

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24062

研究課題名(和文) 歯周病が糖尿病性腎症に与える影響とそのメカニズムについて

研究課題名(英文) The effect of periodontal disease on diabetic nephropathy

研究代表者

佐々木 直樹 (Sasaki, Naoki)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：40848305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病モデルマウスに対し、P.gingivalisを口腔内投与・静脈内投与し、腎臓の機能・組織学的評価、遺伝子解析を行なった。P.gingivalisを投与した群において尿量と尿中のアルブミンは増加を認めた。また、安楽殺後の腎臓の組織切片では糸球体でのメザンギウム基質、糸球体基底膜に明らかな変化を認めなかったが、皮質の遺伝子解析では炎症関連遺伝子の発現上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症は、臨床的に尿中のアルブミン量の増加や腎臓の尿細管間質での慢性炎症が認められるが、本研究において、P.gingivalisを投与した糖尿病モデルマウスでこれらの臨床症状が悪化するという結果が得られた。しかし、歯周病と糖尿病性腎症の関連性についての明確なメカニズムを解明するためには、遺伝子発現の網羅的な解析および16S rRNAに基づいた腸内細菌叢解析、糸球体由来の細胞株へのP.gingivalis LPS刺激による分化への影響の評価などさらなる実験が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of intravenously injected or administrated by oral gavage P.gingivalis on diabetic nephropathy. Diabetes was induced by streptozotocin injection in C57BL/6J male mice. The urine and urinary albumin 24-hours volume were increased in the P.gingivalis administrated mice. The mesangial matrix expansion and the glomerular basement membrane thickness were no difference between the mice administrated P.gingivalis and saline. The level of inflammation-related gene in renal cortex was increased in the P.gingivalis administrated mice.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の合併症の一つである糖尿病性腎症は1998年以降、透析導入の原因として最も多い疾患となっている。糖尿病性腎症は、腎機能の予後だけではなく、心血管疾患の発症の観点からも、慢性腎臓病における重要な疾患である。その病態は糸球体内皮細胞の障害に始まり、特に急性腎障害では多くの細胞障害性サイトカイン、成長因子が産生され、微小環境炎症となる。

一方、歯周病は歯周病原細菌による炎症性疾患である。歯周病原細菌はLPS、線毛のような毒性を持つ。歯周局所の炎症による全身での炎症性サイトカインの上昇に加えて、菌血症、また最近では腸内細菌叢の変化など様々な経路で糖尿病や動脈硬化など様々な疾患のリスクに関与することが報告されている。よって、歯周炎の罹患が糖尿病性腎症における急性腎障害に近い状態を惹起する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病罹患によって糖尿病性腎症が増悪する可能性についてモデルマウスおよび細胞株を用いて検討し、歯周治療が糖尿病性腎症を改善する可能性について、臨床研究を行い評価する。歯周炎と腎臓に関する報告として、2005年にSaremiらにより、重度の歯周病を併発する糖尿病患者では、腎不全などの合併症による死亡率が高まるという、歯周病と慢性腎臓病との関連性を調べた初めての報告がされた。その後も、歯周病の罹患と腎機能の低下には有意な相関があるという報告や*P.gingivalis*に対する血清抗体価の上昇と腎機能の低下は有意な相関があるという報告がされてきた。しかし、これまではヒトを対象とした疫学研究による報告が多くを占めており、歯周病と糖尿病性腎症の関連についての明確なメカニズムは明らかになっていない。申請者は、モデルマウスおよび細胞株を用いた実験でメカニズムを明らかにし、臨床介入研究で歯周治療によって糖尿病性腎症改善の可能性を検討する。慢性腎不全患者での人工透析は医療費の多くを占めており、歯周治療を通して医療費の削減にも寄与することが出来る。

3. 研究の方法

[令和1年度の計画]

マウス(DBA/2)を用いた歯周病原細菌感染が糖尿病性腎症に与える影響の検討

4週齢のマウスに50mg/Kg ストレプトゾトシンを5日間連続投与し、その3週間後に血糖値測定を行い、血糖値400mg/dlを超えたマウスを糖尿病モデルマウスとする。

*P.gingivalis*と生理食塩水を週2回、口腔内投与・静脈内投与する。8週後に採尿ケージを用い採尿し、尿量・尿中のアルブミン量を比較する。腎臓の組織切片で、糸球体や有足細胞の形態学的な評価を行い、PAS染色によってメザンギウム基質の増加を評価する。q-PCR法を用いた炎症性・有足細胞に関連する発現遺伝子の評価を行う。また、腎臓の糸球体を単離し、RNA抽出後マイクロアレイ解析を行い、発現変動遺伝子をKEGG pathway解析、Gene Set Enrichment Analysisにて評価する。さらに、採取した便からDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子に基づいた腸内細菌叢解析およびメタゲノム機能予測解析を行う。

[令和2年度の計画]

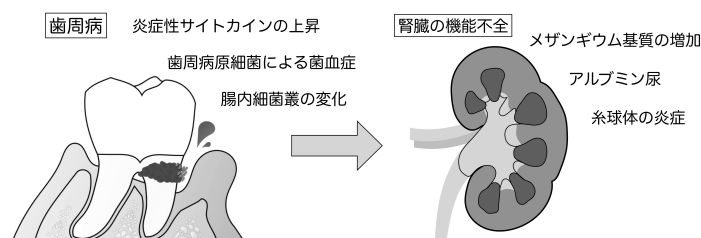
細胞株(SVI)を用いた*P.gingivalis* LPSの糸球体への影響への評価

糸球体由来の細胞株SVIは、33°Cで増殖、37°Cで有足細胞へと分化する性質がある。温度変化によって分化させる際に*P.gingivalis* LPS刺激を行いpodocinのmRNA発現を評価し、*P.gingivalis* LPSによるSVIの分化への影響を評価する。

通法により有足細胞へと分化したSVIに対し、低グルコースおよび高グルコース状態で*P.gingivalis* LPS刺激を行い、モデルマウスの実験に基づいた遺伝子、炎症に関連する遺伝子の発現を評価する。

歯周炎を有する糖尿病性腎症患者への歯周治療介入による腎機能への影響の評価

被験者に歯周治療を行い、歯周治療前後での腎機能の変化を評価する。治療前後での唾液・血液を採取し、qPCR法による唾液中の細菌検査およびtype1-4の*P.gingivalis*に対する血清IgG抗体価を測定し、腎機能との関連を評価する。



4. 研究成果

糖尿病モデルマウスに対し、*P.gingivalis*を口腔内投与・静脈内投与し、腎臓の機能・組織学的評価、腎臓の遺伝子解析を行なった。4週齢のマウスに50mg/Kgストレプトゾトシンを5日間連続投与し、3週間後に血糖値が400mg/dlを超えたマウスを糖尿病モデルマウスとした。その後、*P.gingivalis*または生理食塩水を週2回、口腔内投与・静脈内投与し、8週後から採尿ケージを用い採尿後、尿量・尿中のアルブミン量を比較した。24時間での尿量の平均値は*P.gingivalis*を投与した群では、生理食塩水を投与した群に比較し有意に多くなり、アルブミン量の平均値は、有意差はなかったものの、同様に*P.gingivalis*を投与した群で多いという結果となった。その後、10週後と16週後に安楽殺を行い、腎臓の組織切片の評価を行なった。糸球体でのメザンギウム基質の増加、糸球体基底膜の肥厚について比較したが、両群での明らかな差は認められなかった。腎臓の皮質の遺伝子解析では、炎症に関連する遺伝子は*P.gingivalis*を投与した群での有意な上昇が認められたが、腎臓の有足細胞マーカーでは有意な差は認められなかった。今後は、結果を元に評価時期や糖尿病モデルの作成方法など検討や、遺伝子発現の網羅的な解析および16S rRNAに基づいた腸内細菌叢解析、糸球体由来の細胞株 への*P.gingivalis* LPS刺激による分化への影響の評価についてさらなる実験が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hatasa Masahiro, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Yoshida Sumiko, Niimi Hiromi, Morita Kazuki, Tsuchiya Yosuke, Shimohira Tsuyoshi, Sasaki Naoki, Maekawa Shogo, Shiba Takahiko, Hirota Tomomitsu, Tohara Haruka, Takahashi Hirokazu, Nitta Hiroshi, Iwata Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis Alters Endocrine Functions in Brown Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.580577	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 -

1. 著者名 Watanabe K, Katagiri S, Takahashi H, Sasaki N, Maekawa S, Komazaki R, Hatasa M, Kitajima Y, Maruyama Y, Shiba T, Komatsu K, Ohsugi Y, Tanaka K, Matsuzawa A, Hirota T, Tohara H, Eguchi Y, Anzai K, Hattori A, Iwata T	4. 巻 35
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis impairs glucose uptake in skeletal muscle associated with altering gut microbiota	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202001158R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kataoka A, Katagiri S, Kawashima H, Nagura F, Sasaki N, Shiba T, Iwata T, Nara Y, Hioki H, Nakashima M, Hatasa H, Maekawa S, Ohsugi Y, Watanabe Y, Shimokawa T, Kozuma K	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between periodontal bacteria and degenerative aortic stenosis: a pilot study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science (in press)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hatasa M, Ohsugi Y, Katagiri S, Hirota T, Yoshida S, Morita K, Niimi H, Shimohira T, Watanabe K, Sasaki N, Maekawa S, Nitta H, Iwata T
2. 発表標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis aggravates inflammation in brown adipose tissue.
3. 学会等名 The 106th Annual meeting American Academy of Periodontology（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 畑佐 将宏, 大杉 勇人, 片桐 さやか, 新見 ひろみ, 森田 和機, 吉田 澄子, 下平 剛, 佐々木 直樹, 前川 祥吾, 芝 多佳彦, 廣田 朝光, 新田 浩, 岩田 隆紀
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisによる菌血症は褐色脂肪の内分泌機能を変化させる
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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
---------	---------