

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659487

研究課題名（和文）3次元培養システムを用いた歯周病とメタボリックシンドローム関連メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the periodontosis using a three-dimensional cultivation system, and a metabolic syndrome related mechanism

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

歯周病は、歯周病原細菌感染による炎症であるが、その病態には各種サイトカインや破骨細胞の活性化も含めた宿主の免疫応答の関与が明らかにされてきた。一方、歯周病は歯周組織局所での炎症および破壊にとどまらず、糖尿病や動脈硬化症、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、そのメカニズムについては未だ明らかでない。本研究では、歯周病が肝臓における糖代謝や脂質代謝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種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から、これを検証するためのモデルとして3次元培養システムを用い、*in vitro* でそのメカニズムを詳細に解析することを目的とした。その結果、歯周病原細菌由来 LPS による刺激で脂肪細胞・マクロファージ系細胞から産生される種々のサイトカイン、アディポカインのうち、レジスチンとアディポネクチンの産生は、LPS による悪影響を受けることが分かった。これらの現象は歯周病が全身へ及ぼす影響におけるメカニズムのひとつである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Periodontal disease is local inflammation caused by periodontal pathogens and an association with immuno-response including various cytokines and activation of osteoclast has been clarified. On the other hand, it is reported that periodontal disease is associated with diabetes, arteriosclerosis, and cardiovascular disease, beyond periodontal inflammation and destruction, however, its mechanism has not been clarified well. In this study we hypothesized that periodontal disease has bad effects on glucose and lipid metabolism in the liver (*Periodontol* 2000 2007:43:254-66 Review). From a point of view that periodontal disease and various metabolic disorders affect each other, in order to clarify this, we examined it using 3 dimensional culture system *in vitro*. As a result, stimulation by LPS derived from periodontal pathogens has bad effects on release of resistin and adiponectin from adipocyte and macrophages. These phenomena were suggested to be one of mechanisms that periodontal disease influence systemic disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	0	900,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,000,000	360,000	3,360,000

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：サイトカイン、レジスチン、歯周病、3次元培養

1. 研究開始当初の背景

肥満やメタボリックシンドロームは、2型糖尿病、高脂血症、高血圧、動脈硬化、心血管疾患、脳血管疾患など一連の疾患の重要なリスクファクターである。特に2型糖尿病は、日本において急速に増加しており、肥満は2型糖尿病に直結していることが明らかにされている。一方、肥満と歯周病との関連については、高血圧症の肥満ラットは正常ラットに比べ、歯周組織の破壊が進行していることが報告されたのが、最初である(Perlstein MI, *et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol*,1977)。ヒトについては、日本人の肥満者では痩せた者に比べて歯周病罹患率が多いことを、我々が初めて報告した(*N Engl J Med* 339:482-3,1998)。また、肥満には2つのタイプがあるが、内臓脂肪の蓄積と関わりのある上半身型肥満では、肝脂肪変性を引き起こす内臓脂肪の蓄積が歯周疾患に関連していること(*J Dent Res* 80:1631-6,2001)さらに脂肪肝変性を示す血液検査の結果が歯周病と非常に強く関連していたことから、歯周病が肝臓に及ぼす影響が示唆されている。

脂肪細胞は、TNF- α 、IL-6などのサイトカインやアディポカインと総称されるアディポネクチン、レジスチン、レプチン、ビスファチンなどを産生し、炎症とも関連している

ことが報告されている。

また、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しうるということが報告されている(Feingold KR, *J Lipid Res*33:1765-1776, 1992)。

2. 研究の目的

様々な臓器や歯周組織においてLPSが引き起こす障害は、TNF- α が仲介しているといわれている(Gemmell E, *Periodontol* 2000 14:112-143,1997)。これらのことより、TNF- α だけでなくIL-6などの様々なサイトカインの関与が予想される。また、LPSはマクロファージを強力に活性化することより、マクロファージを泡沫細胞化することが予想されている。本研究では、脂肪細胞・マクロファージ系細胞を単独、共培養、および3次元プレートにて培養し、*P.gingivalis* および *E.coli* 由来LPSを用いて刺激を与え、LPSの濃度や種類の違いによるTNF- α 、アディポネクチン、レジスチン、レプチン等の産生量の変化を調べ、歯周病の炎症が脂質代謝にどのような影響があるのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス細胞株 (3T3-L1 細胞) を DEX, insulin, IBMX 添加の下、8-10 日間培養し、Oil red 染色にて脂肪細胞への分化を確認した。脂肪細胞に分化した 3T3-L1 細胞、マクロファージ系細胞(Raw 細胞)に各種濃度の *P. gingivalis* および *E. coli* 由来 LPS を添加し、培養上清中の各種サイトカイン (TNF- α , IL-6, MCP-1)、アディポカイン (アディポネクチン、レジスチン、レプチン) 産生量を ELISA にて測定した。

(2)(1)で使用した各々の条件下の細胞から 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、レプチン mRNA 量を定量した。

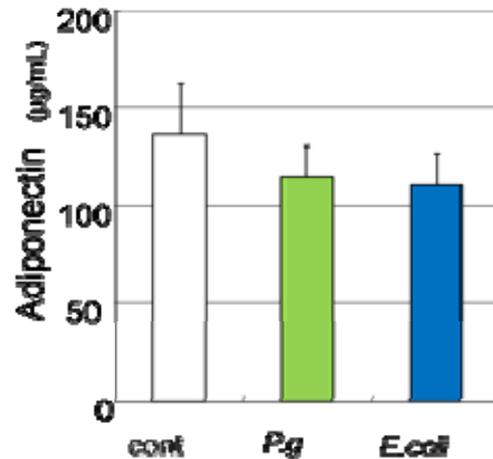
(3) マウス脂肪細胞 (3T3-L1 細胞)・マウスマクロファージ系細胞 (Raw 細胞) を共培養プレートで培養し、各種濃度の *P. gingivalis* および *E. coli* 由来 LPS 添加後の培養上清中の各種サイトカイン (TNF- α , IL-6, MCP-1)、アディポカイン (アディポネクチン、レジスチン、レプチン) の産生量を ELISA にて測定した。

(5) 同様の実験を 3 次元プレートで行い、通常の培養時と比較した。

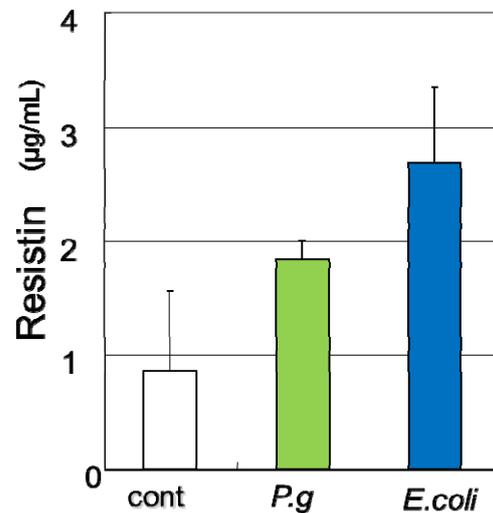
4. 研究成果

(1) 脂肪細胞に分化させた 3T3L1 細胞 (1×10^6 /mL) に *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アディポネクチン量を ELISA にて測定した。LPS の添加により、アディポネクチン量は減少したが、*P.*

gingivalis と *E. coli* LPS の TLR receptor の違いによる差は認めなかった。

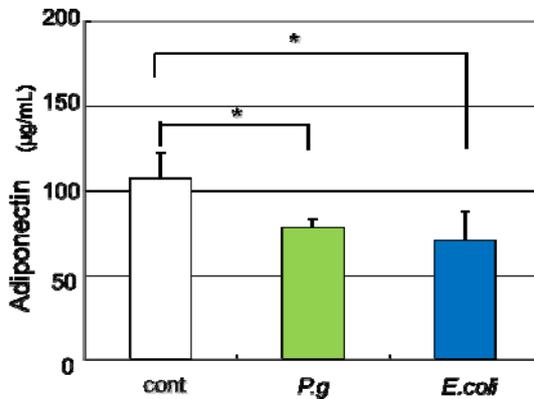


(2)(1)と同様に、ELISA にてレジスチン産生を測定したところ、LPS 添加によりレジスチン産生量が上昇した。*P. gingivalis* と *E. coli* 由来 LPS を比較すると、*E. coli* 由来 LPS で、レジスチン産生量の著名な上昇を認めた。



(3) 脂肪細胞に分化させた 3T3L1 細胞とマクロファージ系細胞である RAW 細胞を共培養プレート(transwellsystem)にて培養し、アデ

イボネクチン量を ELISA にて測定したところ、単独培養時と同様に LPS の添加により、アディポネクチン量は減少した。

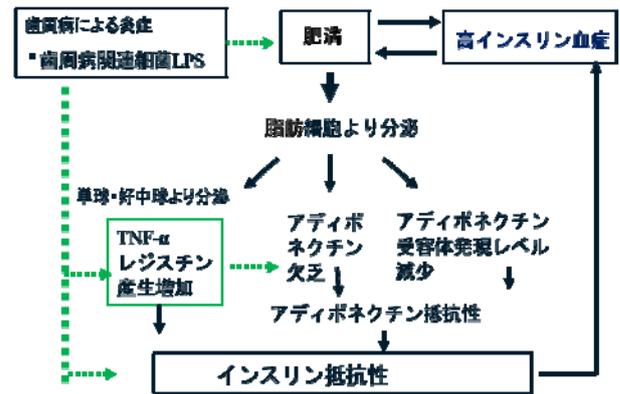


(4)共培養においては LPS 刺激によりレジスチン産生が減少したが、3次元培養システムにおける共培養ではレジスチン産生は増加した。一方、IL-6は、共培養においては著名に上昇したが、3次元培養では上昇はするもののその程度が低く、3次元での培養では、接着因子も含めた異なる機序が関わることが推測された。

まとめ

歯周病原菌由来 LPS により、脂肪細胞単独およびマクロファージ系細胞との共培養でアディポネクチン産生量が減少したことは、歯周病により抗炎症性アディポカインであるアディポネクチンを減らす可能性を示唆するものであった。また脂肪細胞からのレジスチン産生量が増加したことも併せて、歯周病が全身へ悪影響を及ぼすメカニズムのひとつである可能性が示唆された。さらに3次元培養では、接着因子も含めた異なる機序が関わることが推測された。

肥満とアディポカインの関連における慢性的な歯周病炎症の影響



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1件)

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

〔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、日本大学神戸歯学部
- 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

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

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし