

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09909

研究課題名(和文) 歯周病菌が関わる糖尿病性腎症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the Mechanism of Diabetic Nephropathy Development Involving Periodontal Bacteria

研究代表者

大西 智和 (Ohnishi, Tomokazu)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：30244247

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)：IgA腎症における歯周病菌感染と二型糖尿病の相乗効果を検討するマウスモデルを確立するため、野生型マウスに高脂肪食で4ヶ月飼育し、Treponema を投与し実験的歯周炎誘導マウスを作製した。その結果、尿中のアルブミン、IgG、IgAは増加しメサンギウム領域の拡大とIgAの沈着が認められた。また、歯周病菌刺激のシグナル分子としてTpl2を選びTpl2 koマウスに同様の処置を行ったところ、尿中IgG、IgAの増加は認められずメサンギウム領域の拡大とIgAの沈着も認められなかった。このことからTpl2はIgA腎症発症において歯周病菌感染と二型糖尿病の相乗効果に重要な機能があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IgA腎症の治療方法として扁桃摘出が確立されており、その摘出された扁桃の臨床研究から、Treponemaの扁桃への感染が予後に関わる因子として報告されている。また、糖尿病性腎症と言われている腎疾患の多くはIgA腎症に関わりが深いことが知られている。しかし、糖尿病モデルマウスから派生したIgA腎症モデルは報告がない。そこで、本研究では二型糖尿病発症マウスにTreponema を投与し、実験的歯周炎を誘導することでIgA腎症を発症するマウスモデルを確率的に作製した。さらに、このモデルを用いどのような遺伝子欠損がIgA腎症発症に関わるかを示した。

研究成果の概要(英文)：We established an experimental mouse model of periodontitis induced by Treponema infection to investigate the synergistic effect of periodontal bacterial infection and type 2 diabetes in IgA nephropathy. Wild-type mice were fed a high-fat diet for 4 months and then administered Treponema. As a result, we observed an increase in urinary albumin, IgG, and IgA levels, expansion of the mesangial area, and IgA deposition. To investigate the signaling molecule Tpl2 as a mediator of periodontal bacterial stimulation, we performed the same treatment on Tpl2 knockout mice and found no increase in urinary IgG or IgA levels, and no expansion of the mesangial area or IgA deposition. These findings suggest that Tpl2 plays an important role in the development of IgA nephropathy in the context of the synergistic effect of periodontal bacterial infection and type 2 diabetes.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯周炎 IgA腎症 腎糸球体 IgA Treponema メサンギウム細胞

研究開始当初の背景

長期にわたる高カロリー食の過剰摂取は2型糖尿病を代表とするメタボリックシンドロームを惹起する。日本においても糖尿病が疑われる成人の推計が1000万人を超えたことが2016年の厚生労働省の調査より判明しさらに増加傾向にある。糖尿病の合併症で特に問題となるのが糖尿病性腎症であるが、糖尿病性腎症においてもIgA腎症同様に血清中のIgAは増加し少なくとも40%はIgA腎症を発症しているとの報告がなされている()。IgA腎症はアジアにおいて最も多い慢性糸球体腎炎として知られ、その特徴はタンパク尿やメサンギウム領域にIgAおよび補体を含む免疫複合体のメサンギウム細胞のCD89/FcRへの沈着が認められることである。

成人の慢性疾患において、糖尿病よりも罹患率の高いのが歯周病である。IgA腎症の治療において扁桃の切除がステロイド投与の併用療法として効果を上げているが、IgA腎症患者の扁桃から予後と関連する細菌として*Treponema sp.*、*Campyrobacter. rectus*や*Porphyromonas. Gingivalis*など歯周病菌が検出されている()。また、IgA腎症と歯周炎については歯周ポケットの細菌叢の違いなどが関連しているとの報告がある。よって、近年IgA腎症の細菌が有力な誘因として浮上してきている。

研究の目的

糖尿病性腎症の多くはIgA腎症の可能性が85%以上はあるとの報告がある。近年、B細胞がIgAを産生する組織である扁桃の切除が治療として有効であることから、細菌誘導説が病因として有力になっており、扁桃に生息する細菌において歯周病菌のみが予後との関連性があることが報告された。歯周炎は糖尿病の合併症の一つであり、歯周炎において増殖した歯周病菌が扁桃に生息しIgA産生を刺激することが糖尿病におけるIgA腎症に繋がると考えられる。しかし、歯周病菌が誘導するIgA腎症を伴う糖尿病性腎症を解明するための動物モデルの報告はない。そこで本研究では、歯周病菌感染による歯周炎を糖尿病マウスに惹起することでIgA腎症を発症させモデルマウスを作製しその病態を探る。特に、糖尿病や歯周病菌の刺激がB細胞に作用しIgAの糖鎖異常を起こすメカニズムを、2型糖尿病マウスやTLRシグナルブロックアウトマウスを用いることで調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 歯周病菌感染を伴う実験的歯周炎誘発による糖尿病マウスのIgA腎症の発症臨床研究にて予後との関連が見つかった*Treponema. denticola*により糖尿病マウスにてIgA腎症が誘導されるか確かめるため以下の方法にて検討を行った。

C57BL/6マウスを正常食餌または高脂肪食にて2か月間飼育し2型糖尿病を発症させる。その後予め皮下注射により*T. denticola*感染させ1週間飼育する。そして、上顎第1臼歯のワイヤー結紮により実験的歯周炎を誘導し()、同時に*T. denticola*を口腔内より投与した。そして、これらのマウスを用い以下の解析を行った。

尿中および血清中のアルブミン、IgG、IgA濃度をウェスタンブロットにて検出した。

腎臓をPAS染色もしくは免疫組織化学的にIgA染色を行った。

マウスでは扁桃に相当するのは鼻腔の NALT 部位であるので培養を行い、培養液中への IgA を検出した。

脾臓 B リンパ球の COMC 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検出した。

歯周炎の進行を調べるため歯槽骨吸収測定した。

(2) IgA 腎症における歯周病菌刺激のシグナル分子の影響

それらの受容体 TLRs の下流シグナルである Tpl2 のノックアウトマウスを用い高脂肪食にて 2 か月飼育することで 2 型糖尿病マウスを作製する。そして、上記の実験を行い上記の解析を行った。

(3) Tpl2 ko マウスのメサンギウム細胞の反応性

野生型マウスおよび Tpl2 のノックアウトマウスからステンレスメッシュを用い腎系球体を単離し他後培養を行い、アウトグロースした細胞がメサンギウム細胞であるので、この細胞を実験に供した。採取した血清を用いメサンギウム細胞を刺激し、炎症性サイトカイン類 mRNA の発現を real time RT-PCR 法にて検出した。

4 研究成果

(1) 歯周病菌感染を伴った実験的歯周炎誘発による糖尿病マウスの IgA 腎症の発症

C57BL/6 マウスに 4 週間 10%ラードを含む高脂肪餌にて飼育を行った後、尿を採取し標準曲線を得るためコントロールのマウスアルブミンと同時にウェスタンブロットによりアルブミンを検出した。その結果、統計的有意に尿中のアルブミン濃度は上昇した。しかし、尿中の IgG と IgA は通常の低脂肪餌に比べわずかな上昇は認められたが、統計的有意差は認められなかった。

続いて *T. denticola* を投与し、ワイヤーにて実験的歯周炎の誘導を行った。低脂肪餌を与えたマウスに *T. denticola* を投与し歯周炎を誘導しても尿中の IgG と IgA およびアルブミンは増加しなかったが、高脂肪餌にて糖尿病を発症したマウスは尿中の IgG と IgA およびアルブミン濃度に増加が認められ、コントロールのマウスに比べ IgG と IgA は約 3 倍の上昇を認めた。しかし、血液中の IgG と IgA およびアルブミン濃度には、高脂肪餌と低脂肪餌を与えたマウスでは差がなく、また *T. denticola* を投与したマウスとしていないマウスにおいても、差が認められなかった。

これらのマウスから腎臓を採取しパラフィン切片を作製し多糖類の染色のため PAS 染色を行った。糖尿病マウスに *T. denticola* を投与した場合、メサンギウム領域の染色が拡大していることが判明したが、それ以外のマウスにおいて顕著な広がりには確認できなかった。さらに、これらのパラフィン切片に抗マウス IgA 抗体を用いて染色を行ったところ糖尿病マウスに *T. denticola* を投与したマウスのみメサンギウム領域に IgA の沈着が認められた。

NALT 培養実験においてはどのマウスから得られた NALT においても IgA の分泌量には差が得られなかった。

高脂肪餌や *T. denticola* を投与したマウスから脾臓を採取し、total RNA を単離した後、real time RT-PCR にて COMC 発現の上昇を検討した。その結果、高脂肪餌による COMC 発現の上昇は認められたが *T. denticola* を投与したことによる上昇は認め

られなかった。

最後にワイヤーによる歯周炎誘導による歯槽骨の吸収の差を調べたが、高脂肪餌と *T. denticola* を投与による吸収の増加は認められなかった。

2. IgA 腎症における歯周病菌刺激のシグナル分子の影響

以上の研究結果を踏まえ、歯周病菌刺激のシグナル分子である Tpl2 をノックアウトしたマウス (Tpl2 ko) に野生型 (C57BL/6) マウスと同様の処置を行い、上記の解析を行った。その結果、Tpl2 ko マウスにおいても尿中のアルブミン濃度は上昇した。

続いて *T. denticola* を投与し、ワイヤーにて実験的歯周炎の誘導を行った。高脂肪餌にて糖尿病を発症した野生型マウスは尿中の IgG と IgA およびアルブミン濃度が増加が認められたが、*Tpl2 ko* マウスは認められなかった。また、血液中の IgG と IgA およびアルブミン濃度には、高脂肪餌と低脂肪餌を与えたマウスも *T. denticola* を投与したマウスとしていないマウスにおいても差が認められない結果は同じであった。

腎臓の PAS 染色では、糖尿病マウスに *T. denticola* を投与した場合メサンギウム領域の染色が拡大していることは *Tpl2 ko* マウスでは認められなかった。さらに、糖尿病マウスに *T. denticola* を投与した野生型マウスで認められたメサンギウムの IgA 沈着は認められなかった。

ワイヤーによる歯周炎誘導による歯槽骨の吸収を調べたが、以前の報告と同様に Tpl2 ko マウスでは歯槽骨の吸収は抑制されていた ()。

3. Tpl2 ko マウスのメサンギウム細胞の反応性

野生型マウスおよび Tpl2 ko マウスより腎系球体を採取し、アウトグロースにてメサンギウム細胞を培養した。これらの細胞を様々な炎症性サイトカイン、LPS および前の実験で得られたマウス血清を加えた。

その結果、LPS 刺激や炎症性サイトカインである TNF- α 刺激において *Rantes* mRNA の発現が野生型の 2 倍以上に Tpl2 ko マウスのメサンギウム細胞反応性は上昇した。しかし、IL-1 β や IL-6 では発現上昇は認められなかった。さらに高脂肪餌および *T. denticola* を投与したマウスから得られた血清では *Rantes* mRNA の発現が 1.5 倍上昇した。

結論

高脂肪餌にて発症した二型糖尿病マウスにおいてはアルブミンが高濃度に尿中に検出されるが IgA, IgG 濃度の上昇は観察されなかった。しかし、*T. denticola* 投与を伴う実験的歯周炎誘導により尿中 IgA, IgG 濃度の上昇が認められた。そして、このマウスは IgA 沈着とメサンギウム領域拡大が腎系球体に観察され IgA 腎症が誘発されたことが予想された。また、この現象は Tpl2 ko マウスにおいては認められなかった。

参考文献

- () Yasuyuki Nagasawa , Kenichiro Iio, Shinji Fukuda, Yasuhiro Date, Hirotugu Iwatani et.al , Periodontal disease bacteria specific to tonsil in IgA nephropathy patients predicts the remission by the treatment. PLoS One, 2014 Jan 28;9(1):e81636.2014
- () Masao Kanauchi, Takahiro Kawano, Kazuhiro Dohi, Serum IgA levels in patients with diabetic nephropathy and IgA nephropathy superimposed on diabetes mellitus, Diabetes Res Clin Pract, 2000 May;48(2):113-118.
- () Tomokazu Ohnishi , Aya Okamoto, Kyoko Kakimoto, Kenjiro Bandow, Norika Chiba, Tetsuya Matsuguchi. Involvement of Cot/Tp12 in bone loss during periodontitis. J Dent Res. 2010 Feb;89(2):192-197.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomokazu Ohnishi, Mitsuhiro Hisadome, Kusuyama Joji, Norika Chiba, Muhammad Subhan Amir, Takuro Kanekura, Tetsuya Matsuguchi	4. 巻 122
2. 論文標題 Ultraviolet B irradiation decreases CXCL10 expression in keratinocytes through endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 1141-1156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.29936	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 Muhammad Subhan Amir, Norika Chiba, Chang Hwan Seong, Joji Kusuyama, Nahoko Eiraku, Tomokazu Ohnishi, Norifumi Nakamura, Tetsuya Matsuguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 HIF-1 plays an essential role in BMP9-mediated osteoblast differentiation through the induction of a glycolytic enzyme, PDK1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cell Physiol	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） 10.1002/jcp.30752	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 Seong CH, Chiba N, Kusuyama J, Subhan Amir M, Eiraku N, Yamashita S, Ohnishi T, Nakamura N, Matsuguchi T.	4. 巻 595
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) directly induces Notch effector molecule Hes1 through the SMAD signaling pathway in osteoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 389-403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14016	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 Ohnishi T, Kusuyama J, Bandow K, Matsuguchi T.	4. 巻 477
2. 論文標題 Glut1 expression is increased by p53 reduction to switch metabolism to glycolysis during osteoblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem J.	6. 最初と最後の頁 1795-1811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20190888	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大西智和、久留光博、金蔵拓郎、松口徹也
2. 発表標題 UVB irradiation reduces CXCL10 expression in human keratinocytes via ER stress
3. 学会等名 第35回表皮細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西智和、成昌典、千葉紀香、松口徹也
2. 発表標題 All-trans retinoic acid induces Hes1-mediated downregulation of Tnfrsf11b mRNA expression in osteoblasts
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西智和、千葉紀香、松口徹也
2. 発表標題 歯周炎による歯肉上皮系細胞のTransmembrane serine protease 2(TMPRSS2)発現上昇
3. 学会等名 第2回南九州歯学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------