

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11386

研究課題名(和文) 低分子メタボロームの質量分析による歯周病と全身疾患の相互連関メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring the molecular mechanism that correlates periodontal disease with systemic disease by metabolome analysis

研究代表者

野崎 剛徳 (NOZAKI, Takenori)

大阪大学・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：30263304

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)：本研究では、歯周病と全身疾患が相互に関連する分子機構を明らかにすることを目的として、肥満病態によって誘導される代謝産物と、歯周病によって変化する代謝産物の関係を、メタボローム解析およびリポドーム解析により検討した。その結果、末梢血中のメタボローム、リポドームを解析することにより、肥満病態によって生じる代謝系の変化を捉えることが可能であること、また歯周病によっても、これらの分子が変動することが示された。この結果から、これらの特定の分子が、歯周病と全身疾患を繋ぐ鍵となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the molecular group that contributes to bidirectional correlation between periodontal disease and systemic disease. In this study, we investigated the relationship between molecules that produced as the result of the metabolic fluctuation in obesity condition, and metabolites that produced at the site of periodontal disease, by metabolomic and lipidomic analysis. As the result, it becomes clear that we can assess the metabolic fluctuation arise from obesity by detecting the metabolome and/or lipidome in the serum. Moreover, it becomes clear that the amount of metabolites produced at the site of periodontal disease change along with periodontal condition. These results suggest that these metabolites can be the key molecules that correlate between periodontal disease and systemic disease.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 全身疾患 メタボロミクス リポドミクス

1. 研究開始当初の背景

歯周病と種々の全身疾患は密接に関係し、相互に影響を及ぼすことが、多くの臨床研究によって示されている。例えば、糖尿病は歯周病のリスクファクターである一方、歯周病は糖尿病の第六番目の合併症とされるなど、両者は密接な相互関係にあることが知られている。また歯周炎患者が健常者に比べて冠動脈疾患を発症しやすいとの報告や、重度歯周病患者は心臓発作を起こすリスクが2.8倍高いという報告、さらには歯周病が肥満病態をはじめとしたメタボリックシンドロームとオッズ比 1.35 で関連することなどが知られている。しかし、歯周病と全身疾患のこのような関連が、いかなる機構を介して生じるのかに関しては、未だ不明のままとなっている。現在は歯周病とこれらの全身疾患が共通のリスクファクターを共有するとの仮説や、歯周病原性細菌の菌体・細菌由来成分や、互いの疾患に起因して産生される諸因子が血流を介して相互に移行することにより、疾患が相互に関連しているのではないかとの仮説が立てられ、それを実証するために多くの研究が進められているが、その双方向性影響の全貌を検討した報告は未だ無く、その解明が強く求められている

2. 研究の目的

本研究では、メタボリックシンドロームが代謝系に異常をきたす病態を示すこと、また歯周病が炎症による局所代謝変動を生ずる疾患である点に着目し、従来の手法では解析が困難であった低分子メタボロームとリポドームに焦点を合わせ、マススペクトロメトリーを用いた代謝物質の解析を行うことで、歯周病と全身疾患の相互関連メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肥満モデル動物および歯周病モデル動物の作製:

実験には5週齢の C57BL/6 マウス、ならびに肥満病態を誘導した際に正常マウスと異なる骨吸収像を示す PLAP-1 (Periodontal ligament-associated protein -1) ノックアウトマウスを用いた。これらのマウスに対し、4ヶ月間にわたって高脂肪食の給餌を行うことで、肥満モデルマウスを作製した。この間、経時的に各時点でグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行って、マウスの全身状態を確認した。また C57BL/6 マウスの上顎第二臼歯に 8-0 絹糸を結紮して放置することで、歯周病モデルマウスを作製した。そしてこれらのモデル動物の外側尾静脈から、検体として 20 μ L の末梢血を採取した。

(2) メタボローム分析:

採取した血液にメタノール/水/クロロホルムおよび 2-イソプロピルリンゴ酸を添加し、遠心濃縮および凍結乾燥を行った後、ピリジンに溶かしたメトキシアミン塩酸塩

(20mg/mL) を添加して 30°C にてインキュベートし、さらに N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを添加して 37°C でインキュベートすることで、誘導体化を行なった。そしてキャリアガスにヘリウムを用い、誘導体化した試料を 80°C から 330°C まで 15°C/min で昇温した後、注入温度 230°C、スプリット比 10:1 でカラム (CP-Sil 8CB) に注入した後、JMS-Q1000GC (JEOL, Japan) を用いてガスクロマトグラフ/マススペクトロメトリー (GC/MS) による質量分析を行った。

(3) リポドーム分析:

採取したマウス血液に抽出溶媒を添加して振盪した後、16,000 \times g で遠心して上層 (水層) と下層 (クロロホルム相) を分離し、それぞれの層の溶液を回収した。この下層に対し、溶液からクロロホルムを気化蒸散させた後に、一定量の内部標準物質 (SM d18:1-17:0 および FFA 17:0) を添加し、さらに混合溶媒を添加して、超臨界流体抽出/超臨界流体クロマトグラフシステム (Nexera UC, Shimadzu Co.) にて超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) 分析を行い、さらにそのカラム溶出液をハイブリッド四重極-オービトラップ質量分析計 (Q-exactive, Thermo Fisher Scientific, Inc.) にて、ポジティブイオンモードとネガティブイオンモードの両者で分析した。

(4) 肥満モデル動物におけるメタボロームおよびプロテオームの相関解析:

GC/MS および SFC/MS によって得られたデータを基に TIC クロマトグラムを描出し、さらに主成分分析、相関解析を行うことで、肥満病態における、メタボライトならびにプロテオームの変動を解析した。

4. 研究成果

(1) 検体の前処理法の確立:

正常マウスと肥満モデルマウスの血清のメタボローム分析に先立って、検体の前処理法の最適化を行った。これにより、低分子メタボロームを広いレンジで、高感度かつ高解像度に検出することが可能となった。この方法を用いて正常マウスと肥満マウス血清の GC/MS 分析を行い、TIC Chromatogram を描出したところ、80 以上のピークが検出された。このうち主要な 31 のピークパターンを比較した結果、肥満マウスでは通常食のマウスに

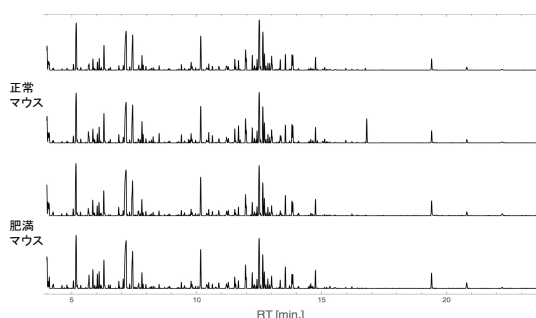


図1: 正常マウスと肥満モデルマウス血清のTIC Chromatogram

比べて、27種の代謝産物で検出量が上昇していたが、このうち2倍以上の上昇が見られたピークは6種のみで、これらを除くほとんどの代謝産物では、特徴的な検出パターンの変化が認められなかった(図1)。

(2) 主成分分析:

正常マウスと肥満マウスの血清中の低分子メタボローム(図2)、およびリポドーム(図3)の主成分分析を行なった。その結果、いずれの分析においても、正常マウスと肥満マウスのプロットが、明確に分離されることが示された。さらにリポドーム分析において、PLAP-1ノックアウトマウスは、正常マウス、肥満マウスのいずれとも異なる位置にプロットされることが示された。

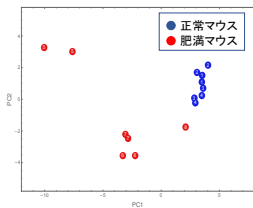


図2: 正常マウスと肥満マウスの血清低分子メタボロームの主成分分析

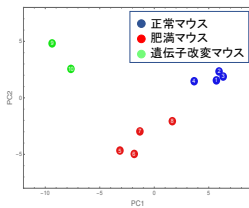


図3: 正常マウスと肥満マウスの血清リポドームの主成分分析

(3) 低分子メタボロームのピーク面積分布:

TIC Chromatogram 解析によって、正常マウスと肥満マウスでは、血清中の一部の低分子メタボロームの発現パターンに違いがあることが明らかになったため、いかなるメタボライトが代謝系の差異を代表するのか、また肥満病態の峻別に有用であるのかを明らかにするために、主要な31のピークに関して面積分布解析(図4)と、識別寄与率の解析(図5)を行なった。

その結果、肥満マウスでのみ検出されるメタボライト(RT=11.74)が存在することが明らか

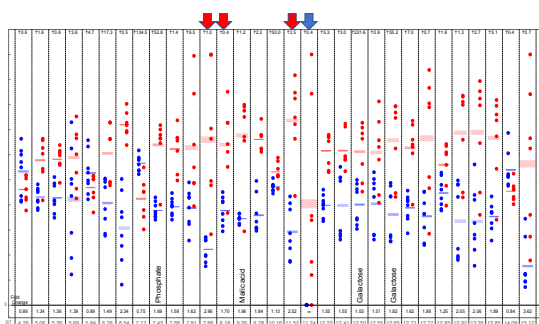


図4: 正常マウスと肥満マウスの血清低分子メタボロームのピーク面積分布解析

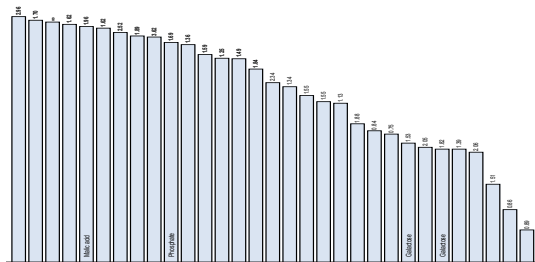


図5: 各低分子メタボロームの、正常マウスと肥満マウスにおける寄与率

かになるとともに(青矢印)、数種の特定のメタボライトに2倍を超える変動が生じており、そのうちの特定分子が、肥満マウスの峻別に高い寄与率を示すことが明らかとなった(赤矢印)。

(4) リポドーム分析:

正常マウス、肥満マウスおよびPLAP-1ノックアウトマウスの血清中のリポドームを網羅的に検索した結果、約160種のリポドームが検出された。そして各脂質クラス別にその量を比較した結果、肥満マウスでは正常マウスに比べてスフィンゴミエリンが1.44倍に増加(p=0.0145)すること、またリゾホスファチジルエタノールアミンが0.58倍に減少すること(p=0.0301)が示された(表1)。

表1: 正常マウスと肥満マウスにおける血清中の各脂質クラス量の比較

Lipid class	Lipid	Fold change (高脂肪食/通常食)	Student's t-test (通常食 vs 高脂肪食) p value
Free fatty acid (FFA)		1.19	0.3075
Lysophosphatidylcholine (LPC)		0.79	0.2424
Lysophosphatidylethanolamine (LPE)		0.58	0.0301
Phosphatidylcholine (PC)		0.85	0.2027
Phosphatidylethanolamine (PE)		1.01	0.9400
Phosphatidylinositol (PI)		1.11	0.3530
Sphingomyelin (SM)		1.44	0.0145
Ceramide (Cer)		1.02	0.8946
Cholesterol ester (CE)		0.91	0.4011
Diacylglycerol (DAG)		1.37	0.2401
Triacylglycerol (TAG)		1.42	0.1614

さらにリポドームの変化率とともに、正常マウスと肥満マウスを峻別する寄与率を解析した結果、Free fatty acid (FFA) 20:5、Lysophosphatidylcholine (LPC) 18:1、Phosphatidylinositol (PI) 38:5、Cholesterol ester (CE) 16:1、Sphingomyelin (SM) d18:1-18:0、d18:1-18:2、d18:1-20:0、d18:1-22:0、Triacylglycerol (TAG) 56:8、56:9、56:10、58:10、58:11、60:11、60:12、60:13、62:12、62:13、62:14が、高い峻別寄与率を示した(図6)。

一方、PLAP-1ノックアウトマウスにおいては、肥満マウスと同程度の検出量増加が見られるリポドーム(LPC18:1、PI38:5、CE16:1およびTAG56:10、58:10、58:11、60:11、

表2: 正常マウスと肥満マウスにおける血清中のリポドームの変動率

Lipid class	Lipid	Fold change (高脂肪食/通常食)	Student's t-test (通常食 vs 高脂肪食) p value
Lysophosphatidylcholine (LPC)	LPC 18:1	0.32	0.0020
Phosphatidylinositol (PI)	PI 38:5	0.39	0.0006
Cholesterol ester (CE)	CE 16:1	0.17	0.0001
Sphingomyelin (SM)	SM d18:1-18:0	2.18	0.0005
	SM d18:1-18:2	3.47	0.0004
	SM d18:1-20:0	3.25	0.0001
	SM d18:1-22:0	2.63	0.0024
Triacylglycerol (TAG)	TAG 56:8	5.04	0.0018
	TAG 56:9	5.21	0.0029
	TAG 56:10	6.94	0.0049
	TAG 58:10	5.14	0.0003
	TAG 58:11	12.87	0.0034
	TAG 60:11	5.21	0.0004
	TAG 60:12	9.70	0.0012
TAG 60:13	24.56	0.0086	
TAG 62:12	8.17	0.0002	
TAG 62:13	7.97	0.0017	
TAG 62:14	12.42	0.0017	

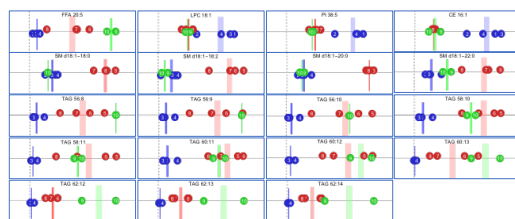


図6: 正常マウス、肥満マウス、およびPLAP-1ノックアウトマウスの血清における各種リポドームのピーク面積分布解析

60:12) や、肥満マウス以上の検出量増加が見られるリピドーム (FFA 20:5, TAG 56:8, 56:9, 60:13, 62:12, 60:13, 62:14) が多いことが明らかになったが、その一方で Sphingomyelin については、いずれのリピドームも正常マウスとほぼ同じ検出量を示した。

これらの結果は、末梢血中のメタボローム、リピドームを解析することにより、肥満病態によって生じる代謝系の変化を捉えることが可能であることを示すものである。報告者らは、歯周病の状態によって病変部におけるメタボローム量に変動が生じることを明らかにしているが (図7)、その一部は本研究において肥満病態の誘導によって産生量が増加するメタボロームと一致した。

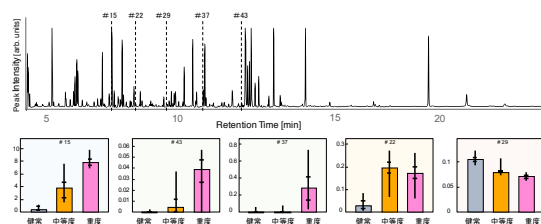


図7: 歯周病の状態とメタボローム量の関係

本研究によって、肥満病態の誘導により代謝系が変移し、血清中のメタボローム、プロテオームに変動が生じること、また変動する分子の一部は、歯周病の状態により量に変化が生じる分子と一致していることが示され、これらの分子が歯周病と全身疾患を繋ぐ鍵になっている可能性が示唆された。

今後は、歯周病の進行によって生じる代謝産物の変動が、生活習慣病の増悪を引き起こす機序を解明するための分子基盤情報について、より詳細に検討していきたいと考えている。

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 1 件)

- ① Ozeki M, Nozaki T, Aoki J, Bamba T, Jensen KR, Murakami S, Toyoda M. Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Mass Spectrom*. 2016;5(1):A0047 (査読あり)
DOI: 10.5702/massspectrometry.A0047

[学会発表] (計 4 件)

- ① 野崎剛徳、尾関美穂、青木 純、馬場健史、Kirk R. Jensen、柳田 学、北垣次郎太、北村正博、豊田岐聡、村上伸也、GC/MS によるメタボローム解析の歯周病診断への応用、第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016 年、新潟県新潟市
- ② 野崎剛徳、馬場健史、柳田 学、北垣次郎太、豊田岐聡 他、GC/MS によるメタボロ

ーム解析の歯周病診断への応用、ジオミクス研究会、2016 年、大阪府豊中市

- ③ 野崎剛徳、馬場健史、柳田 学、北垣次郎太、豊田岐聡 他、メタボローム解析の歯周病診断への応用、質量分析オープンイノベーションフォーラム、2018 年、大阪府豊中市

- ④ 大須賀潤一、野崎剛徳、村上伸也、豊田岐聡、医療診断のための口腔内揮発性成分分析手法開発、第 66 回質量分析討論会 (日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会)、2018 年、大阪府吹田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 剛徳 (NOZAKI Takenori)
大阪大学・歯学部附属病院・准教授
研究者番号: 30263304

(2) 研究分担者

豊田 岐聡 (TOYODA Michisato)
大阪大学・理学部・教授
研究者番号: 80283828

馬場 健史 (BAMBA Takeshi)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号: 10432444

柳田 学 (YANAGITA Manabu)
大阪大学・歯学研究科・招へい教員
研究者番号: 80379081

北垣 次郎太 (KITAGAKI Jirota)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 90570292