

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月27日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592655

研究課題名（和文）歯周病原菌由来 LPS によるアディポカイン誘導と TLR シグナル伝達解析

研究課題名（英文）Adipokine induction and TLR related signal transduction by periodontal pathogenic LPS

研究代表者

古堅 麗子 (FURUGEN REIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90253674

研究成果の概要（和文）：

我々は、すでに疫学調査において、高血清レジスチンレベルと歯周病が関連することを報告している。そこで、そのメカニズムを解明するため、レジスチンが産生される源がどこにあるのか探究することにした。本研究では、単球や単球系細胞において、歯周病原菌由来 LPS および大腸菌由来 LPS による刺激後、わずかではあるがレジスチン産生レベルの上昇を認めた。また、健常人から得た血液より単球と好中球を分離し、各々 LPS により刺激したところ、好中球においてより高いレジスチンレベルを認めた。歯周病原菌由来 LPS によりレジスチン産生を認めたことは、歯周病による炎症が肥満およびメタボリックシンドロームへの関与する可能性を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

In the epidemiologic survey, we have shown that higher serum resistin levels are associated with periodontitis. Therefore, we decided to investigate where the source of resistin. In this study, both of *P.g* LPS and *E.coli* LPS tended to enhance resistin expression in THP-1 and U937 macrophage-like cells. Resistin expression increased in primary monocyte and macrophage-like cells when stimulated by *E.coli* LPS or *P.g* LPS. Increased resistin in several inflammatory cells stimulated by periodontal pathogenic LPS may play important roles in systemic disease such as obesity, type2 diabetes and cardiovascular disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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・社会系歯学

キーワード：アディポカイン、歯周病、LPS、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

歯周病が全身に及ぼす影響について、疫学調査においてメタボリックシンドロームと関連する項目数が多いほど歯周病のリスクが高いことが明らかとなっている (Saito T, *et al.* *New Engl J Med*, 1998. *J Dent Res* 2004. *J Periodontol*, 2004)。脂肪細胞は、TNF- α 、IL-6、アディポネクチン、レジスチン、レプチンなどのアディポカインを産生し、炎症や免疫反応とも関連していることが報告されている。当教室での疫学調査により歯周病と各種サイトカインレベルとの関連を解析した結果、アディポネクチンレベルは低い傾向があり、レジスチンレベルは有意に高かった (Saitoh T, *et al.* *J Dent Res*, 2008. Furugen R, *et al.* *J Periodontal Res*, 2008)。歯周病原細菌由来 LPS が引き起こす炎症は、TNF- α や IL-6 など様々なサイトカインの関与が報告され、歯周病治療によりこれらのサイトカイン産生が減少することが既に報告されているが、アディポカインとサイトカイン産生の相互作用に関する報告はほとんどない。

一方 LPS は、ごく微量で脂肪組織や肝臓における脂質代謝に影響を及ぼすことが報告されており (Feingold KR, *J Lipid Res*, 1992)、2007年にはLPSがマウスの肝臓や脂肪組織への脂肪沈着と体重増加を引き起こすことが報告されている (Cani PD *et al.*, *Diabetes*, 2007)。歯周病におけるマクロファージの遊走、さらに細菌由来 LPS による刺激などの影響によりレジスチンレベルが上昇し、その結果、全身の糖代謝および心血管疾患にも影響

を及ぼしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

歯周病は歯周病原細菌による炎症性疾患であり、各種サイトカインや破骨細胞の活性化など宿主の免疫応答について解明されてきた。一方歯周病は、糖尿病や虚血性心疾患などの全身疾患との関連が報告されているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。本研究では、歯周病が全身疾患に影響しているとする仮説 (*Periodontol* 2000 2007:43:254-66 Review) および肥満に関連した数々の代謝異常と歯周病が相互に影響を及ぼしあっているとの視点を検証するためのモデルとして、マクロファージ系細胞、単球、好中球にて、歯周病原因子による刺激によりレジスチンなどのアディポカインが産生されるのか、またそのメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト単球系細胞 (THP-1、U937) および薬剤にてマクロファージに分化させた細胞、健康ボランティアから供与された血液より分離した単球および好中球において、各種濃度 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS と大腸菌由来 LPS を様々な培養時間で培養後、得られた培養上清の TNF- α 、アディポネクチン、レジスチン産生量を ELISA 法により測定し、比較検討した。

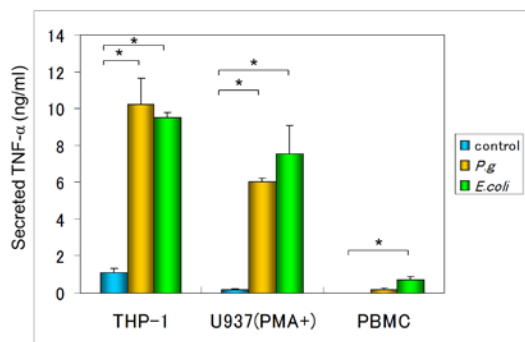
(2) 使用した各々の条件下の細胞より、Trizol reagent により RNA を抽出し、total cellular RNA から cDNA を合成後 Real-time

PCR で mRNA を分離精製し、TNF- α 、アディポネクチン、レジスチン mRNA 量を定量する。

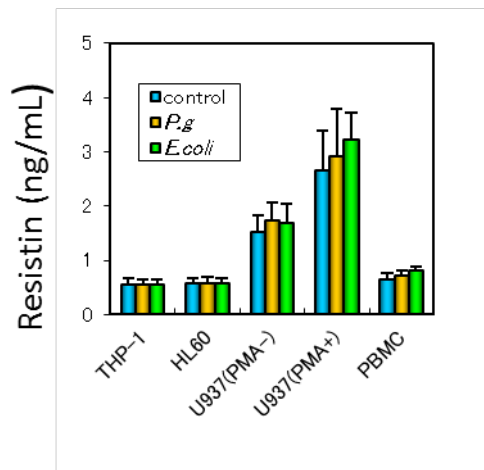
(3) 各々の細胞培養系で TLR 2, TLR 4 および JNK や MAPK の抗体作用後に LPS を添加し、各種サイトカイン・アディポカイン産生および mRNA レベルでの発現量を抗体未使用時と比較した。

4. 研究成果

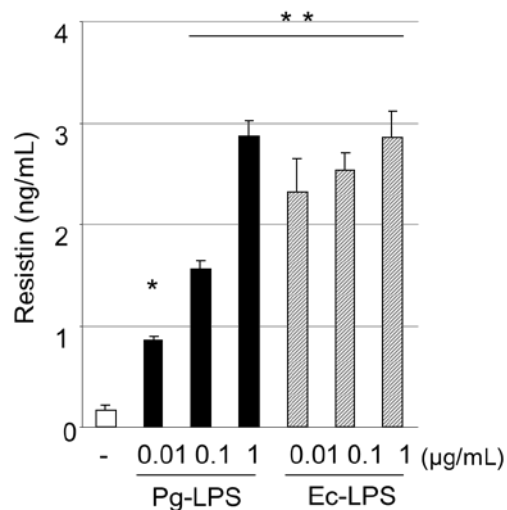
(1) 単球系細胞株である THP-1, マクロファージ化した U937, 末梢血リンパ球 (PBMC) を各々 1×10^6 /mL でプレートに分け、*P. gingivalis* および *E. coli* 由来 LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) を加え、24 時間後の培養上清中の TNF- α レベルを ELISA にて測定し、TNF- α 量が上昇することを確認した。



(2) (1) と同条件下にて、レジスチン量を ELISA にて測定したところ、TNF- α と比較するとわずかではあるが上昇することが認められた。単球系細胞である U937 については、PMA にてマクロファージ化した細胞と比較すると、マクロファージ化した細胞で、より高いレジスチンレベルを認め、mRNA レベルでも同様の結果を示した。



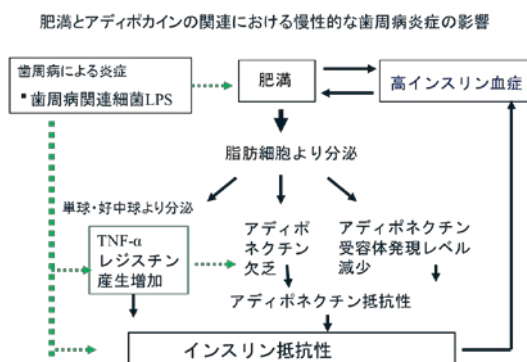
(3) 好中球において、単球より高いレジスチンレベルを認めたため、以後好中球にて解析を行った。Ec-LPS では、Pg-LPS より低い濃度でレジスチンレベルの上昇を認めた。



(4) さらに、レジスチン産生に関するシグナル伝達経路を解析するため、TLR 2, TLR 4 および JNK や MAPK の抗体作用後に LPS を添加し比較した結果、好中球におけるレジスチン産生と CD14 および $\beta 2$ インテグリンとの関連が示唆された。好中球から放出される因子としてエラスターゼやラクトフェリン、MMP-9 などがすでに報告されているが、これらとの比較もすすめており、歯周病が肥満およびメタボリックシンドロームへの関与のメカニズムの一端を解明することにつなが

と考えられる。

(3) 連携研究者
なし



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Reiko Furugen, Hideaki Hayashida, Yumiko Yoshii, Toshiyuki Saito: Neutrophil-derived resistin release induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. 査読有、321, 2011、175-182

[学会発表] (計2件)

- ① 古堅麗子、林田秀明、齋藤俊行: 歯周病原細菌由来因子によるレジスチン産生機序、第60回日本口腔衛生学会、平成23年10月9日、日本大学松戸歯学部
- ② R.Furugen, H.Hayashida, and T Saito: Resistin expression by lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* in monocytic/macrophage-like cells. 88th General session & Exhibition of the IADR, 2010年7月16日、スペインバルセロナ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古堅 麗子 (FURUGEN REIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：90253674

(2) 研究分担者

齋藤 俊行 (SAITO TOSHIYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：10170515

林田 秀明 (HAYASHIDA HIDEAKI)
長崎大学・病院・講師
研究者番号：20238140