

令和元年6月7日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11420

研究課題名(和文) 歯周病と糖尿病によるNASH肝がん発症機序における相互作用解析

研究課題名(英文) Interaction analysis of NASH liver cancer pathogenesis by periodontal disease and diabetes

研究代表者

古堅 麗子 (FURUGEN, Reiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：90253674

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)：ヒト肝細胞と肝がん細胞を単独またはヒト由来単球・好中球・単球系細胞と共培養し、歯周病関連細菌由来LPSで刺激後の各種細胞のケモカイン産生と活性酸素(ROS)、接着因子発現の変化をみる。また、レジスチンやアディポネクチン、TNF- α や高血糖と併用でのLPS刺激後の細胞の変化について確認する。各種シグナル伝達阻害剤での変化やレジスチンの合成siRNAを遺伝子導入した細胞において、発現の変化とシグナル伝達経路を解析する。イメージングサイトメーターにより、細胞の形態変化と発現の強さとの相関を解析し、相互作用を詳細に解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病がNASHの2nd Hit に関与している可能性、さらに発がんとの関わりについて、我々がすでに確立した共培養システムを応用することで、肝細胞と好中球や単球との相互作用を含めて明らかにできる。我々が確認している好中球からのレジスチンやMMP-9の放出は、それぞれ単独でのがんとの関連は報告があるが、両方加えた状態での変化については、報告がない。がん周囲は、マクロファージや好中球が浸潤していることから、3D培養プレートを用いた共培養は、より生体に近い状態のモデル化ともいえる。肝細胞の併用により、歯周病による炎症と糖尿病によるNASH、肝がん進行への影響の相互作用を解析することが可能である。

研究成果の概要(英文)：Chemokine production and reactive oxygen species (ROS) of various cells after stimulation with human periodontitis-related bacterial LPS by culturing human hepatocytes and hepatoma cells alone or co-cultured with human-derived monocytes, neutrophils and monocytic cells and changing in adhesion factor expression. In addition, changes in cells after stimulation with LPS in combination with resistin, adiponectin, TNF- α and hyperglycemia are confirmed. Changes in various signal transduction inhibitors and synthesis of resistin siRNA is analyzed for changes in expression and signal transduction pathways in cells transfected. The correlation between morphological changes in cells and the intensity of expression is analyzed by an imaging cytometer, and interactions are analyzed in detail.

研究分野：口腔保健学

キーワード：歯周病 NASH 相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病が全身に及ぼす影響について、我々は歯周病が耐糖能異常を引き起こしている可能性を後ろ向きコホート調査で報告し(Saito T, *et al.*, *J Dent Res*, 2004; Saito T, *et al.* *J Periodontol*, 2006)、血液検査により肝臓の脂肪化に炎症、線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-Alcoholic steato-hepatitis (NASH)を引き起こしている可能性を指摘した(Saito T, *et al.*, *J Int Acad Periodontol*, 2006)。NASH の発症については、肥満などによる脂肪肝の状態である 1st Hit に、酸化ストレスなどによる 2nd Hit が必要であるが、この部分はエンドトキシン(LPS) や様々なサイトカイン、アディポカインも関わる多様なプロセスによるため未解明な部分が多い。NASH 患者の歯周病菌保有率は、健康な人と比べて約 3.9 倍もの高率で、歯周病のある NASH 患者に歯周治療を行うと 3 カ月後に肝機能の数値がほぼ正常になったとの報告もあることから、歯周病は NASH の 2nd Hit に関与している可能性がある。我々は、これまでに歯周病と全身疾患との関連を解析することを目的として、脂肪細胞が産生するサイトカインであるアディポカインの 1 つ、レジスチンの末梢血中の濃度が、歯周病を有する者では有意に高いことを明らかにした (Saito T, *et al.*, *J Dent Res*, 2008; Furugen R, *et al.*, *J Periodont Res*, 2008)。レジスチンはヒトでは肥満より炎症との関連が強いことが報告されているが、我々は歯周病原細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(Aa)白血球毒素 (Furugen R, Hayashida, Saito T *et al.*, *FEMS Microbiol Lett*, 2011) や *Porphyromonas gingivalis* (Pg)由来 LPS 刺激でもヒト好中球顆粒に存在していたレジスチンが放出することを報告した (Furugen R, Hayashida H, Saito T, *Oral disease*, 2013)。また、我々は、同じ系にて、好中球を Pg 由来 LPS で刺激すると、レジスチンとは違う顆粒成分に存在する MMP-9 を放出することも確認している。好中球は、リンパ球の大部分を占め、病原体に対する最初の防御線として必須の細胞であるとともに、がんの進展にも重要な役割を果たすことが報告されている。一方、MMP-9 は、細胞外マトリックスの一種であるが、肝細胞がん患者において、血清中 MMP-9 レベルが有意に上昇しているという報告もあるように、好中球と共にがんの進展への関与が考えられる。

2. 研究の目的

ヒト由来肝細胞と各種ヒト肝細胞がん単独またはヒト由来単球、好中球、単球系細胞との共培養を通常および高血糖培地にて培養し、歯周病関連細菌由来 LPS で刺激後の細胞のケモカイン産生と ROS 発現、接着因子発現の変化と転写因子活性化について解析を行う。また、アディポカインであるレジスチンやアディポネクチン、TNF- α と LPS による併用刺激後の細胞のケモカイン産生と ROS 発現、接着因子発現と転写因子活性化の変化を確認し、レジスチンおよび MMP-9 遺伝子の合成 siRNA を各種細胞に遺伝子導入した上での変化により、歯周病と肥満による相互または相乗作用について解析する。各種シグナル伝達に関わる抑制剤を使用し、どのシグナル伝達経路と関連が深いのかを明らかにする。さらに、イメージングサイトメーターを用いて 1 細胞レベルでの形態的な変化と各種発現レベルとの相関を解析することで細胞間の変化をより詳細に解析し、発癌に関わる因子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

肝細胞がん(HepG2, Huh-7, SK-Hep-1)とヒト由来肝細胞、ヒト単球系細胞(THP-1)好中球様細胞に分化させた HL60 を歯周病菌由来 LPS で刺激後の細胞障害性および細胞増殖能を LDH Assay および MTT Assay を用いて確認する。アポトーシスへの変化が予想される好中球様細胞に分化させた HL60 については、Annexin-V,と PI の 2 重染色後、フローサイトメーターを用いてアポトーシスとネクローシス細胞の割合を解析する。同様の実験を 3D 培養プレートでも行い、比較する。

24 ウェルプレート下層にヒト由来肝細胞と肝細胞がん(HepG2, Huh-7, SK-Hep-1)、上層のインサート部にヒト単球系細胞(THP-1)か好中球様細胞に分化させた HL60、ヒト由来単球、好中球を入れ、共培養するための条件を整える。また、共培養時の遊走程度についても解析する。各種 LPS で刺激後の各種ケモカイン産生、ROS 発現、接着因子発現について、ELISA 法および RT-PCR, Western blotting 法を用いて確認する。さらに、単独および共培養にレジスチン、アディポネクチン、TNF- α 添加時の細胞増殖生存活性の変化および各種ケモカイン産生、ROS 発現、接着因子発現の変化を解析する。また、各種濃度を変化させた高血糖培地での培養や、JNK、MAPK 各種抗体(SP600125、LY294002、PD98059、SB203580)による処理後に LPS 刺激後細胞の各種ケモカイン産生、ROS 発現、接着因子発現の変化を解析する。レジスチンおよび MMP-9 遺伝子の合成 siRNA をヒト由来肝細胞、THP-1、好中球様細胞に分化させた HL60 に遺伝子導入した細胞で、ケモカイン産生と ROS、接着因子発現と転写因子活性化の変化を解析する。ヒト単球系細胞(THP-1)好中球様細胞に分化させた HL60 を各種 LPS で刺激後のレジスチン、MCP-1 発現と 1 細胞ごとの形態変化の相関をイメージングサイトメーターにより確認する。また、細胞の細胞周期解析や細胞内局在解析を行う。

4 . 研究成果

肝細胞を歯周病菌由来 LPS で刺激し培養することにより、IL-8 や TGF- β を産生することを、ELISA 法および RT-PCR にて確認し、関連するシグナル伝達経路について解析を進めている。また、好中球様細胞に分化させた HL60 細胞を用いて、肝細胞との共培養での変化について、高血糖状態で培養したが、有意な変化は認めなかった。各種シグナル抑制剤下での培養についても比較した。さらに、単球系細胞をマクロファージなどに分化させた細胞を用いた実験も行っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Furugen R, Kawasaki K, Kitamura M, Maeda T, Saito T, Hayashida H.: Association of low fetuin-A levels with periodontitis in community-dwelling people. Journal of Oral Science ,査読有 Accepted on April 2019 in press
2. Iwasaki T, Fukuda H, Kitamura M, Kawashita Y, Hayashida H, Furugen R, Koyama Z, Ando Y, Saito T.: Association between number of pairs of opposing posterior teeth, metabolic syndrome, and obesity. Odontology 査読有 107: 111-117, 2019 DOI: 10.1007/s10266-018-0386-x.

3. Furugen R, Hayashida H, Kawasaki K, Kitamura M, Iwasaki T, Saito T, Maeda T.; Association of the serum IgG level against periodontal bacteria with periodontal status and serum lipid levels. J Mens Health 査読有 14: 1-8, 2018 DOI: 10.22374/1875-6875.14.4.3.
4. Hayashida H, Furugen R, Saito T.: Periodontal Host Response in Subjects with Obesity. Current Oral Health Reports 査読有 5: 108-115, 2018 DOI: <https://doi.org/10.1007/s40496-618-0177-z>.
5. Sonoda C, Fukuda H, Kitamura M, Hayashida H, Kawashita Y, Furugen R, Koyama Z, Saito T.: Associations among Obesity, Eating Speed, and Oral Health. Obes Facts 査読有 11: 165-175, 2018 DOI: 10.1159/000488533.
6. Nagayoshi M, Higashi M, Takamura N, Tamai M, Koyamatsu J, Yamanashi H, Kadota K, Sato S, Kawashiri SY, Koyama Z, Saito T, Maeda T.: Social networks, leisure activities and maximum tongue pressure: cross sectional associations in the Nagasaki Islands Study, BMJ Open 査読有 7: 1-11, 2017 DOI: 10.1136/bmjopen-2016-014878.

〔学会発表〕(計2件)

1. Furugen R, Hayashida H, Kawasaki K, Maeda T, Saito T: Serum PTX3 level is associated with periodontitis in community-dwelling women in Japan. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science, Kobe, Japan, September 2016. {Program and Abstracts of Papers, p184, 2016}
2. Fukui M, Miki K, Kitamura M, Hayashida H, Kawasaki K, Orihuela-Campos RC, Tamaki N, Maeda T, Saito T, Ito H0: Porphyromonas gingivalis infection may affect anti-atherosclerotic antibody to phosphorylcholine. 第65回日本口腔衛生学会・総会共催 The 12th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, Tokyo, Japan, May, 2016. {口腔衛生会誌 66(2): p.229, 2016}

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：齋藤 俊行

ローマ字氏名：SAITO, Toshiyuki

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）

職名：教授

研究者番号（8桁）：10170515

研究分担者氏名：林田 秀明

ローマ字氏名：HAYASHIDA, Hideaki

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院（歯学系）

職名：講師

研究者番号（8桁）：20238140

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、どの研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。