

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09573

研究課題名(和文) オミクス解析を応用した歯周病菌感染による肝糖脂質代謝異常誘導の経門脈因子同定

研究課題名(英文) Identification of factors inducing hepatic glucose and lipid metabolism abnormalities via intestine and portal vein by periodontal infection using omics analysis.

研究代表者

柏木 陽一郎 (Kashiwagi, Yoichiro)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20598396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔から消化管に達した歯周病菌が腸内でdysbiosisを引き起こし、産生される特異な代謝産物が門脈経由で肝臓での代謝機能を修飾することで糖尿病に影響を及ぼしているとの仮説を立てた。7週齢のdb/dbマウスに歯周病菌である*P.gingivalis* (P.g)の懸濁液を口腔内より注入することを3日毎に30日間行い歯周病感染モデルとした。結果、P.g投与群において、有意な血糖値上昇を認め、肝臓において、糖新生関連因子であるPCK1とその転写因子FOXO1の有意な発現増強を認めた。さらに糞便に対するメタプロテオーム解析によりP.g投与群にのみP.g菌固有のアミノ酸配列を検出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病の主原因は歯周ポケット局所において、歯周病菌で構成される細菌バイオフィルムの蓄積により歯周組織の破壊が進行する病気である。近年、歯周病菌が他の食物栄養素と共に消化管へ到達する事により、腸内細菌叢が変化し全身に影響を及ぼしているという考えが報告されてきたが、糖尿病に対する詳しいメカニズム詳細はわかっていない。本研究計画によりP.g菌が腸内まで到達していることを示唆する結果が得られ、その流路にあたる小腸においてポリアミン関連分子の優位な低下が検出されたことは肝臓における糖新生亢進に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that periodontal bacteria that reach the gastrointestinal tract through the oral cavity cause dysbiosis in the intestine, and that the specific metabolites produced modify the metabolic function of the liver via the portal vein, thereby affecting diabetes mellitus.

We injected a suspension of *P. gingivalis* (P.g) from the oral cavity every 3 days for 30 days into 7-11 week old db/db mice as a model of experimental periodontitis. The results showed a significant increase in blood glucose level in the P.g-treated group and a significant enhancement of the expression of PCK1, a glycogenesis-related factor, and its transcription factor FOXO1 in the liver. Furthermore, metaproteome analysis of feces showed that the amino acid sequence unique to P.g bacteria was detected only in the P.g-treated group.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 糖尿病 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔内には、700種類以上の細菌がバイオフィルムを形成して棲息している。歯周病は口腔衛生状態不良からの菌共生バランス失調(ディスバイオシス)の状態に対する宿主の慢性的炎症反応の結果と捉えられている。歯周病が全身に影響を及ぼす経路としては、局所の感染からの菌血症や慢性的に過剰産生された炎症性サイトカインが血流を介して全身臓器に影響することにより、心血管疾患、脳梗塞、糖尿病、早期低体重児出産、関節リウマチなどに悪影響するとされてきた。しかし、近年になって、飲食時等に相当量の口腔内細菌が食道から消化管へと移行し、腸内細菌叢に変調をきたすことで、全身状態に影響を及ぼす可能性が報告され、口腔のディスバイオシスである歯周病と糖尿病の関連についてもメタゲノムを応用した研究が盛んに行われている<引用①>。しかし、口腔および腸内細菌叢における菌種が多様なためメタゲノムによる細菌叢の完全な比較解析は困難である。一方、これまでの数々の報告から、歯周病と糖尿病は双方向性に影響していることが明らかにされている。高血糖状態では、歯周組織における免疫力の低下をもたらし、歯周病菌を原因とする炎症が悪化すると考えられているが、我々は高血糖自体が直接的に歯周組織局所での炎症を惹起しているメカニズムを歯肉上皮にフォーカスし、報告してきた。一方、歯周病が糖尿病病態としての糖脂質代謝異常を直接的に修飾するメカニズムについては明らかにされていないことに着目した。

2. 研究の目的

本研究は、歯周病菌が他の食物栄養素と共に消化管へ到達する事により腸管部での細菌叢の平衡状態に変調をきたし、特異的な代謝産物が産生され、同産物が上部消化管から門脈経由で肝臓に流入することにより肝臓での糖・脂質代謝ネットワークの異常を誘導する結果、糖尿病に悪影響を及ぼすという仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

Baker らが報告したマウス口腔から歯周病菌を嚥下感染させるモデル<引用②>を参考に、7~11週齢の db/db マウスに *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 菌懸濁液(1×10⁹ CFU)を 2.5%カルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose, CMC) に希釈し、100 μl ずつ口腔内より注入することを 3日毎に 30日間行い歯周病感染モデル、とした。経時的に摂餌量と体重、血糖値を測定した。最終投与から3日後に安楽死処置を施して顎骨を採取し、マイクロCT解析を行い歯周骨吸収度合いの比較検討を行った。肝臓組織から mRNA を抽出し real-time-PCR 法にて遺伝子発現変化を検討し、タンパク発現変化についてはウェスタンブロット法と免疫染色法にて検討した。さらに、肝臓および糞便に対して液体クロマトグラフィー質量分析法にてプロテオーム解析を行い、小腸に対してはガスクロマトグラフィー質量分析法にてメタボローム解析も行い、代謝物に関して網羅的な解析を行った。

4. 研究成果

db/db マウスに経口から Pg 懸濁液を嚥下させるモデルでは、CMC 基材のみを投与した対照群に対して、Pg 懸濁液投与群は有意な歯槽骨吸収と血糖値上昇が認められている。さらに今回、肝臓及び末梢血中のトリグリセリド(Triglyceride)および血中インシュリン (Insulin) 量について計測した結果、投与群、対照群それぞれの群間に有意な差を認めなかった (Fig.1, 2)。

また、肝臓において、糖新生関連因子である PCK1 とその転写因子である FOXO1 の優位な遺伝子発現増強と脂質代謝関連因子である Fasn の優位な遺伝子発現の減弱がみられた。また PCK1 および FOXO1 についてはウェスタンブロット法および免疫染色法にてタンパクの発現増強も確認された(Fig.3)。

一方、高速液体クロマトグラフ質量分析 LC-MS/MS を用いたショットガンメタプロテオーム解析により、糖新生関連タンパク質 (ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 1、トリオースリン酸イソメラーゼ、アルドラーゼ A の上昇とホスホグルコムターゼ-2、乳酸脱水素酵素 A、ジヒドロリポイルリシン残基アセチルトランスフェラーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼベータ、グルコース 6 リン酸イソメラーゼの減少) に変動が認められ、Pg の嚥下により、肝臓内の糖新生の亢進を惹起していることが明らかとなった。

Fig.1

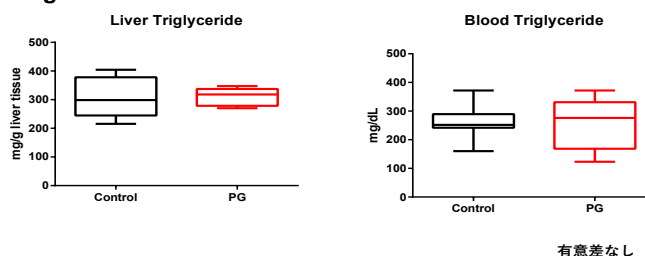
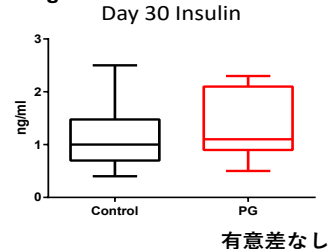


Fig.2



マウス糞便マイクロバイオームにおける門レベルの微生物組成を調べた。サンプルあたり約 350,000 の MS/MS スペクトルを取得し、マウス腸内メタゲノムデータからコード化されたすべての推定タンパク質の UniProt データベースと、マウス、食品、*P.g* の UniProt プロテオームデータベースを組み合わせ検索した。プロテオーム解析で検出可能なペプチドは、*P.g* と対照群の間で差がなかった。合計 16,974 個のユニークなペプチドが同定された。そのうち、5,576 個の分類子固有のペプチドが 14 の微生物の門に一致し、2,451 個のペプチドが 58 の科に、1,626 個のペプチドが 111 の属に一致した。

門別での解析では、*P.g* を接種したマウスとコントロールを投与したマウスの両方で、*Bacteroidetes* と *Firmicutes* が腸内細菌叢を支配していた。*P.g* を投与した db/db マウスでは、コントロールの db/db マウスと比較して、*Bacteroidetes* の相対的な組成が増加し、*Firmicutes* の相対的な組成が減少していた。

科別にみると、*P.g* 投与群では、*Prevotellaceae* (プレボテラ) 科に属する微生物の割合が対照群 (14%) に比べて高いことが確認された。糞便中に最も多く存在する *Prevotella* 属は、*P.g* 投与群のサンプル (29%) が対照群 (22%) に比べて有意に多かった。*P.g* を 30 日間、10 回繰り返して投与した場合、これらの傾向は *P.g* を 1 回だけ投与した場合よりも顕著になった。また、投与群からのみ *P.g* 固有の 7 種類のアミノ酸配列を検出した (Table 1)。

また、小腸組織とその内容物が混合された検体のメタボローム解析では、*P.g* 投与マウスと CMC 投与マウスで腸内代謝物に顕著な違いが見られた。12 種類の親水性代謝物が有意に上昇し、35 種類の親水性代謝物が有意に減少した。また、ポリアミン関連分子であるアルギニン(Arginine)、オルニチン(Ornithine)、メチオニン(Methionine)、スペルミン(Spermine)の存在の優位な減少を確認した。

これらから、我々は、肥満の 2 型糖尿病モデルマウスに *P.g* を 30 日間経口投与し、その糞便中に *P.g* 特異的ペプチドを初めて示し、口腔より嚥下された *P.g* が腸内まで到達していることを示唆する結果を得た。また、プロテオーム解析により、口腔より嚥下された *P.g* が腸内細菌叢の門、科、属レベルで有意な変化をもたらすことを確認した。さらに、*P.g* を投与した糖尿病マウスでは、腸内における代謝産物において、多くのアミノ酸に変化が認められ、特にポリアミンの局所的な含有量に著しい変化が見られた。*P.g* 投与糖尿病マウスでは、のグルコース濃度が悪化するとともに、糖新生関連代謝物の含有量や酵素の発現が増加することを確認した。腸内の変化が肝臓における糖新生亢進に関与している可能性が示唆された。

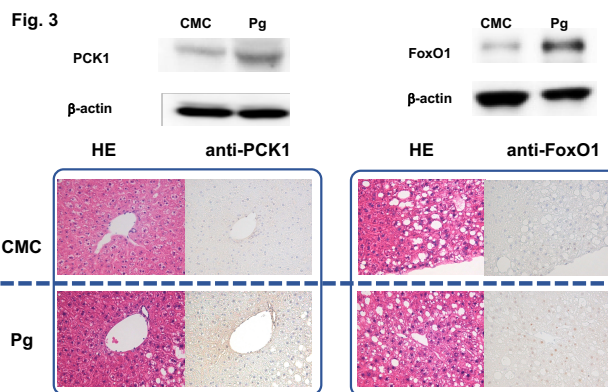


Table.1

Sequence	Modification	Swissprot ID	ProtDescription	PeptScore
DVTVEGSNEFAPV QNLTGSAVGQK		HAGA1_PORGI	Hemagglutinin A	99.1
ECVNVTVDPVQFN PVQNLTGSAVGQK	Carbamidomethyl (C)	HAGA1_PORGI	Hemagglutinin A	92.13
NDSNTSDYSIIIFNT LQK		RPOB_PORGI	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	84.36
LQFTGFDIYGFPQ GSK		OMP40_PORGI	Outer membrane protein 40	58.33
VAEDIASPVNTANAI QQFVK		CPG1_PORG3	Gingipain R1	52.65
TGDTLDCDESHPIVL ESMDFPDPVIGIIV EPK	Carbamidomethyl (C) Oxidation (M)	EFG_PORGI	Elongation factor G	36.94
AFGVGDDESK		FIMA1_PORG3	Major fimbrium subunit FimA type-1	33.93

P.g 菌特有な配列

<引用文献>

- ① Schmidt, T. S. *et al.* Extensive transmission of microbes along the gastrointestinal tract. *Elife* **8**, doi:10.7554/eLife.42693 (2019).
- ② Baker, P. J., Evans, R. T. & Roopenian, D. C. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* and induced alveolar bone loss in immunocompetent and severe combined immunodeficient mice. *Arch Oral Biol* **39**, 1035-1040, doi:10.1016/0003-9969(94)90055-8 (1994).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Moriyama Yusuke, Lee Chonho, Date Susumu, Kashiwagi Yoichiro, Narukawa Yuki, Nozaki Kazunori, Murakami Shinya	4. 巻 5
2. 論文標題 A MapReduce-like Deep Learning Model for the Depth Estimation of Periodontal Pockets	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The 12th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies	6. 最初と最後の頁 388-395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5220/0007405703880395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yoichiro Kashiwagi, Yuki Narukawa, Shiori Hasegawa, Masahide Takedachi, Yoshihiro Izumi, Takeshi Bamba, Yasushi Ishihama, and Shinya Murakami
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis exacerbates hyperglycemia in diabetic mice via gut dysbiosis
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Narukawa, Yoichiro Kashiwagi, Chiaki Morimoto, Keigo Sawada, Masahide Takedachi, Shinya Murakami.
2. 発表標題 Intercellular Adhesion of Gingival Epithelial Cells in Hyperglycemic Condition
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Narukawa, Yoichiro Kashiwagi, Chiaki Morimoto, Keigo Sawada, Masahide Takedachi, Shinya Murakami.
2. 発表標題 Intercellular Adhesion of Gingival Epithelium in Hyperglycemia
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生川由貴、柏木陽一郎、森本千晶、沢田啓吾、竹立匡秀、村上伸也
2. 発表標題 高血糖状態が歯肉上皮の細胞接着に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回 春季日本歯周病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Chiaki Morimoto, Satomi Yamamoto, Asae Hirai, Junpei Shimomura, Yuki Narukawa, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Clinical Evaluation of Periodontal Tissue Regeneration by ADMPC Transplantation
3. 学会等名 96th General Session and Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chiaki Morimoto, Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Satomi Yamamoto, Asae Hirai, Junpei Shimomura, Yuki Narukawa, Yoichiro Kashiwagi, Tomoaki Iwayama, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami
2. 発表標題 Therapeutic efficacy of autologous ADMPC transplantation for periodontal tissue regeneration
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Moriyama, Chonho Lee, Susumu Date, Yoichiro Kashiwagi, Yuki Narukawa, Kazunori Nozaki and Shinya Murakami
2. 発表標題 A MapReduce-like Deep Learning Model for the Depth Estimation of Periodontal Pockets
3. 学会等名 HEALTHINF 2019 12th International Conference on Health Informatics (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	石濱 泰 (Ishihama Yasushi) (30439244)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	
研究 分担者	岩山 智明 (Iwayama Tomoaki) (80757865)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------