

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17305

研究課題名(和文) 歯周病原細菌由来血中TLRリガンドに起因する糖尿病性腎症の予防に関する研究

研究課題名(英文) Study on the prevention of diabetic nephropathy due to blood TLR ligand derived from periodontal pathogenic microorganisms

研究代表者

梶原 弘一郎 (Kajiwara, Koichiro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：80803915

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)：歯周炎を持つ糖尿病患者は持たない患者より腎症に移行する割合の高いことが知られていますが、その仕組みは未解明です。この研究では、糸球体血管が、糖尿病になると免疫分子TLRを発現して、血液中の細菌成分に過剰反応することで腎臓を硬くする可能性を追求しました。すなわち、消化管の細菌は全て肝臓で殺菌されますが、口腔の細菌は直接腎臓に入ります。本研究は、血中に入った歯周病原物質P. gingivalis LPSが構造の複雑な糸球体から排除できず、糖尿病環境で発現するようになったTLRを活性化して、炎症を促進する様々な物質(白血球接着因子、生理活性物質など)を過剰発現することがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は、口腔衛生に気をつけ、よく歯磨きをすること、歯周病があれば早期に治療することで腎症に移行することを予防できる可能性が、マウスを用いた動物実験で示すことができました。糖尿病性腎症の起こる仕組みは多様で、一概に言うことは出来ませんが、少しでも透析患者人口を減らすことに貢献できるのではないかと考えています。

研究成果の概要(英文)：It is known that diabetic patients with periodontitis are more likely to develop nephropathy than patients without periodontitis, but the mechanism is unknown. In this study, we explored the possibility that glomerular blood vessels express the immune molecule TLR in diabetes and overreact to bacterial components in the blood, making the glomerulosclerosis. All bacteria in the digestive tract are killed in the liver, but bacteria in the oral cavity go directly into the kidneys. In this study, It was shown that the periodontal pathogenic substance P. gingivalis LPS in the blood could not be eliminated from the complex glomerulus structure, activating TLRs expressed in the diabetic environment and triggering nephropathy through the over-expression of inflammatory agents like leukocyte adhesion molecules and physiological substances.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：糖尿病性腎症 lipopolysaccharide P. gingivalis toll-like receptor 白血球接着因子 FGF23 A
CE2 口腔衛生

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 30 年厚生労働省国民健康・栄養調査における糖尿病・その疑いの総数は 2000 万人に上る。糖尿病の 40% に合併する糖尿病性腎症の患者は、歯周疾患有病率が非腎症糖尿病患者より有意に多く、重度歯周疾患を有する糖尿病患者は歯周疾患をもたない患者と比べて腎症を合併する危険性が 2-3 倍高い。糖尿病性腎症の病態像は糸球体硬化であるが発症機構は未解決である。申請者の研究グループは I-II 型糖尿病性腎症の糸球体毛細血管が toll-like receptor (TLR)2 と TLR4 を発現することを初めて報告した(図 1 点線)³。TLR は主に貪食細胞が発現する自然免疫受容体で、TLR2 はグラム陽性菌、TLR4 はグラム陰性菌の lipopolysaccharide (LPS)などを認識して TLR 発現細胞にサイトカイン産生を誘導する。健全な一般組織血管、また糖尿病の腎でも糸球体以外の腎血管に発現は見られない。ところが、TLR2 優位の TLR2/4 リガンドである歯周病原細菌 *Porphyromonas (P.) gingivalis* 由来 LPS を頬粘膜に定期的に微量投与した糖尿病マウスでは、同様に投与した健常マウスの全生存期間内に、全マウスが糸球体硬化による腎症で humane endpoint に達した(図 1 実線)⁴。さらに本研究のためエーザイ USA から供試された TLR4 阻害剤エリトランと *P. gingivalis* LPS を同時投与した糖尿病マウスは腎症の劇的な予防効果が見られた(Eritoran,83142-1:2013-0162:Eritoran/E5564, Eisai Inc. USA. 図 1 破線、業績 1)。腎症マウスの便と解剖所見から大腸炎を確認、腎の腸内細菌 *Escherichia (E.) coli* LPS と血中大腸菌抗体が検出され、*P. gingivalis* LPS による免疫攪乱が腸内細菌物質の崩壊と腎循環への侵入を惹起したと考えられた。*E. coli* LPS は強力な TLR4 リガンドである。福岡市の 10 の協力病院における調査では糖尿病性腎症の透析患者は重度の歯周疾患有病率がほぼ 100%で、フレイルや虚血性大腸炎・糖尿病性下痢症などの消化管症状の有病率も極めて高く、歯周疾患が糖尿病患者の腎症合併の独立危険因子、腸内環境が効果修飾因子として複雑系病因を構築することが考えられた。重度の歯周疾患ではブラッシングで容易に菌血症が起こる。糖尿病環境で血中に入った *P. gingivalis* LPS は腎に辿り着き、構造の複雑な糸球体から排除できず TLR などの免疫系を活性化して腎症の引き金を引くことは容易に予想される。同時に糖尿病性フレイル環境で血中歯周病原細菌が腸内細菌に対する免疫を攪乱し、破壊された腸内細菌が腸肝循環から腎循環に入ると、強力な TLR4 リガンドである腸内細菌成分が共役し糸球体硬化症を誘発して腎症を促進すると予想した。

2. 研究の目的

本研究は、血中に入った歯周病原物質 *P. gingivalis* LPS が構造の複雑な糸球体から排除できず、糖尿病環境で過剰発現した TLR を活性化して腎症の引き金を引く機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) マウス

Streptozotocin (STZ) を注射した脾島破壊型 I 型糖尿病 ICR マウス(STZ-ICR)を使用した。マウスに STZ (Sigma-Aldrich Japan) を 200 mg/kg 単回腹腔内注射し、マウスの血糖値を Glutest Sensor (Sanwa Kagaku Kenkyusyo) で週 2 回チェック、600mg/dl を超える血糖値を示したマウスを STZ 誘発糖尿病マウス(STZ-ICR)として使用した。以前の研究で健康な ICR の健康状態に影響を及ぼさないことを確認した 3mg/kg (LD50=30 mg/kg; Invivogen) の Pg-LPS を頬粘膜

下に週 1 回、4 か月間注射、Pg-LPS 投与健康マウス (LPS-ICR) を対照として、尿糖、尿タンパク、尿潜血を試薬ストリップ (Uriace、Terumo Corporation) でモニターし尾静脈血液の血中尿素窒素 (BUN) とクレアチニン (BUN) を分析した (Kyudo)。尿糖と尿タンパク質強陽性、同時に 40 mg/dl 以上の BUN と 0.7mg/dl 以上の CRE を示した場合、Pg-LPS 誘導性糖尿病性腎症マウス (LPS-STZ) とした (Kajiwara K, Takata S, To TT, Takara T, Hatakeyama Y, Tamaoki S, Darveau RP, Ishikawa H, Sawa Y. The promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via toll-like receptors. *Diabetol Metab Syndr*. 2017; 9:73.)。

2) 形態解析

P. gingivalis LPS を投与したマウス腎組織の凍結切片を-20 度 100%メタノールで 10 分間固定、腎組織における次の発現を免疫染色にて検索し、発現量を ImageJ にて定量した: vascular endothelial adhesion molecule-1 (VCAM-1), E-selectin; sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2), fibroblast growth factor (FGF) 23, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), podoplanin, Mac-1.

4. 研究成果

白血球接着因子 VCAM-1 発現は、正常な腎臓では見られない T 細胞および単球の腎浸潤を標的として腎慢性疾患の腎近位尿細管でアップレギュレートされる。炎症の初期段階で発現する白血球接着因子 E-セレクチンは糸球体腎炎の尿細管間毛細血管に存在するが腎尿細管には存在しない。この研究では、ICR、STZ-ICR、LPS-ICR の腎臓に VCAM-1 (図 1) または E-セレクチン (図 2) を発現する血管はないが、LPS-STZ では腎尿細管および糸球体で VCAM-1 の発現が確認された (図 1)、E-セレクチンの発現は糸球体を含む腎実質で確認された (図 2)。これらの結果は、Pg-LPS が LPS-STZ の尿細管間および糸球体毛細血管における VCAM-1 と E-セレクチンの過剰発現に基づいて炎症を引き起こすことを示唆している。腎疾患の尿細管における VCAM-1 過剰発現が報告され、E-セレクチンは腎疾患で尿細管間毛細血管は E-セレクチンを発現し可溶性 E-セレクチンは糸球体腎炎を促進する。歯周炎は糖尿病状態で VCAM-1 と E-セレクチン過剰発現により尿細管炎を誘発し腎症を促進すると考えられる。

骨細胞ホルモン FGF23 は近位尿細管でリンの再吸収を抑制し血清リン濃度を低下させる。FGF23 は ICR、STZ-ICR および LPS-ICR では検出されず、LPS-STZ の尿細管および糸球体で検出可能で (図 2)、Pg-LPS が糖尿病患者腎尿細管における FGF23 蓄積が示された。歯周炎の糖尿病患者の血中 FGF23 の増加が腎症の進行の予測に寄与する可能性がある。近位尿細管上皮細胞のアングiotenシン変換酵素 2 (ACE2) は、STZ-ICR と LPS-ICR では近位尿細管細胞でのみ検出され、LPS-STZ では過剰発現が尿細管と糸球体で観察された (図 2)。

マクロファージはポドプラニン、単球は Mac-1 を発現する。Mac-1 およびポドプラニン陽性細胞は LPS-ICR または STZ-ICR と比較して LPS-STZ が顕著だった (図 3)。LPS-STZ の糸球体、尿細管、および尿細管間毛細血管で VCAM-1 と E-セレクチンの過剰発現が観察されたため、歯周炎は糖尿病条件下で腎単球-マクロファージ系統浸潤による慢性炎症イベントを引き起こすと考えられた。本研究から、*P. gingivalis* LPS が糖尿病環境で VCAM-1 および E-セレクチンの腎血管のみならず尿細管間質の過剰発現を誘発し、腎単球-マクロファージ系統浸潤による糸球体硬化症や尿細管炎などの慢性炎症イベントを促進すること、歯周炎が腎症患者に FGF23 蓄積による低リン血症と ACE2 過剰発現を招くことが示唆された。

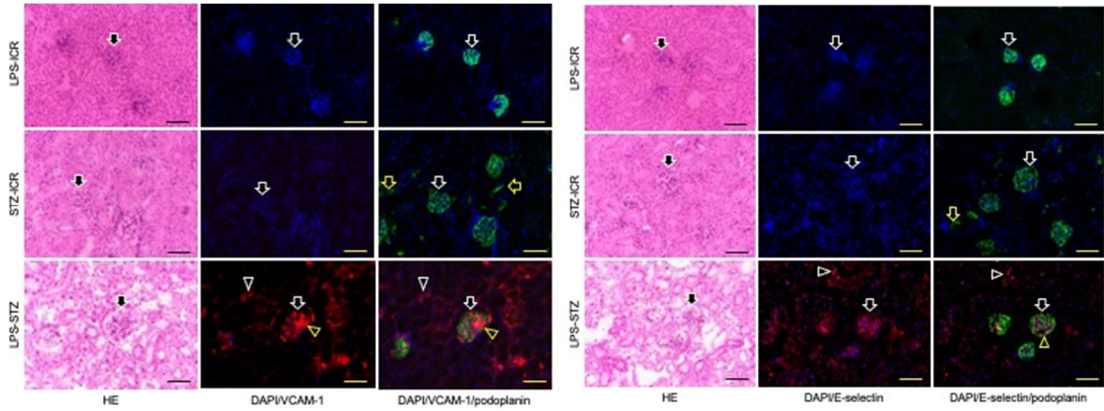


図 1. VCAM-1 と E-selectin の過剰発現は、*P. gingivalis* 由来 LPS 投与および糖尿病マウスで見られないが LPS 投与糖尿病マウスの糸球体、尿細管、および尿細管間毛細血管で観察された。

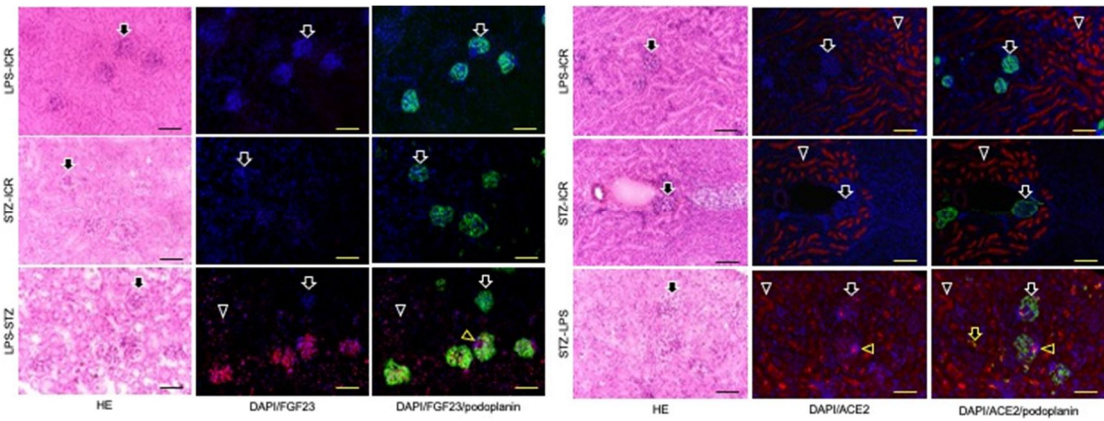


図 2. FGF23 と AGE2 の過剰発現は、*P. gingivalis* 由来 LPS 投与および糖尿病マウスで見られないが LPS 投与糖尿病マウスの糸球体、尿細管、および尿細管間毛細血管で観察された。

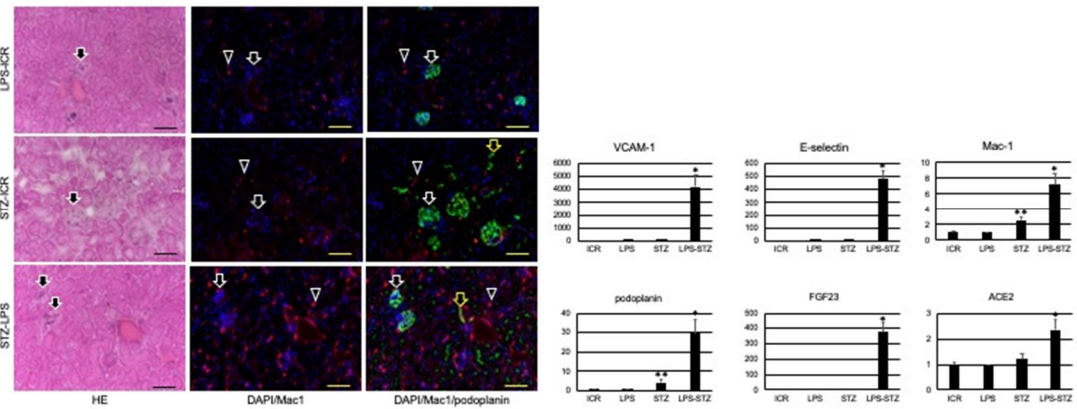


図 3. 多数の Mac-1 陽性マクロファージの実質への細胞浸潤が観察された。リアルタイム RT-PCR による解析では、VCAM-1, E-selectin, Mac-1, FGF23 および ACE2 の遺伝子発現は *P. gingivalis* LPS 未投与糖尿病マウスまたは *P. gingivalis* LPS 投与非糖尿病マウスよりも *P. gingivalis* LPS 投与糖尿病マウスで有意に高かった。

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 Kajiwara K, Sawa Y, Fujita T, Tamaoki S.	4. 巻 22
2. 論文標題 Immunohistochemical study for the expression of leukocyte adhesion molecules, and FGF23 and ACE2 in <i>P. gingivalis</i> LPS-induced diabetic nephropathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12882-020-02203-y	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 3件）

1. 発表者名 梶原弘一郎、高良憲洋、藤田隆寛、坂上竜資、小島寛、沢禎彦、玉置幸雄
2. 発表標題 Porphyromonas. gingivalis LPSが誘導する糖尿病性腎症の発症とTLR4阻害剤の効果について
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Kajiwara, Kenyo Takara, Takahiro Fujita, Takenori Kanai, Ryuji Sakagami, Hiroshi Kojima, Yoshihiko Sawa and Sachio Tamaoki
2. 発表標題 Effect of TLR4 inhibitors on porphyromonas gingivalis LPS-induced diabetic nephropathy
3. 学会等名 第67回JADR総会・学術大会 / 第4回 IADR-APR (Asia Pacific Region) 学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原弘一郎、高良憲洋、高田俊輔、玉置幸雄、吉永泰周、沢禎彦、坂上竜資
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis LPS に起因する糖尿病性腎症とTLR阻害剤による予防効果に関する研究
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kajiwara K, Takara K, Takata S, Tamaoki S, Yoshinaga Y, Sawa Y, Sakagami R.
2. 発表標題 Study for the diabetic nephropathy promoted by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and the prevension effect by TLR blocker
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 (JADR) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kajiwara K, Sawa Y, Fujita T, Tamaoki S.
2. 発表標題 Immunohistochemical study for the expression of renal physiologically active molecules in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced diabetic nephropathy
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kajiwara K, Sawa Y, Fujita T, Tamaoki S
2. 発表標題 An immunohistochemical study on the expression of bioactive molecules in the mouse kidney in P. gingivalis LPS-induced diabetic nephropathy
3. 学会等名 第68回国際歯科研究学会総会・学術大会 (JADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原弘一郎, 沢禎彦, 玉置幸雄
2. 発表標題 P. gingivalis LPS 誘導性糖尿病性腎症マウスにおける白血球接着因子とFGF23およびACE2の発現
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------