

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17205

研究課題名（和文）歯周疾患に起因する糖尿病性腎症の発症機構と糖尿病増悪連鎖の予防医学的研究

研究課題名（英文）Preventive study on the pathogenic mechanism of diabetic nephropathy caused by periodontal disease and the cycle of diabetic exacerbation

研究代表者

梶原 弘一郎 (Kajiwara, Koichiro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：80803915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：歯周疾患を持つ糖尿病患者は歯周疾患でない糖尿病患者より腎症に移行する割合が高いことが知られていますが、その仕組みは未解明です。この研究では、糸球体血管が、糖尿病になると免疫分子TLRを発現して、血液中の細菌成分に過剰反応することで腎臓を硬くする可能性を追求しました。本研究は、血中に入った歯周病原物質P.gingivalis LPSが構造の複雑な糸球体から排除できず、糖尿病環境で発現するようになったTLRを活性化して、炎症を促進する様々な物質（白血球接着因子、生理活性物質など）を発現し、糖代謝異常を引き起こすことがわかりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は、口腔衛生状態に気をつけ、歯磨きをすること、もし歯周病があれば早期に治療することで腎症に移行することを予防できる可能性が、マウスを用いた動物実験で示すことができた。糖尿病性腎症の起こる仕組みは多様で、一概に言うことは出来ないが、少しでも糖尿病による透析患者人口を減らすことに貢献できるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：It is known that diabetic patients with periodontitis are more likely to develop nephropathy than patients without periodontitis, but the mechanism is unknown. In this study, we explored the possibility that glomerular blood vessels express the immune molecule TLR in diabetes and overreact to bacterial components in the blood, making the glomerulosclerosis. All bacteria in the digestive tract are killed in the liver, but bacteria in the oral cavity go directly into the kidneys. The present study aims to examine the renal SGLT2 induction by the TLR2/4 ligand Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in mouse diabetic nephropathy.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：糖尿病性腎症 P.gingivalis lipopolysaccharide toll-like receptor SGLT2 口腔衛生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平成 30 年厚生労働省国民健康・栄養調査における糖尿病・その疑いの総数は 2000 万人に上る。糖尿病の 40% に合併する糖尿病性腎症の患者は、歯周疾患有病率が非腎症糖尿病患者より有意に多く、重度歯周疾患を有する糖尿病患者は歯周疾患をもたない患者と比べて腎症を合併する危険性が 2-3 倍高い。糖尿病性腎症の病態像は糸球体硬化であるが発症機構は未解決である。申請者の研究グループは 1・II 型糖尿病性腎症の糸球体毛細血管が toll-like receptor (TLR)2 と TLR4 を発現することを初めて報告した。TLR は主に貪食細胞が発現する自然免疫受容体で、TLR2 はグラム陽性菌、TLR4 はグラム陰性菌の lipopolysaccharide (LPS)などを認識して TLR 発現細胞にサイトカイン産生を誘導する。健常な一般組織血管、また糖尿病の腎でも糸球体以外の腎血管に発現は見られない。ところが、TLR2 優位の TLR2/4 リガンドである歯周病原細菌 *Porphyromonas (P.) gingivalis* 由来 LPS を頬粘膜に定期的に微量投与した糖尿病マウスでは、同様に投与した健常マウスの全生存期間内に、全マウスが糸球体硬化による腎症で humane endpoint に達した。さらに本研究のためエーザイ USA から供試された TLR4 阻害剤エリトランと *P. gingivalis* LPS を同時投与した糖尿病マウスは腎症の劇的な予防効果が見られた (Eritoran, 83142-1:2013-0162:Eritoran/E5564, Eisai Inc. USA.)。腎症マウスの便と解剖所見から大腸炎を確認、腎の腸内細菌 *Escherichia (E.) coli* LPS と血中大腸菌抗体が検出され、*P. gingivalis* LPS による免疫攪乱が腸内細菌物質の崩壊と腎循環への侵入を惹起したと考えられた。*E. coli* LPS は強力な TLR4 リガンドである。福岡市の 10 の協力病院における調査では糖尿病性腎症の透析患者は重度の歯周疾患有病率がほぼ 100%で、フレイルや虚血性大腸炎・糖尿病性下痢症などの消化管症状の有病率も極めて高く、歯周疾患が糖尿病患者の腎症合併の独立危険因子、腸内環境が効果修飾因子として複雑系病因を構築することが明らかとなってきた。一方、sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2)阻害薬の腎症抑制効果が脚光を浴びている。近位尿細管で糖の再吸収を担う SGLT2 は糖尿病患者で発現が上昇するため、その阻害が腎症の進展を抑制するとされるが、糖尿病を悪化させる SGLT2 発現の増大がなぜ糖尿病患者に起こるのかはわかっていない。申請者らは疫学調査過程で、糖尿病性透析患者には SGLT2 阻害薬の無効患者があり、そのほとんどが重度歯周疾患有病者であることに気づいた。さらに動物実験で *P. gingivalis* LPS 誘導性糖尿病性腎症の病態が糸球体と尿細管間質に著名な白血球浸潤の見られる慢性炎症であること、通常は近位尿細管の内腔壁にわずかに見られる程度の SGLT2 の発現が *P. gingivalis* LPS 誘導性糖尿病性腎症マウスでは遠位尿細管や間質にまで強く起こることを見出した。重度の歯周疾患ではブラッシングで容易に菌血症が起こる。糖尿病環境で血中に入った *P. gingivalis* LPS は腎に辿り着き、構造の複雑な糸球体から排除できず TLR などの免疫系を活性化して腎症の引き金を引くことは容易に予想される。同時に糖尿病性フレイル環境で血中歯周病原細菌が腸内細菌に対する免疫を攪乱し、破壊された腸内細菌が腸肝循環から腎循環に入ると、強力な TLR4 リガンドである腸内細菌成分が共役し糸球体硬化症のみならず尿細管間質性炎を誘発して腎症を促進、慢性炎症性の SGLT2 過剰発現による糖尿病増悪の連鎖という全身性複雑系病因を形成すると予想した。

2 . 研究の目的

本研究は、歯周病原物質が糖尿病環境で腎症の独立危険因子のみならず SGLT2 過剰発現による糖尿病増悪因子となる可能性を解明することを目的とした。

3 . 研究の方法

1) マウス

Streptozotocin (STZ) を注射した膵島破壊型 I 型糖尿病 ICR マウス (STZ-ICR) を使用した。マウスに STZ (Sigma-Aldrich Japan) を 200 mg/kg 単回腹腔内注射し、マウスの血糖値を Glutest Sensor (Sanwa Kagaku Kenkyusyo) で週 2 回チェック、600mg/dl を超える血糖値を示したマウスを STZ 誘発糖尿病マウス (STZ-ICR) として使用した。以前の研究で健康な ICR の健康状態に影響を及ぼさないことを確認した 3mg/kg (LD50=30 mg/kg; Invigored) の Pg-LPS を頬粘膜下に週 1 回、4 か月間注射、Pg-LPS 投与健康マウス (LPS-ICR) を対照として、尿糖、尿タンパク、尿潜血を試薬ストリップ (Uriace、Terumo Corporation) でモニターし尾静脈血液の血中尿素窒素 (BUN) とクレアチニン (CRE) を分析した (Kyudo)。尿糖と尿タンパク質強陽性、同時に 40 mg/dl 以上の BUN と 0.7mg/dl 以上の CRE を示した場合、Pg-LPS 誘導性糖尿病性腎症マウス (LPS-STZ) とした (Kajiwara K, Takata S, To TT, Takara T, Hatakeyama Y, Tamaoki S, Darveau RP, Ishikawa H, Sawa Y. The promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via toll-like receptors. *Diabetol Metab Syndr*. 2017; 9:73.)。

2) 基礎解析

尿糖・タンパクをグルテストと検査紙でモニタリング、血液検査を外注(九動)、humane endpoint を含め糖尿病と腎症を判定する。腎症・予防群マウス生存率を Kaplan-Meier 法・ログランク検定で比較する。組織形態解析、タンパク・遺伝子の組織 RT-PCR・ELISA・WB により、STAT3-TLR2/4 活性化による炎症性因子発現、糸球体硬化症と尿細管間質性腎炎を評価、TLR 阻害剤の SGLT2 発現抑制と腎症予防効果を判定する

4 . 研究成果

本研究では、申請者らが確立した *P. gingivalis* 由来 LPS 誘発性糖尿病性腎症マウスにおける、ナトリウム-グルコース共輸送体 SGLT2 の発現を調べた。SGLT2 は、近位尿細管で原尿から糖の再吸収を担う。SGLT2 の発現は、通常、近位尿細管の内腔壁のみ弱く免疫染色される程度であるが、*P. gingivalis* LPS 誘発性糖尿病性腎症マウスでは近位・遠位尿細管と尿細管間質、および糸球体で観察された。組織リアルタイム PCR および細胞 ELISA による分析では、*P. gingivalis* LPS 誘発性糖尿病性腎症マウス腎における発現は *P. gingivalis* LPS 投与非糖尿病マウス腎または *P. gingivalis* LPS 未投与糖尿病マウス腎より有意に強かった。一方、*P. gingivalis* LPS 投与非糖尿病マウス腎と *P. gingivalis* LPS 未投与糖尿病マウス腎の間に有意差はなく、腎 SGLT2 の異常発現が糖尿病または LPS 単独では誘導されないことが示唆された。本研究は、歯周炎が糖尿病性腎症の独立危険因子であるばかりでなく、糖尿病の増悪因子である可能性を示唆していると考えた。

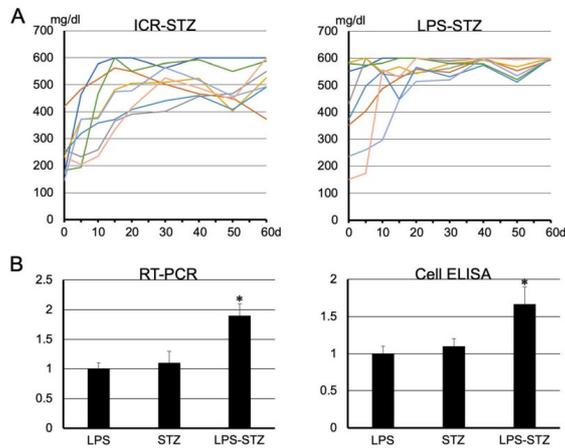


図 1. *P. gingivalis* 由来 LPS 投与および糖尿病マウスの血糖値、SGLT2 mRNA およびタンパク量 600 mg/dl (n = 8) に達するまでの平均時間は、STZ-ICR よりも LPS-STZ の方が短かった。SGLT2 の遺伝子発現量およびタンパク量は、LPS-ICR (LPS) および STZ-ICR (STZ) に比べて LPS-STZ で有意に多かった。

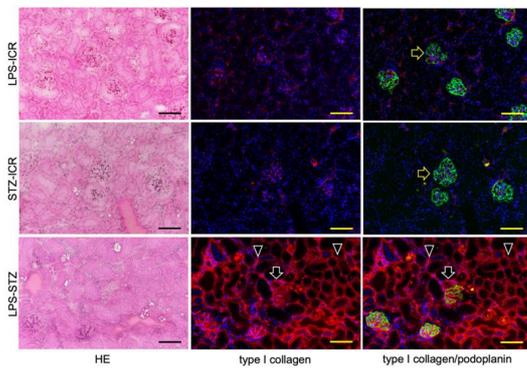


図 2. 型コラーゲンは、LPS-ICR (上段) および STZ-ICR (中段) では弱く同定されましたが、LPS-STZ (下段) では腎実質全体 (矢印) および糸球体 (矢印) で同定されました。

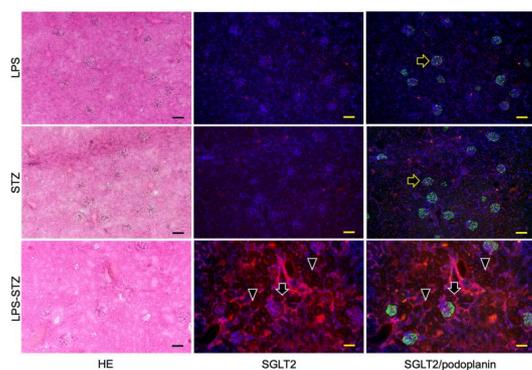


図 3. 抗 SGLT2 との反応は、LPS-ICR (上段) および STZ-ICR (中段) で弱く確認されました。LPS-STZ (下の列) の反応は、近位尿細管内腔 (矢印) と外壁 (矢印) の両方で確認されました。

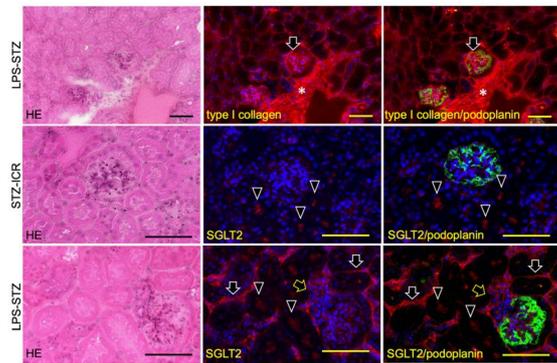


図 4. LPS-STZ (上の行)では、抗 I 型コラーゲンとの強い反応が尿細管の周囲、糸球体 (矢印)、および腎柱 (星印)で観察されました。STZ-ICR (中列)では、抗 SGLT2 に対する反応が近位尿細管内腔 (矢印)でのみ確認されました。LPS-STZ (下段)では、抗 SGLT2 との強い反応が腎近位尿細管の刷子縁側 (矢印) および尿細管の外壁 (矢印)で観察されました。糸球体に白血球浸潤のような細胞の蓄積が見られました (黄色の矢印)

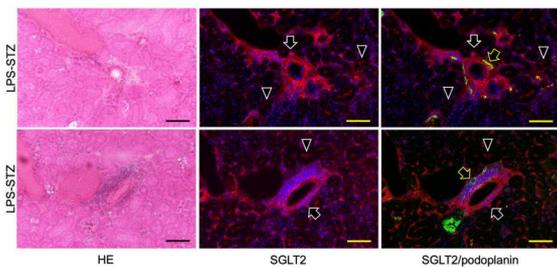


図 5. 血管周囲の免疫染色 (上段)では、近位尿細管外壁の血管側 (白矢印)と尿細管内腔 (矢印)に抗 SGLT2 反応が顕著に観察された。血管周囲にポドプラニン陽性マクローファージ様細胞 (黄色矢印)が観察された。血管の免疫染色 (下段)では、ポドプラニン陽性マクローファージ (黄色矢印)を含む白血球浸潤のような白血球の蓄積が認められる。抗 SGLT2 との多くの反応が、近位尿細管外壁の血管側 (白矢印) および尿細管内腔 (矢印)で観察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kajiwara K, Sawa Y, Fujita T, Tamaoki S.	4. 巻 22
2. 論文標題 Immunohistochemical study for the expression of leukocyte adhesion molecules, and FGF23 and ACE2 in <i>P. gingivalis</i> LPS-induced diabetic nephropathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrol.	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12882-020-02203-y	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梶原弘一郎、沢禎彦
2. 発表標題 <i>P. gingivalis</i> LPS が誘導する糖尿病性腎症モデルマウス腎における SGLT2の過剰発現についての研究
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Koichiro Kajiwara, Yoshihiko Sawa, Sachio Tamaoki.
2. 発表標題 Abnormal expression of SGLT2 in the kidney of a <i>P. gingivalis</i> LPS-induced diabetic nephropathy mouse model.
3. 学会等名 第69回国際歯科研究学会（JADR）日本部会総会・学術大会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶原弘一郎、沢禎彦、玉置幸雄
2. 発表標題 <i>P. gingivalis</i> LPS 誘導性糖尿病性腎症マウスにおける SGLT2の過剰発現について
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------