

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462855

研究課題名(和文) 歯周病原細菌歯性感染による非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)病態増悪機構の解明

研究課題名(英文) Study on pathological progression mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis caused by odontogenic infection of periodontal pathogen

研究代表者

宮内 睦美(Miyauchi, Mutsumi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・准教授

研究者番号：50169265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は肝硬変や肝癌へと進行するが、未だ有効な治療法がなく、歯性感染とNASHの関係も不明である。本課題では、P.gingivalis (Pg) 歯性感染による炎症/線維化増悪機構を調べた。脂肪化でTLR2発現の増強した肝細胞と浸潤マクロファージのPg-LPS-TLR2経路の活性化が炎症増悪に関与した。一方、Pg感染肝細胞や肝星細胞から産生されるTGF β 1は、肝星細胞を活性化し、線維化を進行させた。NASH患者の肝組織でPg検出された症例は、ヒアルロン酸値(肝線維化マーカー)や線維化スコアが有意に高かった。歯科治療やPgの除菌はNASHの治療戦略の1つとなる。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) has the potential to progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Effective therapy has still not been established. In the present study, exacerbation mechanisms of inflammation and fibrosis caused by P.gingivalis (Pg)-odontogenic infection were examined. Upregulation of TLR2 in steatotic hepatocytes (HEP) and increase of macrophages possessing TLR2 played important roles in exacerbation of inflammation through activating TLR2 pathway by Pg-LPS. On the other hand, TGF β 1, which was produced by HEP/hepatic stellate cells (HSC) with Pg-infection, promoted liver fibrosis by activating HSC. Detection of Pg in liver from NASH patients were related with high serum level of hyaluronic acid (a serum maker for liver fibrosis) and advanced fibrosis. Therefore, preventing and/or eliminating P.g. infection by dental therapy may have a beneficial impact on management of NASH.

研究分野：口腔病理学

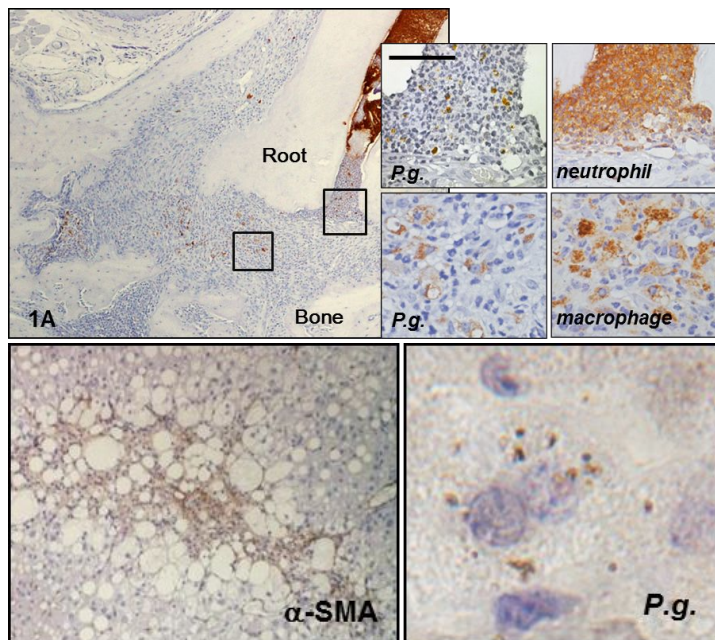
キーワード：歯性感染 Porphyromonas gingivalis Galectin-3 非アルコール性脂肪性肝炎 線維化 肝星細胞

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は代表的な慢性肝疾患で、肥満に関連する脂肪肝から発生する。本邦でも肥満に伴う脂肪肝の罹患率は 10~30% と高く、NASH の発生も年々増加している。NASH は軽度の炎症を伴う脂肪性肝炎から線維化を伴うものまで進行性の病態を示し、更には肝硬変や肝癌などの生命の危険を伴う疾患へと進行するため、治療的介入の必要な疾患であるが未だ有効な治療法がない。NASH の病態進行に腸内細菌の関与が示唆されるが、歯周病原細菌の歯性感染と NASH との関連性を明らかにした報告はない。

2. 研究の目的

本課題では、歯髄感染させた *P. gingivalis* が肝細胞に感染し、肝臓の炎症や線維化を促進したと言われ我々の実験病理学的知見に基づき、*P. gingivalis* 歯性感染による NASH の病態増悪機構を *in vitro*, *in vivo* において明らかにするとともに *P. gingivalis* の誘導する炎症、線維化過程における TLR2/TLR4 受容体シグナル伝達経路の重要性を実験病理学的に明らかにする。さらに、NASH 患者の肝生検材料で歯周病原細菌 *P. gingivalis* の有無とその組織像や臨床検査データの関連性を検討することで、*P. gingivalis* 感染が NASH の病態進行を増悪させるメカニズムについて明らかにし、NASH の新しい治療戦略としての歯周病治療の有効性を確立するための基礎的データとすることを目的とした。



(Furusuo et al. J Gastroenterol 2013)

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis*-LPS が脂肪化肝細胞に及ぼす影響
本研究では、ヒト肝細胞株 (HC3716-hTERT: HEP) を 0.1mM パルミチン酸で

18 時間処理することによって、細胞内に多数の脂肪滴を含有した肝細胞をヒト脂肪肝細胞 (Pal-HEP) として使用した。

HEP と Pal-HEP 細胞の *P. gingivalis*-LPS に対する感受性の違いを明らかにするために、*P. gingivalis*-LPS 受容体である TLR2/TLR4 の発現や 1μg/ml 濃度の *P. gingivalis*-LPS で刺激し、6 時間後の炎症や線維化に関わるサイトカイン (IL-1β, IL-6 及び MCP-1) mRNA 発現を RT-PCR や ELISA で調べた。

(2) *P. gingivalis* 感染が肝細胞の増殖・生存・機能に及ぼす影響

HEP、Pal-HEP 両細胞に multiplicity of infection (MOI) 100 で *P. gingivalis* を感染させ細胞増殖への影響を調べた。さらに、HEP、Pal-HEP を用い、Dox の誘導するアポトーシスに及ぼす *P. gingivalis* 感染の影響をフローサイトメーターで解析するとともに、アポトーシス関連遺蛋白 (PARP, cleaved caspase-3) の発現をウェスタンブロット法で調べた。

(3) *P. gingivalis* の肝細胞内への侵入と動態の検討

パルミチン酸による脂肪化が integrin α5、β1 (*P. gingivalis* の細胞内取込受容体) 発現や Pg 感染量に及ぼす影響と Dapi で染色し可視化した *P. gingivalis* を HEP 細胞に感染させ、オートファジーのマーカー LC3 とライソトロッカーで重染色し、蛍光顕微鏡で経時的に観察した。

(4) 脂肪化肝細胞、マクロファージと肝筋線維芽細胞との相互作用に関する検討

実験には、肝細胞 (HEP)、マクロファージ (THP-1; MΦ)、肝星細胞 (LX2) を脂肪化/非脂肪化状態で用い比較検討した。*P. gingivalis* を LX2 に感染させ、細胞数を調べるとともに分化マーカーである α-smooth muscle actin (αSMA) の発現を解析した。また、*P. gingivalis* 感染によって HEP、MΦ、LX2 から産生される線維化促進因子についても解析した。

(5) *P. gingivalis* 感染における自然免疫経路の関与の検討

TLR2-Ko, TLR4-Ko マウスを用い *P. gingivalis* 歯性感染モデルを作成し、TLR2/TLR4 受容体経路が *P. gingivalis* 歯性感染が誘導する NASH 病態進行過程に及ぼす影響を実験病理学的に検討するとともに、*P. gingivalis*-LPS が誘導する Pal-HEP、LX2 細胞からのサイトカイン産生増加に及ぼす TLR2 抑制剤 (TLR2 抗体) の効果を調べた。

(6) NASH 患者の肝臓における *P. gingivalis* 感染と臨床病態との関係

ヒト NASH 患者の肝生検材料 (300 例) を用い、*P. gingivalis* 感染の有無と線維化や炎症

の組織学的スコアや臨床検査値との関連性を検討した。

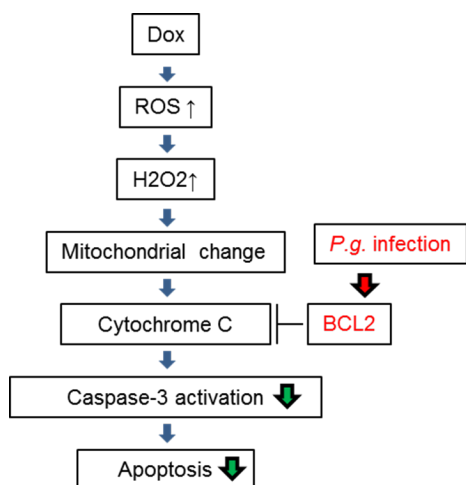
4. 研究成果

(1) *P.gingivalis*-LPS が脂肪化肝細胞に及ぼす影響

HEP 細胞で痕跡的であった TLR2 発現は、脂肪化によって著しく上昇した。また、*P.gingivalis*-LPS 刺激による TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MCP-1 発現は優位に増加し、脂肪肝では肝細胞の *P.gingivalis*-LPS に対する感受性が上がり、過剰なサイトカイン産生が起こることが明らかとなった。

(2) *P.gingivalis* 感染が肝細胞の増殖・生存・機能に及ぼす影響

HEP 細胞への *P.gingivalis* 感染は感染4日目の細胞数を有意に増加させた。Pal-HEP 細胞では感染による細胞数の増加は観察されなかった。一方で、*P.gingivalis* 感染は Dox の誘導するアポトーシスを有意に抑制した。Pal-HEP 細胞では感染によるアポトーシス細胞の増加はみられなかった。*P.gingivalis* 感染により HEP 細胞では BCL2 mRNA の発現増加がみられ、Dox によって誘導される



PARP や Caspase-3 の開裂が抑制されていた。NASH の病態進行には酸化ストレスによるミトコンドリアの傷害が重要な役割を果たすことが知られている。

よって、肝細胞への *P.gingivalis* 感染は BCL2 発現増加を介して、酸化ストレスによるアポトーシスを抑制し、細胞数を増加させる可能性が示唆された。

(3) *P.gingivalis* の肝細胞内への侵入と動態の検討

Pal-HEP では脂肪化により Integrin $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 発現が増強し、細胞内への *P.gingivalis* 感染量が増加することが antibiotic assay や *P.gingivalis* に特異的な mgl 遺伝子の PCR で確認された。感染4日目に mgl 遺伝子量が激減することから、細胞内での動態について免疫蛍光染色で検討した。細胞内に侵入した *P.gingivalis* の一部はオートファゴゾームではなくリソソーム内に取り込まれることが

明らかとなった。また、一部は細胞質に存在する可能性が示された。

(4) 脂肪化肝細胞、マクロファージと肝筋線維芽細胞との相互作用に関する検討

P.gingivalis 感染は HEP 細胞での脂肪酸やりポ蛋白の取込関連分子 (FATP、LDLR) やサイトカイン (IL-6、MCP1、TGF- β) の発現を上昇させた。M Φ では TNF- α 、IL-1 β 発現は上昇したが TGF- β 産生は見られなかった。

一方、LX2 細胞では TGF- β 産生は増加したものの、その他のサイトカイン産生増加は見られなかった。LX2 細胞を合成 TGF- $\beta 1$ 存在下で培養したところ、LX2 細胞の増殖促進と α SMA 発現上昇が認められた。なお、パルミチン酸存在下でこの作用は増強された。

よって、*P.gingivalis* 感染は肝細胞や肝星細胞からの TGF- β 産生を惹起し、肝星細胞の増殖と分化を促進することで、NASH における線維化を促進していることが明らかとなった。

(5) *P.gingivalis* 感染における自然免疫経路の関与の検討

野生型マウスにおける *P.gingivalis* 菌性感染は肝臓における脂肪沈着の増加、炎症細胞浸潤 (M Φ) の増加と線維化促進を誘導した (Furusho et al. J Gastroenterol 2013)。

一方、*P.gingivalis*-LPS の主な受容体である TLR2 のノックアウトマウスでは、脂肪沈着は減少し、MAC2 陽性 M Φ 浸潤面積は優位に抑制していた。また、線維化領域も確認できなかった。なお、他の *P.gingivalis*-LPS 受容体 TLR4 のノックアウトマウスでは明らかな抑制効果は観察されなかった。

In vitro で *P.gingivalis*-LPS の誘導するサイトカイン産生に及ぼす TLR2 抗体 (TLR2 シグナル伝達経路の遮断) の影響を調べたところ、TLR2 抗体は HEP 細胞や THP1 細胞からの TNF- α や IL-1 β 発現を著しく抑制した。よって、*P.gingivalis* 菌性感染が誘導する NASH 病態進行には TLR2 経路が重要な役割を果たす可能性が示された。

(6) NASH 患者の肝臓における *P.gingivalis* 感染と臨床病態との関係

NASH 患者の肝生検材料 300 例を用い、*P.gingivalis* の局在を免疫組織化学的に調べた結果、88 例、30% に感染を認めた。感染症例と非感染症例の臨床病理学的所見の比較検討では、ALT、AST などの肝障害マーカーには違いがなかったが、感染群では肝線維化の血清マーカーであるヒアルロン酸値が有意に高い値を示した (P<0.01)。また、肝生検の組織学的所見では脂肪化の程度には違いがなかったが、感染症例で炎症スコアが高い傾向、線維化のスコアは優位に高い値を示した (P<0.01)。

よって、肝組織への *P.gingivalis* 感染は肝臓での線維化を促進する可能性が示唆された。

P.gingivalis 歯性感染マウスモデルや脂肪化肝細胞モデルを用い、*P.gingivalis* 歯性感染が NASH の病態進行に及ぼす影響を詳細に検討した研究は、国内外渉猟してもほとんどない。歯周治療介入の効果についても、10 例の NAFLD 患者に歯周治療を行い、3 か月後に ALT、AST の値が有意に減少したとする報告が 1 つあるのみである。本研究課題において歯性感染と NASH の病態増悪とそのメカニズムを解明し、歯科治療や *P.gingivalis* 除菌が NASH の治療戦略となる可能性を明らかとした。よって、本研究の国民の健康増進におけるインパクトは大きい。

今後、大規模な疫学調査や臨床研究を行い、歯周病と NASH 患者の臨床病態との関連性、肝臓における *P.gingivalis* の局在と NASH の臨床病態との関連性、や歯科治療や *P.gingivalis* 除菌が NASH の病態に及ぼす影響についてトランスレーショナルな研究を展開していきたい。

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 4 件)

1. 歯周病原細菌と非アルコール性脂肪性肝炎のかかわり。古庄寿子, 宮内睦美, 高田 隆. MEDICAL TECHNOLOGY(査読無). 43(9):902-904. 2015.
2. 歯性感染はメタボリックシンドロームの病態に悪影響を及ぼす。宮内睦美, 古庄寿子, 犬伏俊博, 高田 隆. 歯界月報(査読無). 751:1-8. 2014
3. Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H, Inubushi T, Ao M, Ouhara K, Hisatune J, Kurihara H, Sugai M, Hayes CN, Nakahara T, Aikata H, Takahashi S, Chayama K, Takata T. J Gastroenterol (査読有) Nov;48(11):1259-70, 2013.
4. *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染は非アルコール性脂肪性肝炎の病態進行を促進する。宮内睦美, 古庄寿子, 敖敏, 犬伏俊博, 高田 隆. 広島歯誌(査読無). (40):1-6, 2013.

[学会発表](計 18 件)

1. Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) exacerbates progression of non-alcoholic steatohepatitis -Effects of *P.g.* infection and *P.g.*-LPS on Hepatocytes -. Miyauchi M, Furusho H, Nagasaki A,

Takata T. 93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (Boston, USA), March 11-14, 2015.

2. TLR2 plays a key role in *P.gingivalis*-induced NASH progression. Furusho H, Miyauchi M, Nagasaki A, Sakamoto S, Takata T. 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima), October 23-25, 2015.
3. Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Miyauchi M, Furusho H, Nagasaki A, Sakamoto S, Ouhara K, Kurihara H, Takata T. 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima), October 23-25, 2015.
4. *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染はマクロファージを介して肝星細胞を活性化し非アルコール性脂肪性肝炎の病態を進行させる。長崎敦洋, 古庄寿子, 宮内睦美, 高田 隆. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会(新潟), 9 月 11-13 日, 2015.
5. 歯周病は肝臓の病気に悪影響を及ぼす-歯周病原細菌の検査と歯科治療の重要性について-. 宮内睦美, 古庄寿子, 長崎敦洋, 新谷智章, 栗原英見, 茶山一彰, 高田 隆. 第 8 回日口腔検査学会総会・学術大会(横須賀), 10 月 4 日, 2015.
6. TLR2 plays a key role in *P.gingivalis* -induced NASH progeression. Furusho H, Miyauchi M, Nagasaki A, Sakamoto S, Takata T. 第 63 回 JADR 総会・学術大会(博多), 10 月 30-31 日, 2015.
7. 歯科的治療介入は *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染に伴う非アルコール性脂肪性肝炎の病態進行を抑制する。長崎敦洋, 坂本真一, 古庄寿子, 宮内睦美, 高田 隆. 第 54 回広島県歯科医学会 第 99 回広島大学歯学会 日本歯科技工学会中国・四国支部第 10 回学術大会(広島), 11 月 8 日, 2015.
8. Oral and Whole Body Health -Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* is a risk factor of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)- Takata T. 34th Myanmar Dental Conference (Yangon, Myanmar), 22-23, January 2014
9. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染は NASH 病態を増悪する。宮内睦美, 古庄寿子, 兵庫 秀幸, 茶山一彰, 栗原英見, 高田 隆. 第 10 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム(広島), 7 月 5 日. 2014
10. 非アルコール性脂肪性肝炎の病態進行におよぼす歯周病の影響に関する実態

- 調査・宮内睦美, 古庄寿子, 長崎敦洋, 高田 隆. 第 30 回歯科医学を中心とした総合的な集い(東京), 8月30日. 2014
11. *Porphyromonas gingivalis* 歯性感染は非アルコール性脂肪性肝炎の病態を増悪させる. 古庄寿子. 第 25 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会(新潟), 8月27-29日. 2014
 12. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の歯性感染はNASHの病態を増悪する. 宮内睦美, 古庄寿子, 長崎敦洋, 高田 隆. Clinical Lipid Seminar 2014(広島), 9月4日. 2014
 13. *Porphyromonas gingivalis* (Pg)歯性感染は非アルコール性脂肪性肝炎の病態を進行させる -Pg 感染やPg-LPSが肝細胞に及ぼす影響-. 平田真弓, 古庄寿子, 宮内睦美, 高田 隆. 第 56 回歯科基礎医学学会学術大会・総会(福岡), 9月26-27日. 2014
 14. The effects of *Porphyromonas gingivalis* infection on hepatocytes. Sakamoto S, Furusho H, Nagasaki A, Miyauchi M, Hisatsune J, Sugai M, Tahara H, and Takata T. 62nd Japanese association of dental research 総会・学術大会(大阪), 12月4-5日. 2014
 15. ワークショップ「口腔内炎症性疾患と全身の連関: Oral-Systemic Medicine の新たな展開」*Porphyromonas gingivalis* 歯性感染は非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態進行の増悪因子である. 宮内睦美, 古庄寿子, 高田 隆. 第 102 回日本病理学会総会(札幌), 6月6-8日. 2013
 16. 「オーラルヘルスと全身との関係」*P. gingivalis* の歯性感染は非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)のリスクファクターである. 高田 隆. 日本歯科人間ドック学会 第 16 回学術大会(東京), 12月5日. 2013.
 17. Effect of *Porphyromonas gingivalis* on the progression non-alcoholic steatohepatitis. Furusho H, Miyauchi M, Ao M, Inubushi T, Takata T. International Association of Dental Research General Session (Seattle, USA), 3月20-23日. 2013.
 18. Pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis is exacerbated by dental Infection of *Porphyromonas gingivalis*. Sakamoto S, Hirata M, Furusho H, Inubushi T, Miyauchi M, Takata T. 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima), 10月12-13日. 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮内 睦美 (Miyauchi Mutsumi)
広島大学 医歯薬保健学研究院 准教授
研究者番号: 50169265

(2) 研究分担者

古庄 寿子 (Furusho Hisako)
広島大学 医歯薬保健学研究院 助教
研究者番号: 00634461

高田 隆 (Takata Takashi)
広島大学 医歯薬保健学研究院 教授
研究者番号: 10154783

犬伏 俊博 (Inubushi Toshihiro)
広島大学 医歯薬保健学研究院 助教
研究者番号: 30550941
(平成 25 年度のみ)

兵庫 秀幸 (Hyogo Hideyuki)
広島大学 病院(医) 病院助教
研究者番号: 40397930
(平成 25 年度 ~ 平成 26 年度)