

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15775

研究課題名(和文)細胞イメージングによる歯周病と認知症の関連におけるオートファジー機構解明

研究課題名(英文)Imaging analysis of autophagy between periodontitis and dementia

研究代表者

齋藤 俊行(SAITO, Toshiyuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：10170515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満、歯周病、認知症で相互作用があるのか、その際オートファジー機能とはどのような関連があるのかを解析するため、神経細胞株に、歯周病原細菌由来LPS刺激および各種アディポカインやサイトカインを高血糖培地で培養し、レプチン、レプチン受容体やオートファジー関連因子の発現に違いを調べた。イメージングサイトメーターを使用し、各種サイトカイン、アディポカイン誘導時の細胞にてオートファジー関連因子の発現と細胞形態に関連があるのか、細胞内の転写因子局在などについて解析している。各種シグナル伝達抑制剤およびレプチン、レプチン受容体のsiRNAを作成し、神経細胞株に遺伝子導入後の変化について確認する予定である。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is local inflammation caused by periodontal pathogens and an association with immuno-response including various cytokines and activation of osteoclast has been clarified. On the other hand, it is reported that periodontal disease is associated with diabetes, arteriosclerosis, and cardiovascular disease, beyond periodontal inflammation and destruction, however, its mechanism has not been clarified well. In this study we hypothesized that periodontal disease has bad effects on glucose and lipid metabolism in nervous cells. From a point of view that periodontal disease and obesity affect each other, in order to clarify this, we examined adipokine levels in culture system. As a result, stimulation by LPS derived from periodontal pathogens has bad effects on release of adipokine and cytokine. These phenomena were suggested to be one of mechanisms that periodontal disease influence systemic disease.

研究分野：社会歯科学

キーワード：歯周病 認知症 アディポカイン

1. 研究開始当初の背景

炎症は本来重要な生体防御機能のひとつであるが、慢性的な炎症反応は新たな疾患を引き起こす原因にもなることが数多く報告されてきている。我が国でも糖尿病肥満は、糖尿病の原因・結果双方の病態に深く関わっているが、その詳細な機序については、不明な点も多い。肥満により脂肪細胞が肥大化することで、マクロファージやリンパ球などの免疫細胞が増殖し、炎症性サイトカインやアディポカインと呼称される生体物質が産生される。我々はこれまで、歯周病と肥満とが相乗作用で、全身健康状態の悪化に関連するのではないかという仮説に基づき、肝細胞やヒト由来好中球、単球で歯周病由来因子刺激により各種サイトカインおよびアディポカイン産生が上昇する結果を得てきた。歯周病と認知症は、どちらも老化に伴い症状が進行していく疾患であるが、どのようなメカニズムで関連があるのか、また、肥満 歯周病 認知症で相互作用があるのかなどの報告は全くなされていない。認知症は、糖尿病との関連やアディポカインの1つであるレプチンとの関連が数多く報告されている。

2. 研究の目的

我々はこれまで、歯周病による慢性炎症と各種アディポカイン産生の相互作用について解析を進めている。単球系細胞やヒト由来単球及び好中球において、歯周病原菌由来 LPS 刺激によりレジスチンなどのアディポカインや MCP-1 などのケモカイン産生が誘導されることと、高血糖状態でのこれらの産生量の変化を確認し、歯周病の慢性炎症と肥満による慢性炎症が相互に関連することを確認してきた。アルツハイマー病を含めた神経変性疾患において、炎症的な機序が重要な役割を演じていることが指摘されており、生活習慣病による炎症の増強が神経変性を増強

する可能性が考えられる。本研究では認知症の発症や進行に歯周病や肥満による慢性炎症がどのように関わるかについて、これまで我々が研究してきたアディポカインの作用も含めて、その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) 培養条件の検証

ヒト神経細胞・血管内皮細胞(HUVEC)・単球系細胞株(U937)、を用いて培養条件を整える。

(2) 細胞数および細胞形態変化の確認

MTT Assay LDH Assay により、各種細胞に *P.gingivalis* および *E. coli* 由来 LPS を添加後の、細胞の増殖能や細胞障害性について、変化があるかどうか確認する。

(3) 各種サイトカイン、アディポカイン産生について

各種細胞を培養後、得られた細胞上清中の各種サイトカイン、アディポカイン産生について ELISA 法にて測定する。

各種細胞を培養後に mRNA を抽出し、cDNA 合成後、RT-PCR 法にて各種タンパクレベルでの発現について確認する。

(4) 細胞での認知症関連因子の発現について

BD FACSCalibur (フローサイトメトリー) により細胞表面での発現の変化を、各種抗体を用いた発現の強度と蛍光色素標識抗体を用いての形態的变化で確認する。さらにイメージングサイトメーターにより形態と発現の関連も解析を行う。

(5) 細胞での認知症関連因子の発現

Western blotting 法にて、培養後細胞において、各種オートファジー関連抗体を用いて、発現の変化を確認する。

4. 研究成果

LPS 添加後の細胞を回収し、RT-PCR 法にて各種発現を比較した。LPS 0.01 $\mu\text{g/mL}$ より 1 $\mu\text{g/mL}$ 添加した方が、また高血糖状態での培養でより発現が高かった。

肥満 歯周病 認知症で相互作用があるのか、その際オートファジー機能とはどのような関連があるのかを解析するため、アディポカイン誘導時の細胞にてオートファジー関連因子の発現と細胞形態に関連や、細胞内の転写因子局在などについて現在解析中である。今後各種シグナル伝達抑制剤およびレプチン、レプチン受容体の siRNA を作成し、神経細胞株に遺伝子導入後の変化についても確認する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Furugen R, Hayashida H, Saito T: Periodontal Host Response in Subjects with Obesity. Current Oral Health Reports in press 2018, 査読有
DOI: 10.1007/s40496-018-0177-z

Tamaki N, Yoshino F, Fukui M, Hayashida H, Yoshida A, Kitamura M, Iwasaki T, Furugen R, Kawasaki K, Nakazato M, Maeda T, Kokeguchi S, Yamamoto T, Lee MC, Ito HO, Saito T: Relationship among salivary antioxidant activity, cytokines, and periodontitis: the Nagasaki Island

study. J Clin Periodontol. 42(8): 711-718, 2015, 査読有
DOI: [10.1111/jcpe.12438](https://doi.org/10.1111/jcpe.12438)

[学会発表](計7件)

北村雅保, 重政昭彦, 北村尊子, 田浦勝彦, 古堅麗子, 小山善哉, 岩崎理浩, 福田英輝, 齋藤俊行: 長崎県歯科疾患実態調査における歯種別にみた現在歯の地域比較. 第39回九州口腔衛生学会総会, 2017

北村雅保, 重政昭彦, 古堅麗子, 小山善哉, 川下由美子, 福本恵美子, 田浦勝彦, 園田央互, 岩崎理浩, 林田秀明, 川崎浩二, 福田英輝, 齋藤俊行: 長崎県歯科疾患実態調査にみる現在歯数の経年的推移. 第66回日本口腔衛生学会・総会, 2017

齋藤俊行, 東美穂, 北村雅保, 岩崎理浩, 福田英輝, 林田秀明, 小山善哉, 介田圭, 川崎浩二, 前田隆浩, 永吉真子, 常岡正廣, 高村昇: 地域住民における舌圧と現在歯数の関連性: 五島研究. 第66回日本口腔衛生学会・総会, 2017

Furugen R, Hayashida H, Saito T: Serum PTX3 level is associated with periodontitis in community-dwelling people in Japan. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science, 2016

北村雅保, 山田葵, 李宏美, 岩崎理浩, 介田圭, 古堅麗子, 小山善哉, 林田秀明, 福田英輝, 川崎浩二, 前田隆浩, 齋藤俊行: 島嶼地域における歯周病と現在歯の関連性: 五島研究. 第38回九州口腔衛生学会総会, 福岡市, 2016

Fukui M, Miki K, Kitamura M, Hayashida H, Kawasaki K, Orihuela-Campos RC, Tamaki N, Maeda T, Saito T, Ito H: 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, 2016

Fukui M, Miki K, Kitamura M, Hayashida H, Kawasaki K, Orihuela-Campos RC, Tamaki N, Maeda T, Saito T, Ito H: Atherosclerosis-preventive activity of anti-phosphorylcholine antibody may be interfered by infection with Porphyromonasgingivalis: The Nagasaki Islands study. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2015

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 俊行 (SAITO, Toshiyuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系) ・
教授

研究者番号 : 1 0 1 7 0 5 1 5

(2) 研究分担者

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 : 9 0 2 5 3 6 7 4

林田 秀明 (HAYASHIDA , Hideaki)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号 : 2 0 2 3 8 1 4 0