

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07106

研究課題名(和文)モデルマウスを用いたNAFLD/NASH増悪に関する歯周病の包括的解析

研究課題名(英文)The comprehensive analysis of the periodontitis and NAFLD/NASH utilizing model mouse

研究代表者

米田 正人(Yoneda, Masato)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：10423831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は生活習慣病に強く関連し、肥満の増加に伴い増加している肝疾患である。非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の進展には、エンドトキシン(ET)が関連していることが報告されている。高脂肪食モデルマウスを用いた検討においてギンギバリス菌由来LPSによる肝障害は自然免疫系の受容体であるToll-like receptor 2,4を介し、また肝障害にはSTAT3を介したNF- κ B経路が関与していた。臨床検討では歯周ポケット4mm以上が10か所以上あるNASH患者は有意にギンギバリス菌への感染が高いことを発見した。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is an important cause of chronic liver injury in many countries. The incidence of NAFLD is rising rapidly because of the currently ongoing epidemics of obesity and type 2 diabetes. Bacterial endotoxin, such as lipopolysaccharide (LPS), is known to play a key role in the pathogenesis of NASH. In this project, LPS from *p. gingivalis* stimulation results in innate immune responses through TLR2 and 4 and elevated ALT in high-fat diet-induced steatosis mice. Furthermore, the STAT3-NF κ B are thought to be the important receptor that cause liver damage by LPS from *p. gingivalis*. Clinically, there are significant relation between the incidence of more than 10 locations of periodontitis (deepest probing depth > 4mm) and the detection frequency of *P. gingivalis* in NASH patients.

研究分野：非アルコール性脂肪肝炎

キーワード：歯周病 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

- (1) 非アルコール性脂肪性肝障害 (Nonalcoholic fatty liver disease: 以下 NAFLD), および非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: 以下 NASH) は食生活の欧米化により今後増加することが予想される疾患である。現在 NAFLD は国内で 1000 万人以上, NASH は 100 万人以上存在することが報告され, 発症原因の解明, 治療法の開発は急務である。NAFLD/NASH の病態解明, 治療開発が困難な原因として同疾患の発症, 増悪因子が多岐にわたり全身疾患と関連しているため合併疾患により病態や治療法が異なることが挙げられる。
- (2) 歯周病は糖尿病や動脈硬化など様々な全身疾患の発症, 増悪に関与していることが示唆されている。歯周病の代表的な病原菌である *P. gingivalis* 菌は繊毛のサブユニットタンパク質である fimbrillin をコードする *fimA* 遺伝子の核酸配列構造の違いにより 6 つの遺伝子型が存在し, 細胞障害性の少ない I, III, V 型と毒性の強い II, IV, Ib 型が存在し特に II 型は他の線毛型株に比べ効率に感染細胞にアポトーシスを誘導し強力な細胞障害性を有することが報告されている。
- (3) 研究代表者らは全国多施設の共同研究で NAFLD/NASH の確定診断や病期の評価が得られた 150 症例の患者の唾液を検討し, 健常対照群と比較し NAFLD 患者において *p.gingivalis* 菌の有病率が有意に高く, さらに *fimA* 遺伝子解析で NAFLD 患者口腔内の *p.gingivalis* 菌の 94.3% が毒性の強い II, IV, Ib であり, 特に 50% の患者は II 型に罹患していたことを発見し報告した。

2. 研究の目的

- (1) 脂肪肝モデルマウスおよびコントロールマウスに対し LPS (*p.gingivalis* 由来) の静脈投与を行い, 脂肪肝の増悪因子であることを証明する。
- (2) TLR2 (toll like receptor 2) は TLR4 は自然免疫に関する遺伝子であり, 一部の機能が解明されていないところもあるが, *p.gingivalis* 由来の LPS による肝障害に対

する関与が示唆されており, ノックアウトマウスを用いて検討する。

- (3) Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) は転写因子であるが LPS (*p.gingivalis* 由来) の肝障害が肝細胞での STAT3, マクロファージの STAT3 どちらを介するのか肝細胞特異的およびマクロファージ特異的 STAT3 ノックアウトマウスを用いて検討する。
- (4) 臨床において NAFLD 患者の口腔内所見と *p.gingivalis* の陽性率との関連を検討する。

3. 研究の方法

動物実験

- (1) C57BL/6 マウスを通常飼育 (Oriental 酵母社製; 360kcal/100g, 13.3% 脂質, 26.2% 蛋白質, 60.5% 炭水化物), High-fat 食 (CLEA 社製 High-fat diet 32 使用; 506.8kcal/100g, 57.5% 脂質, 19.7% タンパク質, 22.8% 炭水化物) 下に 8 週間飼育する。通常飼育下, High-fat 食飼育下のマウスにそれぞれ *P.gingivalis* 菌由来の LPS (和光純薬工業株式会社製 *P.gingivalis* ATCC33277 からフェノール抽出し超遠心によって作成) を濃度別に尾静脈投与を行い肝障害の程度を検討する。
- (2) TLR4 ノックアウトマウス (C57BL/6), TLR2 ノックアウトマウス (C57BL/6) に上記実験により本研究の試濃度である 0.25mg/kg の *p.gingivalis* 菌由来の LPS を投与し肝障害の変化を検討する。
- (3) Cre/loxP システム (loxP 配列と呼ばれる DNA 配列に対し DNA 組換え酵素 Cre が働くことにより生じる部位特異的組換え反応を利用した遺伝子組換え実験系) を使用して作った肝細胞特異的およびマクロファージ特異的 STAT3 ノックアウトマウスを用いて 0.25mg/kg の *p.gingivalis* 菌由来の LPS を投与し肝障害の変化を検討する。
- (4) 医科歯科連携として NAFLD 患者での *p.gingivalis* 保菌者における口腔学的所見 (PPD: 歯周病ポケット, BOP: プローブを当てた時の出血) との関連を検討した。

4. 研究成果

- (1) *p.gingivalis* 菌由来の LPS の容量設定: 普通食 (BD) マウスでは肝障害を起こさず、12 週間の高脂肪食 (HFD) マウス (NASH モデル) では肝障害を起こす静脈投与の LPS 指摘濃度を検討するため、LPS の濃度を 0mg/kg (コントロール), 0.001 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.25 mg/kg, 1 mg/kg としたところ 0.25 mg/kg の量では普通食マウスでは 0 時間後, 1 時間後, 4 時間後, 12 時間後, 24 時間後の ALT 値は 33.2 ± 1.4 IU/L, 39.8 ± 9.1 IU/L, 39.3 ± 24.9 IU/L, 32.6 ± 25.0 IU/L, 38.0 ± 10.3 IU/L と著変を認めなかったことに対し、HFD 食下では 108.4 ± 13.5 IU/L, 120.4 ± 11.8 IU/L, $118.0 \pm 14.2 \pm 1.4$ IU/L, 225.1 ± 1.4 IU/L, 1100 ± 82.5 IU/L と 12 時間後, 24 時間後に有意な ALT の上昇を認めた。また肝臓の組織学的な肝組織 (炎症) の増悪を認めた。*p.gingivalis* 菌由来の LPS は高脂肪食投与、脂肪肝の存在下で肝障害 (炎症) の増悪に寄与する因子であることが示唆される結果となった。本研究成果は平成 30 年度日本歯周病学会創設 60 周年記念大会「医科歯科連携シンポジウム 1 血管障害/非アルコール性脂肪性肝炎」において「消化器内科の視点から見た非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) と歯周病の最新知見」の演題で結果発表を行った。
- (2) *p.gingivalis* 菌由来の LPS のシグナル経路に対する検討 (TLR2, 4): TLR4 ノックアウトマウス (C57BL/6), TLR2 ノックアウトマウス (C57BL/6) に上記実験により本研究の試濃度である 0.25mg/kg の *p.gingivalis* 菌由来の LPS を投与し ALT の変化を検討したところ、TLR4 ノックアウトマウス、TLR2 ノックアウトマウスでは ALT の変化、肝病理での炎症の増悪を認めず、両者が LPS (*p.gingivalis* 菌由来) の肝障害の際のシグナル経路として重要であることが示唆された。本研究成果は平成 30 年度日本歯周病

学会創設 60 周年記念大会「医科歯科連携シンポジウム 1 血管障害/非アルコール性脂肪性肝炎」において「消化器内科の視点から見た非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) と歯周病の最新知見」の演題で結果発表を行った。

- (3) *p.gingivalis* 菌由来の LPS のシグナル経路に対する検討 (STAT3): 肝細胞特異的およびマクロファージ特異的 STAT3 ノックアウトマウスを用いて本研究の試濃度である 0.25mg/kg の *p.gingivalis* 菌由来の LPS を投与し ALT の変化を検討したところ、マクロファージ特異的 STAT3 ノックアウトマウスでは ALT の変化を認めず、肝細胞特異的 STAT3 ノックアウトマウスでは ALT は 12 時間後, 24 時間後に増悪をきたし、マクロファージに存在する STAT3 が LPS (*p.gingivalis* 菌由来) の肝障害の際のシグナル経路として重要であることが示唆された。本研究成果は平成 30 年度日本歯周病学会創設 60 周年記念大会「医科歯科連携シンポジウム 1 血管障害/非アルコール性脂肪性肝炎」において「消化器内科の視点から見た非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) と歯周病の最新知見」の演題で結果発表を行った。
- (4) NAFLD 患者の口腔内診察で PPD (歯周ポケット) 4mm 以上 (歯周病の診断基準) が 10 か所以上, 3mm 以下でも BOP (プローブを当てたときの出血) が 17 か所以上あるという所見が *P.gingivalis* の菌比率 1% と関連することが認められ、NAFLD 患者に歯周病治療を開始する重要な臨床的所見であることが示唆された。

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)

Yoneda M, Imajo K, Takahashi H, Ogawa Y, Eguchi Y, Sumida Y, Yoneda M, Kawanaka

M, Saito S, Tokushige K, Nakajima A. Clinical strategy of diagnosing and following patients with nonalcoholic fatty liver disease based on invasive and noninvasive methods. J Gastroenterol. 2018 Feb;53(2):181-196. doi: 10.1007/s00535-017-1414-2. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

結束貴臣、今城健人、本多靖、小川祐二、留野渉、米田正人、嶋川真木、田中良紀、川原知浩、斉藤聡、臼田春樹、和田孝一郎、中島淳：腸内細菌および腸内代謝産物の解析による非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の病態解明. 第 3 回 Gut microbiota 研究会. (2017 年 4 月) (東京).

米田正人. 神奈川歯科大学・横浜市大 大学間連携協定記念 市民公開シンポジウム 「肝臓疾患と歯周病」(2017 年 9 月) (横浜)

米田正人. 日本補綴歯科学会 西関東支部主催市民フォーラム 「わかってきたお口と肝臓のかかわり」(2017 年 10 月) (横浜)

米田正人. 平成 30 年度 日本歯周病学会創設 60 周年記念大会. 医科歯科連携シンポジウム 1. 血管障害/非アルコール性脂肪性肝炎消化器内科の視点から見た非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) と歯周病の最新知見. (2017 年 12 日) (京都)

〔図書〕(計 4 件)

今城健人、本多靖、結束貴臣、小川祐二、米田正人、斉藤聡、中島淳：NASH / NAFLD の遺伝子素因. 消化器・肝臓内科, 1(2):176-182, 2017 年.

結束貴臣、今城健人、本多靖、小川祐二、米田正人、中島淳：特集 腸内細菌と消化器疾患の新たな展開 NAFLD と腸内細菌. メディカル・サイエンス・ダイジェスト, 2017 年 4 月号 (第 43 巻第 4 号通巻 563 号): p.17-20, 2017 年.

結束貴臣、今城健人、本多靖、加藤孝征、

小川祐二、留野渉、馬渡弘典、遠藤宏樹、藤田浩司、米田正人、斉藤聡、中島淳、和田孝一郎：アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝疾患患者の腸内細菌叢に関する検討. アルコール医学生物学, vol.35:p.60-61, 2017 年.

中島淳、今城健人、米田正人：NAFLD. Medicina vol.54 No.7:p.1094-1099, 2017 年.

〔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

<http://ycu-hepabiligi.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 正人 (YONEDA MASATO)
横浜市立大学・附属病院・講師
研究者番号：10423831

(2) 研究分担者

特記事項なし

(3) 連携研究者

特記事項なし