Association of periodontal parameters and gamma-glutamyl transpeptidase in Japanese adults. EuroPerio8 2015/6/6 ロンドン、英国.

Hanai Y, Sugita N, Yoshihara A, Iwasaki M, Miyazaki H, Nakamura K, Yoshie H. Relationship between genetic polymorphism of inflammatory cytokine, CRP levels and periodontitis. EuroPerio8 2015/6/5 ロンドン、英国.

Sugita N, Yoshihara A, Hanai Y, Iwasaki M, Miyazaki H, Nakamura K, Yoshie H. Variants in uncoupling protein genes associated with severe periodontitis in postmenopausal Japanese women. EuroPerio8 2015/6/4 ロンドン、英国.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 典子 (SUGITA NORIKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30313547

(3) 連携研究者

中村 和利 (NAKAMURA KAZUTOSHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70207869