

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293425

研究課題名(和文)臓器固有細胞-浸潤炎症細胞間相互作用から捉える歯周医学の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis for periodontal medicine based on the interaction between infiltrated inflammatory cells and resident cells.

研究代表者

西村 英紀(NISHIMURA, FUSANORI)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80208222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：重度歯周炎によって惹起される生体の軽微な慢性炎症の成立機序の分子基盤を明らかにするため、浸潤マクロファージと組織固有細胞の相互作用を中心に解析を行い、以下の点を明らかにした。炎症脂肪組織のCCL19の高発現を確認した。主な発現細胞は脂肪細胞であった。CCL19受容体欠損マウスは高脂肪食負荷で肥満を呈さず、インスリン抵抗性を回避した。本マウスでは熱産生系が亢進しており、摂取エネルギーが熱エネルギーに効率的に変換されていると考えられた。一方、膵島におけるマクロファージと組織固有細胞の相互作用を検討した結果、活性化マクロファージ浸潤で細胞死が誘導される可能性があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular basis for the establishment of systemic low-grade inflammation caused by periodontal disease, close interaction between infiltrated macrophages and resident tissue cells was analyzed. Following results were obtained; i) inflammatory adipose tissue expressed chemokine ccl19, and the major source of ccl19 was enlarged adipocyte, 2) mice lacking ccl19 receptor were protected from diet-induced obesity and insulin resistance, 3) these mice were characterized by increased thermogenesis when compared with wild type control mice, 4) when the interaction between infiltrated macrophages and islet resident cells were analyzed, infiltration of endotoxin-activated macrophages up-regulated the expression of apoptosis inducing molecules.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周医学 軽微な慢性炎症 脂肪細胞 - マクロファージ相互作用 ケモカイン 脂肪炎症 膵島炎症 細胞死 内毒素

### 1. 研究開始当初の背景

重度歯周炎は、軽微な慢性炎症を生体に惹起し、それにより耐糖能をはじめとした種々の生体調節機能に影響を及ぼすことが明らかになっていった。しかしながら、局所の感染症として発症する歯周病による炎症反応が、いかなる機序で全身性に増幅されるのかについての分子基盤は不明なままであった。申請者らは、局所で活性化された単球・マクロファージ系の細胞が遠隔臓器に遊走し、標的臓器における resident 細胞との相互作用によって、炎症反応が増幅されるとの仮説のもと検討を進めてきた。とりわけ、歯周病はグラム陰性菌の感染で惹起されること、グラム陰性菌由来内毒素はマクロファージをはじめとした免疫細胞を強力に活性化すること、脂肪細胞はインスリンに応答しブドウ糖を取り込む代表的な細胞であるとともに、炎症性サイトカイン刺激で多種多様な生理活性物質（アディポカイン）を産生することが明らかになっていることから、脂肪細胞とマクロファージの相互作用に焦点を当て検討を進めることとした。

### 2. 研究の目的

歯周病による炎症反応が全身性に増幅される機序を脂肪細胞 - マクロファージ相互作用に求め、本相互作用によって高産生されるケモカインで炎症性細胞浸潤が影響を受けるか否かについて、遺伝子改変動物を用い明らかにすること、活性化単球が脂肪組織のみでなく脾臓へ浸潤すると想定し、軽微な炎症が脾臓細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 申請者がこれまでに蓄積した、脂肪細胞とマクロファージの共培養系に細菌内毒素を加えた場合に脂肪細胞で発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した、発現遺伝子解析データベースに基づき、発現変動の著しい細胞遊走に関わる遺伝子群に注目する。

(2) 本遊走関連遺伝子そのもの、あるいは受容体遺伝子の改変動物を用い、高脂肪食負荷状態における脂肪組織の炎症や耐糖能あるいはその他の代謝関連パラメータに及ぼす影響を明らかにする。

(3) 上記の結果を受け、内毒素刺激で高発現する分子の発現に至るまでの機序を明らかにし、その発現を抑制する物質の探索を行う。

(4) 探索した発現抑制分子の効果を *in vitro* ならびに *in vivo* の系で検証する。

(5) 脂肪細胞マクロファージ相互作用を検討したと類似の系で、脾臓細胞 - マクロファージ相互作用、ならびに脾臓細胞 - マクロファージ相互作用による炎症の増幅効果を検討し、いずれの細胞がより強く炎症の影響を受けるかどうか、その場合どのような影響が、いずれの経路を介して現れるか、病態との関

連性はどうかを明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 脂肪細胞 - マクロファージ相互作用で発現変動するケモカイン遺伝子の発現遺伝子解析

細菌内毒素の存在下でマクロファージと共存する脂肪細胞において発現変動するケモカイン遺伝子を網羅的に解析し、CXCL1、CXCL5、CXCL9、CXCL10、CCL2、CCL5、CCL7、CCL11、CCL19、CCL22 の遺伝子が内毒素刺激で高発現することを明らかにした。とりわけ、CCL19 遺伝子は内毒素刺激後 8 時間でベースライン時の 200 倍近い発現上昇を示すことを見出した。CCL19 は遺伝性肥満モデルマウス、食餌誘導性肥満モデルマウスのいずれにおいても血中濃度が上昇していること、内毒素刺激でマクロファージから産生される TNF- $\alpha$  と内毒素の共刺激でよりその産生が上昇することを明らかにした。

#### (2) CCL19 受容体欠損マウスを用いた検証

CCL19 は主として成熟樹状細胞の遊走に関わるケモカインであり、その受容体は CCR7 である。CCL19 欠損マウスや過剰発現マウスが存在しなかったため、CCR7 欠損マウスを用い、CCL19 が脂肪組織の炎症の誘導、肥満やインスリン抵抗性の病態に及ぼす影響を検討し、次の知見を得た。CCR7 欠損マウスは高脂肪食で飼育しても、食餌摂取量に影響は出ないにも関わらず WT マウスと比較して肥満が惹起されず、通常食で飼育した WT マウスや CCR7 欠損マウスと同程度の体重変動であった。この結果、脂肪組織重量や肝臓の肥大化が観察されず、脂肪細胞径は通常食飼育マウスと同程度で WT マウスのような脂肪細胞径の増大がないこと、また脂肪肝を回避できることを確認した。興味深いことに CCR7 遺伝子欠損マウスでは、炎症性細胞浸潤がほとんど観察されない一方で、高脂肪食負荷 WT マウスでは多数の CD11c 陽性細胞（成熟樹状細胞マーカー）が観察された。さらに、この現象に伴って CCR7 欠損マウスでは糖負荷試験やインスリン負荷試験で判定する耐糖能も正常に維持されており、血中インスリン、レプチン、総コレステロール、中性脂肪に加え、CCL19 濃度が低値（通常食マウスと同程度）であり、善玉アディポカインとして知られるアディポネクチンの血中濃度は逆に上昇していた。脂肪組織の遺伝子発現解析で、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子発現が通常食飼育マウスと同程度であること、CD11c 遺伝子発現が低いこと、などを確認した。類似の結果を肝臓における遺伝子発現解析でも確認した。CCR7 遺伝子欠損マウスが高脂肪食摂取で肥満を回避したことから、摂取エネルギーの代謝について検討した。CCR7 欠損マウスでは寒冷条件下にマウスを

移動しても直腸温が低下せず体温低下から回避することから、摂取エネルギーが熱エネルギーに変換され、それにより一部は肥満を回避しているものと推察された。同時に脂肪組織において、熱産生に関わる Ucp-1 や-2 の遺伝子発現が上昇していることを確認した。

### (3) CCL19 の発現を抑制する物質の探索

(1) ~ (2) における検討から、CCL19-CCR7 経路が肥満やそれによって惹起される脂肪組織の炎症に重要な役割を担っているとの仮説に基づき、内毒素刺激脂肪細胞 - マクロファージ共培養系において CCL19 発現を抑える物質を探索した。とりわけ、種々のフラボノールが抗炎症作用を発揮することが報告されていること、フラボノールを多く含有するダークココアの摂取で心血管リスクが抑えられるとの報告があることから、ココアフラボノールに注目した。その結果、ココアフラボノールの主成分であるエピカテキン (EC) が、内毒素刺激マクロファージと共存する脂肪細胞で発現が著しく上昇する CCL19 の遺伝子発現を著明に抑えることを見出した。CCL19 の他、EC は共培養系において、RANTES、TNF- $\alpha$ 、IL-6、LPS binding protein、TLR-2、serum amyloid A3、Suppressor of cytokine signal-3 などの遺伝子発現を抑えたが、CCL19 遺伝子発現に関してはその発現上昇を著しく抑制した。パスウェイ解析の結果、EC は内毒素刺激共培養系において、NF- $\kappa$ B 経路、およびレドックス経路に影響を及ぼすことが判明した。

### (4) EC の in vitro 効果の検証

EC が CCL19 発現を著明に抑制することからその機序を考察することとした。前項にあるようにパスウェイ解析の結果から NF- $\kappa$ B 経路に影響を及ぼすことが考えられたため、主として NF- $\kappa$ B の活性化の観点から EC の抗炎症効果を検討した。その結果 EC は、内毒素刺激マクロファージと共培養した脂肪細胞における NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するものの、脂肪細胞単独培養系で内毒素刺激を行い NF- $\kappa$ B の活性化を見ても EC の効果は観察されないこと、マクロファージ単独培養系で EC の効果を検証すると、内毒素刺激による NF- $\kappa$ B の活性化を抑えることから、EC の主な標的はマクロファージであると考えられた。申請者は、以前脂肪細胞とマクロファージを共培養し細菌内毒素で刺激すると脂肪細胞からの IL-6 の産生性が著明に上昇すること、そこに TNF- $\alpha$  産生が介在していることを確認している。そこで、CCL19 の代わりに IL-6 の産生で EC の効果を検証したところ、EC は共培養の系で IL-6 産生を抑えるものの、脂肪細胞を内毒素刺激した際の IL-6 産生には影響がないことを確認した。さらに、マクロファージからの TNF- $\alpha$  産生を

調べたところ、EC は内毒素刺激で上昇する TNF- $\alpha$  産生を著明に抑制することを確認した。

### (5) EC の in vivo 効果の検証

そこで、EC が in vivo で肥満や脂肪組織の炎症に及ぼす影響を検討するため、マウスモデルを用いた検討を行い、以下の知見を得た。

EC 含有高脂肪食飼育マウスは高脂肪食飼育マウスと比較して食餌摂取量に変化はないにも関わらず肥満を呈さず、インスリン負荷試験、糖負荷試験から耐糖能が正常であることが確認された。また、高脂肪食飼育で食餌摂取量に変化がないにもかかわらず肥満を呈さないことから、寒冷条件下における直腸温の変動を検討したところ、EC 含有高脂肪食摂取マウスでは直腸温の低下が観察されなかった。この結果は、前年の高脂肪食負荷 CCL19 欠損マウスにおける表現型と酷似したものであった。EC 含有高脂肪食負荷マウスでは、肝重量は高脂肪食負荷マウスと差はなかったものの、脂肪組織の重量が通常食負荷マウスと同程度であり、血中 CCL19 濃度は高脂肪食負荷マウスと比較して低値であり、アディポネクチン濃度は逆に高値であった。脂肪細胞径も EC 含有高脂肪食負荷マウスでは肥大化が抑えられており、CD11c 陽性細胞の浸潤は高脂肪食負荷マウスのみで確認された。つまり、EC の摂取は高脂肪食の摂取に伴う、脂肪組織の肥大化、炎症を抑え、その背景に熱エネルギー産生の増強が関わることが示唆された。肝臓や脂肪組織における遺伝子発現解析の結果から、EC 含有高脂肪食負荷マウスでは、高脂肪食負荷 CCR7 欠損マウス同様多くの炎症性サイトカイン遺伝子発現が抑えられていた。以上の一連の検証から、EC は少なくとも一部は CCL19-CCR7 経路を遮断することで、脂肪組織における炎症性細胞浸潤を抑制し、肥満やそれに伴って惹起されるインスリン抵抗性を回避することを明らかにした。

### (6) 臍細胞 - マクロファージ相互作用、臍細胞 - マクロファージ相互作用による臍島における炎症の増幅効果の検討

近年、成熟脂肪組織のみでなく臍島にもマクロファージ浸潤が観察されること、またそれに伴って臍島の機能異常が惹起される可能性があることが報告され注目されている。そこで、内毒素で活性化された単球系細胞が臍島に浸潤し、マクロファージ分化した後に resident の細胞と相互作用することで臍島の機能異常が惹起される可能性があるとの仮説を検証するために、脂肪細胞 - マクロファージ相互作用を検討したのと類似の実験系で臍等細胞とマクロファージの相互作用を検討した。特にヒト臍島では  $\alpha$  細胞と  $\beta$  細胞が大部分を占めるため、各々臍  $\alpha$  細胞とマクロファージの共培養系を内毒素刺激した際に  $\alpha$  細胞で発現変動する遺伝子群と内毒素非

存在下における $\alpha$ 細胞における発現遺伝子との比較、 $\beta$ 細胞とマクロファージの共培養系を内毒素刺激した際に $\beta$ 細胞で発現変動する遺伝子群と内毒素非存在下でマクロファージと共培養した $\beta$ 細胞における発現遺伝子をマイクロアレイの手法を用いて比較した。その結果、以下の知見を得た。類似の実験系で発現遺伝子解析を試みたところ、 $\beta$ 細胞に比較して $\alpha$ 細胞でより発現遺伝子の変動が観察されること、両細胞で変動する遺伝子群の多くが、インターフェロン誘導(関連)遺伝子群であること、マクロファージを内毒素刺激するとタイプ1のインターフェロン産生が誘導されること、 $\beta$ 細胞においてとりわけアポトーシスを促進する分子の遺伝子並びにタンパク発現の上昇が観察されることを確認した。つまり、軽微な慢性炎症で $\beta$ 細胞の細胞死が誘導される可能性があること、炎症はインスリン抵抗性のみでなくインスリン分泌機能にも影響を与え、結果的に2型糖尿病の成因に深く関与すること、その過程に重度歯周炎が関わる可能性があることを明らかにした。

#### 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 11件)

- 1) Sano T, Nagayasu S, Suzuki S, Iwashita M, Yamashita A, Shinjo T, Sanui T, Kushiyama A, Kanematsu T, Asano T, Nishimura F. Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 査読有 27(3): 249-259, 2017.  
doi: 10.1016/j.numecd.2016.11.008
- 2) Shinjo T, Iwashita M, Yamashita A, Sano T, Tsuruta M, Matsunaga H, Sanui T, Asano T, Nishimura F. IL-17A synergistically enhances TNF $\alpha$ -induced IL-6 and CCL20 production in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 477(2):241-6, 2016.  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.049
- 3) Okubo H, Kushiyama A, Sakoda H, Nakatsu Y, Iizuka M, Taki N, Fujishiro M, Fukushima T, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Asahara T, Yoshida Y, Chonan O, Encinas J, Asano T. Involvement of resistin-like molecule  $\beta$  in the development of methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep* 査読有 6:20157, 2016  
doi: 10.1038/srep20157
- 4) Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, Kushiyama A, Fujishiro M, Nishimura F, Asano T. High-fat diet feeding significantly attenuates anagliptin-induced regeneration of islets of

Langerhans in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetol Metab Syndr* 査読有 7:50, 2015

doi: 10.1186/s13098-015-0047-y

5) Sano T, Iwashita M, Nagayasu S, Yamashita A, Shinjo T, Hashikata A, Asano T, Kushiyama A, Ishimaru N, Takahama Y, Nishimura F. Obesity (Silver Spring) 査読有 23(7): 1460-1471.

6) Shinjo T, Nakatsu Y, Iwashita M, Sano T, Sakoda H, Ishihara H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Asano T. DPP-IV inhibitor anagliptin exerts anti-inflammatory effects on macrophages, adipocytes, and mouse livers by suppressing NF- $\kappa$ B activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 査読有 309(3): E214-223, 2015.

doi: 10.1152/ajpendo.00553

7) Okubo H, Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Matsunaga Y, Ohno H, Yoneda M, Kamata H, Shinjo T, Iwashita M, Nishimura F, Asano T. Mosapride citrate improves nonalcoholic steatohepatitis with increased fecal lactic acid bacteria and plasma glucagon-like peptide-1 level in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 査読有 308(2): G151-158.

doi: 10.1152/ajpgi.00198.2014

8) Hashikata A, Yamashita A, Suzuki S, Nagayasu S, Shinjo T, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nin K, Watanabe N, Asano T, Abiko Y, Kushiyama A, Nagasaka S, Nishimura F. The inflammation-lipocalin 2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 査読有 29(3): 611-618, 2014.

doi: 10.1093/ndt/gft449

9) Okubo H, Sakoda H, Kushiyama A, Fujishiro M, Nakatsu Y, Fukushima T, Matsunaga Y, Kamata H, Asahara T, Yoshida Y, Chonan O, Iwashita M, Nishimura F, Asano T. Lactobacillus casei strain Shirota protects against nonalcoholic steatohepatitis development in a rodent model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 査読有 305(12): G911-918, 2013.

doi: 10.1152/ajpgi.00225.2013

10) Zhang J, Nakatsu Y, Shinjo T, Guo Y, Sakoda H, Yamamotoya T, Otani Y, Okubo H, Kushiyama A, Fujishiro M, Fukushima T, Tsuchiya Y, Kamata H, Iwashita M, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Par14 protein associates with insulin receptor substrate 1 (IRS-1), thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *J Biol Chem* 査読有 288(28): 20692-20701, 2013.

doi: 10.1074/jbc.M113.485730

11) Kushiyama A, Sakoda H, Oue N, Okubo M,

Nakatsu Y, Ono H, Fukushima T, Kamata H, Nishimura F, Kikuchi T, Fujishiro M, Nishiyama K, Aburatani H, Kushiya S, Iizuka M, Taki N, Encinas J, Sentani K, Ogonuki N, Ogura A, Kawazu S, Yasui W, Higashi Y, Kurihara H, Katagiri H, Asano T. Resistin-like molecule  $\beta$  is abundantly expressed in foam cells and is involved in atherosclerosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 査読有 33(8): 1986-1993, 2013.  
doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301546.

〔学会発表〕**国際学会シンポジウムのみ**（計2件）

1) Nishimura F. CCL19-CCR7 signaling plays critical role in inducing obesity. Penn Periodontal Conference 2015, Philadelphia, PA, June 28-July 3, 2015.

2) Nishimura F. Novel pathway of periodontal inflammation mediated by adipocyte-macrophage interaction on accelerated metabolic disorder. In Symposium-Mechanisms that regulate local and systemic impact of periodontal inflammation. 92th General Session & Exhibition of the IADR, IADR Africa/Middle East Regional Meeting, June 26, 2014, Cape Town, South Africa.

〔産業財産権〕  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西村 英紀 (NISHIMURA, Fusanori)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号：80208222

### (2) 研究分担者

浅野 知一郎 (ASANO, Tomoichiro)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：70242063

### (3) 研究分担者

安孫子 宜光 (ABIKO, Yoshimitsu)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号：70050086

### (4) 研究分担者

大山 秀樹 (OHYAMA, Hideki)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90280685