

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592148

研究課題名（和文） 歯周病とインスリン抵抗性の連関における分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Experimental analysis of the correlation between periodontal disease and insulin resistance.

研究代表者

筑波（門脇） 知子（TSUKUBA (KADOWAKI) TOMOKO)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：70336080

研究成果の概要：近年、歯周病や歯の喪失がさまざまな生活習慣病の危険因子になる可能性が指摘されている。この研究は、歯周病が生活習慣病の発症や増悪に働く分子メカニズムを解明する目的で行なわれた。歯周病の原因菌であるジンジバリス菌をマウスに感染させると典型的な高脂血症を呈した。感染によって、生活習慣病予防因子の血中アディポネクチンやレプチンは減少し、危険因子である TNF α が増加した。解剖学的には肝臓および膵臓に異常を認めた。この菌の病原因子であるジンジパインという酵素を欠損した菌では、このような変化は軽微であったことから、本菌がジンジパインを介して、動脈硬化症や糖尿病増悪をきたすことが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：歯周病、細菌感染、糖尿病、動脈硬化、生活習慣病、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

日本成人の約80%は歯周（肉）炎の所見を有するといわれている。歯周炎は歯牙喪失の最大原因であり、歯牙喪失は咀嚼、発音、唾液の分泌などの口腔機能に異常をきたすだけでなく、全身性に生体機能の低下をもたらすと考えられている。近年、心循環系疾患

（心内膜炎・動脈硬化症・心筋梗塞）、脳血管障害（脳出血・くも膜下出血・脳梗塞）、慢性閉塞性肺疾患、早期低体重児出産、神経機能失調など多岐に渡る全身的疾患が歯周病と関連する可能性が指摘されている。特に実験的に歯周病原因菌を感染させたモデル動物において、アテローム性動脈硬化症の発

症と進行が亢進することが示された。動脈硬化症発症の基盤となる病態としては、メタボリックシンドロームが注目されている。最近の疫学的調査によって、歯周病は動脈硬化症だけでなく、これら高血圧症や糖尿病などのメタボリックシンドロームと高い相関性があることが示されている。肥満、インスリン抵抗性、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧などを合併するこの病態では、それぞれの異常が階層的・相互的に連関しながらその病態を重症化していくと考えられている。したがってその病態の分子治療目的は、より上流に位置すればするほど包括的に病態を改善に向かわせることができると考えられる。したがって歯周病がこれらメタボリックシンドロームのリスクファクターとして作用するとすれば、歯周病の予防・治療を介して、これら全身性のメタボリック症状を制御できる可能性が示唆される。

Porphyromonas gingivalis (以下、ジンジバリス菌) は、歯周病の最重要病原性細菌と考えられている。本菌はLPSや線毛、夾膜などいくつかの病原性因子を有するが、大きな特徴の一つは、強力なタンパク質分解活性を示すことである。これは本菌が糖発酵能を持たず、栄養・エネルギー源を外界のタンパク質やペプチドに依存しているためである。我々はこれまでに本菌の産生する主要なタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)「ジンジパイン」が宿主生体分子の破壊を引き起こし、生体細胞傷害や血管透過性亢進を引き起こす強力な病原性因子であるだけでなく、菌体自身の生存にとっては必須因子であることを見出した。すなわち、ジンジバリス菌の病原性を考える上で、ジンジパインはもっとも重要な因子であると考えられる。ジンジパインに対する特異的阻害剤を作製し、検討したところ、*in vitro* および *in vivo* で病原性抑

制に効果があることが示された。また、ジンジバリス菌野生株の感染はアポリポプロテインE欠損マウスにおいて動脈硬化の発症・進行を加速するが、ジンジパイン欠損株ではそのような効果は示さないこともわかり、ジンジバリス菌、特にその酵素であるジンジパインがメタボリックシンドロームを含む全身性に影響を与えていることが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病に起因する状態がメタボリックシンドロームを引き起こし増悪因子として作用するのか、因果関係の有無を明らかにし、そのメカニズムを医学生物学的に分子レベルで解明するとともに、これを基盤にして危険因子を制御することを目的としている。これが実現できれば、世界的に高齢化社会の先頭にいるわが国において、アンチエイジング医学に大きく貢献できると考えられる。具体的には(1)ジンジバリス菌感染動物実験モデルで、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポサイトカインの動態解析を行う。(2)アディポサイトカイン受容体シグナル伝達に及ぼすジンジバリス菌の影響とジンジパインの寄与の解析(3)インスリンとインスリン受容体シグナル伝達に及ぼすジンジバリス菌の影響とジンジパインの寄与の解析(4)それら細胞内シグナル伝達系のクロストークの解明(5)引き続き起こる生体細胞・組織間の相互作用によって起こる生体応答の解析を生化学的、細胞生物学的、分子遺伝学および形態学的方法を用いて行うことを目的としている。(6)さらにそれらを基盤としてジンジバリス菌感染に対する生体応答の制御をおこない、疾患の予防および治療に応用しようとするものである。

3. 研究の方法

本研究は、歯周病と肥満、インスリン抵抗性、糖代謝異常、脂質代謝異常、高血圧、糖尿病などを合併するこの病態であるメタボリックシンドロームとの関連性の解明と、その制御を総括的な目的として、以下に示すような方法で研究を行った。

(1) 歯周病原性細菌感染とアディポサイトカイン動態の解析

まず、ジンジバリス菌感染動物実験モデルで、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポサイトカインの動態解析を行った。解析のターゲットとしては、インスリンそのもののほか抗動脈硬化作用を有することが知られているアディポネクチン、抗肥満作用を示すレプチン、また、これらと拮抗する TNF α 、レジスチン、遊離脂肪酸を測定した。この解析に当たって、ELISA によるタンパク質レベルでの測定に加えて、RNA レベルでの転写についても解析した。アディポネクチンは抗糖尿病・抗動脈硬化・抗炎症作用を持ち、メタボリックシンドロームに密接に関係したサイトカインであることが示されている。歯周病原性細菌の中でも、ジンジバリス菌は強力なタンパク質分解活性をもち、IL-6, IL-8, MCP-1 など炎症性サイトカインを分解・不活性化することがわかっているため、アディポサイトカインのタンパク質レベルにも影響を与えている可能性が予測された。使用する実験モデルとしては動脈硬化症高発現モデルのアポリポプロテインE欠損マウスのほか、その parent strain である C57BL/6J、ならびに BALB/c を用いた。2型糖尿病の発症には遺伝的素因に加えて肥満・過食・高脂肪食摂取・運動不足といった環境因子が大きな役割を占めていることは周知の事実であるため、それらマウスを普通食、高脂肪食で飼育した場合で比較した。

(2) アディポサイトカイン受容体に及ぼすジンジバリス菌の影響

ジンジバリス菌はTリンパ球の表面分子である CD4 や CD8 を分解することが知られている。また、多形核白血球の食殺菌作用を阻害することから、補体受容体 C3R あるいは IgG 受容体である Fc γ R を分解することが示唆されている。したがって、アディポサイトカイン受容体が、ジンジバリス菌によって分解・不活性化されている可能性が考えられた。2型糖尿病と負の相関を示すアディポネクチンに対する受容体のうち AdipoR1 は哺乳動物に限らず、種を超えて酵母にまで保存されていることが知られており、血管内皮細胞での発現も認められている。血管内皮細胞での AdipoR1 を介するシグナルは NO 産生を上昇させ、抗動脈硬化作用に直接関与すると考えられている。そこで、血管内皮細胞にジンジバリス菌を作用させたときの AdipoR1 の発現量をウェスタンブロット法ならびにリアルタイム PCR で解析した。このときみられる変化についてジンジバリス菌野生株を作用させたときと、ジンジバリス菌欠損株を作用させたときで比較した。同様の解析をインスリン受容体についても行った。

(3) 抗糖尿病性細胞内シグナル伝達に及ぼすジンジバリス菌の影響

近年、2型糖尿病発症につながるインスリン抵抗性の発症機序に関するシグナル伝達機構の研究が進歩し、特にPI3キナーゼを中心とするタンパク質リン酸化を介するシグナルが重要であると考えられている。そこで、ジンジバリス菌感染によるこれらの細胞内タンパク質リン酸化反応を調べた。我々のこれまでの研究から、ジンジバリス菌を感染させると、血管内皮細胞でオートファジーが亢進することがわかっているが、オー

トファゴソーム形成もPI3キナーゼを介することがわかっており、インスリン抵抗性シグナル経路とオートファジーはともにPI3キナーゼを介することで共通する部分を持つことから、両者はジンジバリス菌感染によってともに修飾されていることが示唆された。PI3キナーゼの活性化の指標としては、そのすぐ下流にあると考えられているAktのリン酸化を、また、これを負に制御することが知られているPTENと、PI3キナーゼの上流にあるインスリン受容体基質(IRS)についてもジンジバリス菌感染によるそれらの量的・質的变化を解析した。細胞の外界刺激に対する反応としてよく知られているMAPキナーゼカスケードに対しても、カスケードの主な3つの経路であるERK1/2、JNK1/2/3、p38のリン酸化を解析した。以上のようなジンジバリス菌感染に対する細胞内シグナル伝達反応を野生株とジンジパイン欠損株とで比較し、ジンジパインの寄与程度を調べた。

(4) ジンジバリス菌感染時の生体細胞・組織間の相互作用によって起こる応答の解析

ジンジバリス菌投与マウスを用いた実験動物モデルの系において糖代謝、脂質代謝において中心的役割を果たしている肝臓にも注目し、ジンジバリス菌感染による肝臓の器質的・機能的な変化について解析した。

4. 研究成果

歯周病が生活習慣病の増悪に働くメカニズムを解明するために、ジンジバリス菌感染とインスリン抵抗性増悪ならびに動脈硬化症との関係を調べた。動物実験モデルとして、免疫学的にTh1優位なC57BL/6とTh2優位なBALB/cを用いた。ジンジバリス菌のジンジパイン欠損株であるKDP136は、ヒト大動脈血管内皮細胞に感染させると、その親株である

ATCC33277と同様にファゴソームに輸送されるが、野生株に比べてジンジパイン欠損株は非常に速い速度で生存が低下し、ジンジパインが生体リソソーム内での殺菌作用に耐性を付与していることが明らかとなった。そこで、ジンジパイン欠損株を野生株の10倍多く(野生株 10^7 CFU、ジンジパイン欠損株 10^8 CFU)投与し、経時的に体重や血中サイトカイン量、血糖値、脂質を解析するとともに、動脈硬化症病巣形成を調べたところ、BALB/cマウスにおいてもC57BL/6Jにおいてもジンジバリス菌感染に伴い、総コレステロール量およびLDL-コレステロールの増加と、HDL-コレステロールの減少を認め、典型的な高脂血症を呈していることがわかった。感染によって血中アディポネクチンやレプチンは減少し、TNF α が増加していた。解剖学的には肝臓および膵臓に器質的变化を認め、血中インスリン濃度もコントロール群に比べて低下していた。ジンジパイン欠損株投与群は野生株より大量に感染させているにも関わらず、このような変化はかなり軽微であり、本菌の病原性においてジンジパインの寄与が大きいことが示唆された。すなわち、ジンジバリス菌感染はジンジパインを介して動脈硬化症やインスリン抵抗性増悪に重要な影響を及ぼすことが示された。さらに妊娠マウスにジンジバリス菌野生株を投与すると早産・死産するが、同量のジンジパイン欠損株を投与しても早産しなかった。エンドソーム・リソソーム酵素であるカテプシンE欠損マウスは免疫異常を呈するが、本マウスに高脂肪食を給餌すると同様の病態が観察され、高脂血症ならびに肝臓の病的変化が認められることから、ジンジバリス菌感染がジンジパインを介して生体のエンドソームシステムに影響を与え、生活習慣病を誘導している可能性が示唆された。

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 13 件)

1. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an *in vitro* study. *J. Endodontics* 査読あり (2008) 34, 1057-1060
2. Shigematsu N, Fukuda T, Yamamoto T, Nishioku T, Yamaguchi T, Himeno M, Nakayama KI, Tsukuba T, Kadowaki T, Okamoto K, Higuchi S, Yamamoto K. Association of cathepsin E deficiency with the increased territorial aggressive response of mouse. *J. Neurochem.* 査読あり (2008) 105, 1394-1404
3. Ishida Y, Hu JP, Sakai E, Kadowaki T, Yamamoto K, Tsukuba T, Nakayama K, Okamoto K. Determination of active site of Lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) by use of a *Porphyromonas gingivalis* plasmid system. *Arch. Oral Biol.* 査読あり (2008) 53, 538-544
4. Kawakubo T, Okamoto K, Iwata J, Shin M, Okamoto Y, Yasukochi A, Nakayama KI, Kadowaki T, Tsukuba T, Yamamoto K. Cathepsin E Prevents Tumor Growth and Metastasis by Catalyzing the Proteolytic Release of Soluble TRAIL from Tumor Cell Surface. *Cancer Res.* 査読あり (2007) 67, 10869-10878

5. Kakehashi H, Nishioku T, Tsukuba T, Kadowaki T, Nakamura S, Yamamoto K. Differential regulation of the nature and functions of dendritic cells and macrophages by cathepsin E. *J. Immunol.* 査読あり (2007) 179, 5728-5737
6. Sakai E, Naito M, Sato K, Hotokezaka H, Kadowaki T, Kamaguchi A, Yamamoto K, Okamoto K, Nakayama K. Construction of recombinant hemagglutinin derived from the gingipain-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*, identification of its target protein on erythrocytes, and inhibition of hemagglutination by an inter-domain regional peptide. *J Bacteriol.* 査読あり (2007) 189, 3977-3986
7. Yamatake K, Maeda M, Kadowaki T, Takii R, Tsukuba T, Ueno T, Kominami E, Yokota S, Yamamoto K. The Role for Gingipains in *Porphyromonas gingivalis* Traffic to Phagolysosomes and Survival in Human Aortic Endothelial Cells. *Infect. Immun.* 査読あり (2007) 75, 2090-2100

[学会発表] (計 14 件)

1. 門脇知子 他「カタペシンE欠損マウスにおける高脂血症および脂肪肝の誘導」第50回歯科基礎医学学会学術大会 2008年9月25日於東京
2. Kadowaki T. et al. Roles for gingipains in atherosclerosis progression accelerated by bacterial exposure. 5th General Meeting of the

International Proteolysis Society, Patras
Greece 2007年10月24日

3. Takii R. et al. The relation of
Porphyromonas gingivalis infection and
preterm delivery and low birth. 5th General
Meeting of the International Proteolysis
Society, Patras Greece 2007年10月24日

4. 門脇知子 他「*P. gingivalis* 感染とイン
スリン抵抗性に関する実験的解析」第49回
歯科基礎医学会学術大会 2007年8月31日
於札幌

5. 瀧井良祐 他「菌周病原因菌
Porphyromonas gingivalis と早産・低体重
児出産に関する基礎的研究」2007年8月3日
於大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筑波（門脇） 知子
九州大学大学院歯学研究院・助教
研究者番号：70336080

(2) 研究分担者

山本 健二
九州大学大学院薬学研究院・教授
研究者番号：40091326

筑波 隆幸
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：30264055

(3) 連携研究者

瀧井 良祐
山口大学大学院医学研究院・助教
研究者番号：00419558