

令和元年6月26日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20437

研究課題名(和文) TLR2経路を介したred complex歯性感染のNASH病態増悪機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of NASH progression mechanism of red complex dental infection via TLR2 pathway

研究代表者

古庄 寿子(Furusho, Hisako)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教

研究者番号：00634461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物実験では、野生型高脂肪食群では、crown-like structure(CLS)数および線維化は1群を除き、red complex歯性感染により増加し、TLR2ノックアウト高脂肪食群では抑制されていた。同様にIL-1 mRNA発現の上昇も、TLR2ノックアウト高脂肪食群で完全に抑制された。細胞実験において、通常肝細胞と比較し、ヒト脂肪化肝細胞に対しred complex各死菌刺激によるIL-1、IL-6mRNA発現上昇が、TLR2阻害薬の投与により、抑えられた。以上よりTLR2経路は、red complex歯性感染によるNASH病態増悪に関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は顎骨における歯周病原細菌感染と肝疾患の関連性を課題としている。今回の研究において作成する歯性感染モデルでは、歯周病原細菌の中のred complexを使用し、各菌単独およびその組み合わせにおいてより患者の病態を模倣したnaturalな状態を観察している。red complex歯性感染によるNASH病態増悪の機序についてTLR2の役割を明らかにしたことは、脂肪肝患者におけるTLR2を標的とした新たな治療法開発につながり、社会に還元できる有意義な研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In vivo experiment, crown-like structure (CLS) number and fibrosis were increased in high-fat-diet induced wild type mice groups (WT-HFD), excluding 1 group, and they were decreased in high-fat-diet induced TLR2 (TLR2KO-HFD) groups ultimately. Similarly, IL-1 mRNA expression, upregulated in WT-HFD groups, were restrained in TLR2KO-HFD groups. In vitro experiment, IL-1 and IL-6 mRNA expression were upregulated in the steatotic hepatocyte, stimulated by each red complex (Pg, Td, Tf) dead body stimulation. After the dosage of the TLR2 inhibitor, the mRNA upregulation were suppressed. It was revealed that the TLR2 pathway participated in NASH progression by the red complex odontogenic infection.

研究分野：口腔病理学 歯周病学

キーワード：red complex TLR2 NASH 歯性感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

非飲酒者の脂肪肝（nonalcoholic fatty liver disease;NAFLD）は約2,000万人が罹患していると推定されている。さらにNAFLDの20~30%がアルコールを摂取しないにもかかわらず、炎症や線維化が生じる非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis : NASH）へ移行し、肝硬変さらには肝癌に進行する可能性を有しているため、予防・治療が必要な重篤な疾患として注目されている。NASHの病態進行には脂肪肝の形成(first hit)に次ぐ酸化ストレスなどの“second hit”が挙げられるが、大腸菌由来のリポポリサッカライド（Lipopolysaccharide ; LPS）が発症に関わることも注目されている。一方、歯周病は軽微な慢性炎症であるため、初期にはほとんど症状を呈さないが、心・血管系疾患、糖尿病、早期低体重児出産などの全身の疾患状態に悪影響を及ぼすことが報告され、特に *Porphyromonas gingivalis*(Pg)は、全身疾患に悪影響を及ぼす代表的な歯周病原細菌として知られている。私はこれまでに、高脂肪食誘導脂肪肝モデルマウスにPgを歯性感染させた肝臓では、肝細胞の広範な脂肪沈着、顕著な変性、炎症や広範な線維化が起こることを示した。このモデルにおいて、TLR2発現の上昇、特に肝細胞におけるTLR2発現上昇が免疫組織化学的な検討で顕著に認められ、*in vitro* 実験においてパルミチン酸処理による脂肪化ヒト肝細胞においてもTLR2発現が上昇し、Pg-LPS刺激により炎症性サイトカイン産生が増強すること明らかにした。さらにTLR2ノックアウトマウスを用いた実験ではこれらの反応が減弱したことから、Pg歯性感染によるNASH病態増悪のメカニズムにおけるTLR2の経路の重要性についても明らかにした。現在、口腔内細菌数は500種類以上に及び、中でも強く歯周病と関連するとされるのが、Pgおよび、*Treponema denticola*(Td)、*Tannerella forsythia*(Tf)の3菌種、“red complex”である。実際の歯周病患者から60~70%の割合で同時に検出され、Td、Tf共に、TLR2経路を介し、それぞれ歯槽骨の破壊や、マクロファージのMAPKを活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導するという報告がある。我々のPg歯性感染の実験ではTLR2経路を介し、肝組織の炎症性サイトカイン産生量が増加することで、NASHにおける線維化の促進につながっていることから、Td及びTfの2菌種においてもTLR2経路を介した炎症性サイトカイン産生に関わっている可能性を考えた。

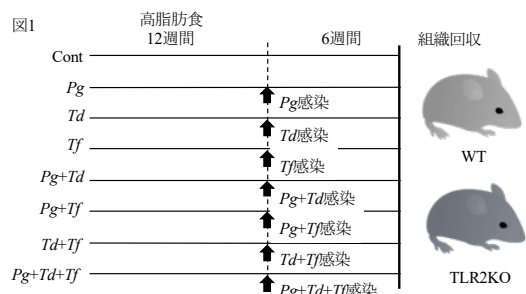
2. 研究の目的

これまでの研究により、Pg歯性感染によりPgおよびPg-LPSが血流内へ進入し、TLR2発現上昇を伴う脂肪肝に到達し、刺激を加えることで炎症性サイトカインの発現上昇により、NASH病態増悪につながることで、また、TLR2の発現を抑えると、PgおよびPg-LPSの刺激が抑えられ、NASH病態増悪が起こらないことから、TLR2経路がNASH病態増悪に関与する可能性を示した。Pgは他のグラム陰性菌（例えば大腸菌）と異なり、TLR2に作用するが、TdやTfにもTLR2を介し、影響を与える可能性が報告されている。さらに、歯周病感染巣において、3菌種は競争関係にあるのではなく、協調・協力関係にあるとする報告もあり、肝臓に対する影響もPg、Td、Tfの混合感染で検討する必要があるが、3菌種混合歯性感染と全身疾患の関連については未だ報告がない。よって、*in vivo* 実験では、野生型(WT)、TLR2ノックアウト(KO)マウスそれぞれ、高脂肪食により脂肪肝を誘導したモデルマウスを作成し、3菌種(Pg+Td+Tf)、2菌種(Pg+Td、Pg+Tf、Td+Tf)、1菌種(Pg、Td、Tf)を歯性感染させ、根尖病変および肝組織病変を比較することで、red complex歯性感染のNASH病態増悪の有無、またTLR2経路の重要性を検討する。さらに、*in vitro* 実験では脂肪化肝細胞モデルを用い、3菌種の刺激による炎症性サイトカイン発現増強に対するTLR2抗体投与の影響を調べ、3菌種におけるTLR2経路の重要性を検討する。以上により、red complexがNASH病態増悪に及ぼす影響を把握し、TLR2経路の役割について明らかにすることを目的とし、研究を行なった。

3. 研究の方法

1) 野生型マウス(WT)およびTLR2ノックアウトマウス(TLR2KO)を用いたred complex歯性感染によるNASH病態増悪におけるTLR2の関与についての検討

WTおよびTLR2KOマウスに対し、高脂肪食(HFD)を12週間投与し、通常マウスおよび高脂肪食誘導脂肪肝マウスをそれぞれ作成した。各群に対し、第1臼歯歯髄を歯科用切削器具(ラウンドバー)で露髄させたのち、3菌種(Pg+Td+Tf)、2菌種(Pg+Td、Pg+Tf、Td+Tf)、1菌種(Pg、Td、Tf)を10⁷個を含ませた綿球を留置し、感染群とした(図1)。非感染群(Cont群)もそれぞれ作成した。図2に示すように、計16群を作成した。感染6週後に肝臓および顎骨を回収した。



①肝組織の変化の検討

回収した肝臓の一部により、肝組織標本を作成した。HE 染色を行い、組織学的な変化を比較検討するとともに、Mac2(抗マクロファージ抗体)による免疫組織化学染色を行い、crown-like structure(CLS;脂肪壊死に陥った肝細胞に対するマクロファージ集簇)数を測定し、肝臓の変化を観察した。また、線維化の程度を測定するため、シリウスレッド染色を行い、画像を撮影後、ImageJ を用いて、線維化の面積を計算した。また、回収した肝臓から mRNA を回収し、炎症性サイトカイン mRNA(IL-1 β)の発現について比較検討を行った。

②根尖部歯周組織の変化の検討

回収した顎骨により、顎骨標本を作成し、HE 染色を行い、根尖部歯周組織の変化を比較検討した。

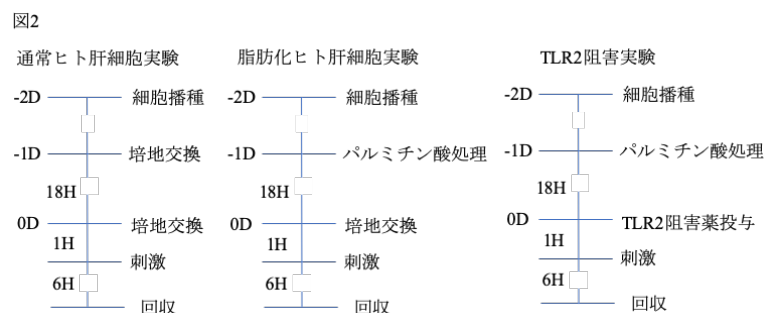
2) TLR2 阻害薬の red complex 死菌誘導サイトカイン発現に及ぼす影響について

① red complex 刺激に対する脂肪化ヒト肝細胞の反応性への影響について

ヒト脂肪化肝細胞(HC3716-hTERT 株)をパルミチン酸(肥満者の血中で上昇する代表的な遊離脂肪酸)0.2mM で 18 時間処理し、脂肪化肝細胞を作成した。パルミチン酸処理を行っていない細胞を非脂肪化肝細胞とした。それぞれの細胞に *Pg*-LPS(1 μ g/mL)、*Pg*、*Td*、*Tf* 死菌(MOI(multiplicity of infection : 細胞 1 個に対する細菌の数) 100)により刺激を加えた。6 時間後に回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現(IL-1 β 、IL-6、MCP- 1)について比較検討した。(図 2)

②TLR2 阻害薬投与による red complex 刺激に対する脂肪化ヒト肝細胞の反応性の変化

①と同様に作成した脂肪化肝細胞に、TLR2 阻害薬(抗 TLR2 抗体)を作用させ、*Pg*-LPS(1 μ g/mL)、*Pg*、*Td*、*Tf* 死菌(MOI100)により刺激を加えた。6 時間後に回収し、炎症性サイトカイン mRNA 発現(IL-1 β 、IL-6)について比較検討した。(図 2)



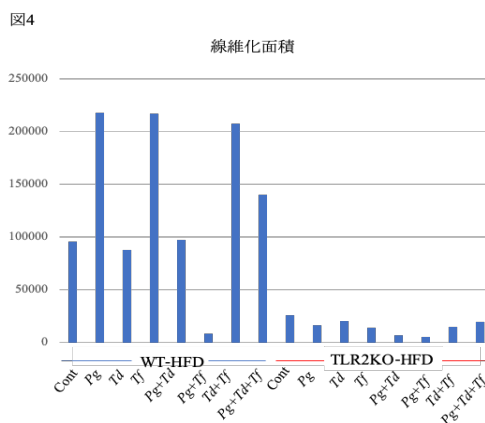
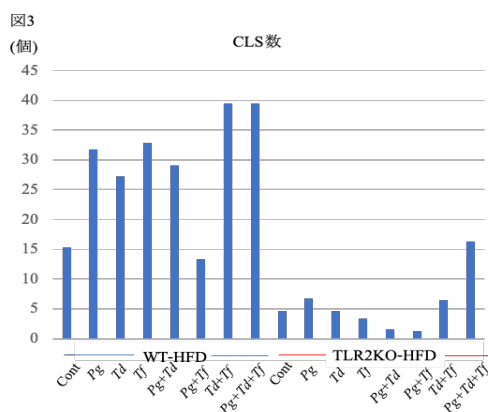
4. 研究成果

1) 野生型マウス (WT) および TLR2 ノックアウトマウス (TLR2KO) を用いた red complex 菌性感染による NASH 病態増悪における TLR2 の関与についての検討

①肝組織の変化の検討

WT-HFD 群では、TLR2KO-HFD 群と比較して、顕著な脂肪化がみられた。HE 標本において WT-HFD 群では炎症巣が明らかに増加していたため、Mac2 免疫組織化学標本を用いて、各群の CLS 数を計測し、以下の結果を得た (図 3)。WT-HFD 群で上昇した CLS 数は、TLR2KO-HFD 群にお

いて、顕著に減少していた。WT-HFD 群では非感染群(Cont 群)と比較し、1 菌種(*Pg*、*Td*、*Tf*)、2 菌種 (*Pg+Td*、*Td+Tf*) 3 菌種 (*Pg+Td+Tf*) 群において、CLS 数が上昇していたが、各群での差はみられなかった。WT-HFD-*Pg+Tf*群において CLS 数は増加していなかった。TLR2KO-HFD 群では、3 菌種群(TLR2KO-HFD-*Pg+Td+Tf*群)に増加傾向がみられた。



また、線維化の程度を検討するため、シリウスレッド染色を行なった標本を用いて、各群の線維化の面積を測定し、以上の結果を得た (図 4)。WT-HFD 群で促進した線維化は、TLR2KO-HFD 群において、顕著に抑制されていた。WT-HFD 群では非感染群(Cont 群)と比較し、1 菌種(*Pg*、*Tf*)、2 菌種 (*Td+Tf*) 3 菌種 (*Pg+Td+Tf*) 群において、線維化が促進していたが、各群での差はみられなかった。WT-HFD-*Pg+Tf*群では、線維化が抑制されていた。CLS 数と比較し、線維化に対して各細菌および組み合わせがどのように影響したかは、今後検討を続ける。また、RT-PCR によるサイトカイン発現の検討では、WT-HFD 各群にみられた IL-1 β の上昇は、TLR2KO-HFD 群では完全に抑制されていた。

TLR2 経路の遮断により、脂肪化における炎症性サイトカイン発現上昇やマクロファージの動員、線維化促進が改善されたことから、TLR2 経路は、red complex 菌性感染による NASH 病態増悪に関与することが明らかになった。

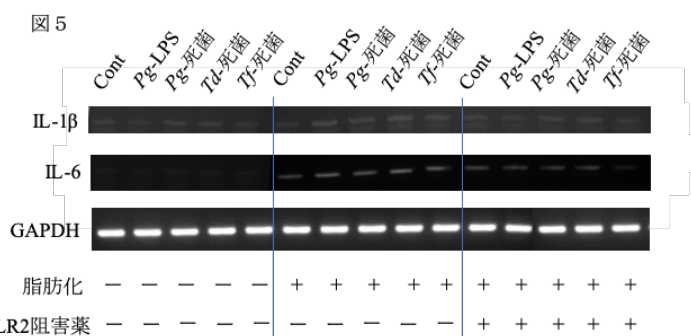
②根尖部歯周組織の変化の検討

WT および TLR2KO 全群の根尖部歯周組織を HE 染色で観察したが、根尖部の状態に大きな差はみられなかった。

2) TLR2 阻害薬の red complex 死菌誘導サイトカイン発現に及ぼす影響について

①red complex 刺激に対する脂肪化ヒト肝細胞の反応性への影響について

私は、ヒト脂肪化肝細胞では、脂肪化により TLR2 発現上昇が起こることを報告している。今回の研究により、*Pg*-LPS、*Pg*、*Td*、*Tf* 各死菌による刺激を通常肝細胞、脂肪化ヒト肝細胞に行なった結果、図 5 に示す通り、脂肪化ヒト肝細胞では、*Pg*-LPS での刺激と同様に *Pg*、*Td*、*Tf* 各死菌による刺激により、IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現上昇が上昇した。



②TLR2 阻害薬投与による red complex 刺激に対する脂肪化ヒト肝細胞の反応性の変化について

TLR2 阻害薬の投与により、*Pg*-LPS での刺激と同様に *Pg*、*Td*、*Tf* 各死菌による刺激により、上昇した IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現はすべて抑制されていた (図 5)。

以上のことより、red complex の刺激により炎症性サイトカインの発現上昇が起こることで亢進

される NASH 増悪に TLR2 の経路は重要な役割を持つことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

1. Konishi H, Urabe S, Miyoshi H, Teraoka Y, Maki T, Furusho H, Miyauchi M, Takata T, Kudo Y, Kajioka S: Fetal Membrane Inflammation Induces Preterm Birth Via Toll-Like Receptor 2 in Mice With Chronic Gingivitis: *Reprod Sci*. 2018 Sep 17;1933719118792097. doi: 10.1177/1933719118792097. (査読あり)
2. Nakahara T, Hyogo H, Ono A, Nagaoki Y, Kawaoka T, Miki D, Tsuge M, Hiraga N, Hayes CN, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Abe-Chayama H, Furusho H, Shintani T, Kurihara H, Miyauchi M, Takata T, Arihiro K, Chayama K: Involvement of *Porphyromonas gingivalis* in the progression of non-alcoholic fatty liver disease: *J Gastroenterol*. 2018 Feb;53(2):269-280. doi: 10.1007/s00535-017-1368-4. (査読あり)
3. Miyauchi M, Ao M, Furusho H, Chea C, Nagasaki A, Sakamoto S, Ando T, Inubushi T, Kozai K, Takata T: Galectin-3 plays an important role in preterm birth caused by dental infection of *Porphyromonas gingivalis*: *Scientific Reports*. 2018 Feb 12;8(1):2867. doi: 10.1038/s41598-018-21072-y. (査読あり)
4. Miyoshi H, Konishi H, Teraoka Y, Urabe S, Furusho H, Miyauchi M, Takata T, Kudo Y: Enhanced Expression of Contractile-Associated Proteins and Ion Channels in Preterm Delivery Model Mice With Chronic Odontogenic *Porphyromonas Gingivalis* Infection: *Reprod Sci*. 2016 Jul;23(7):838-46. doi: 10.1177/1933719115620497. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 5 件)

1. 宮内睦美, 古庄寿子, 坂本真一, 高田 隆: *Porphyromonas gingivalis* の菌性感染は非アルコール性脂肪性肝炎の病態を増悪する: 第 60 回歯科基礎医学会学術大会 (福岡), 2018
2. Sakamoto S, Furusho H, Shrestha M, Miyauchi M, Takata T: *Porphyromonas gingivalis*-odontogenic infection promotes development/progression of nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma: 96th General Session & Exhibition of the IADR (London), 2018.
3. 宮内睦美, 古庄寿子, 坂本真一, 應原和久, 栗原英見, 高田 隆: *Porphyromonas gingivalis* の菌性感染は非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態を増悪する: 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 (京都), 2017.
4. Furusho H, Miyauchi M, Takata T: Key roles of TLR2 in NASH progression by P.g.-odontogenic infection: 第 58 回歯科基礎医学会総会・学術大会 (札幌), 2016.
5. Furusho H, Nagasaki A, Sakamoto S, Miyauchi M, Takata T: Key roles of TLR2 in NASH progression by P.g.-odontogenic infection: 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 64th Annual Meeting of JADR (Seoul), 2016.

〔図書〕 (計 3 件)

1. 高田 隆, 古庄寿子, 坂本真一, 長崎敦洋, 宮内睦美: 慢性菌性感染症と全身の健康 -*P.gingivalis* の菌性感染と非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)-: 日本臨床歯周病学会誌, 36(2), p.49-53, 日本臨床歯周病学会誌編集委員会, 東京: 2018.
2. 宮内睦美, 古庄寿子, 高田 隆: 歯周病 第 2 回 慢性菌性感染症と早産・低体重児出産: *Animus*, 23, p.45-50, アニムス編集委員会, 東京: 2018.
3. 高田 隆, 宮内睦美, 古庄寿子: 慢性菌性感染症と全身の健康 -*P.gingivalis* の菌性感染は非アルコール性脂肪性肝炎のリスクファクターである-、病気の芽をつむ! 検診でできる疾患予防の最前線: *Animus*, 93, p.11-18, アニムス編集委員会, 東京: 2017.

※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、そ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。