

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670803

研究課題名(和文) 口腔微生物由来の血中TLRリガンドに起因する糖尿病性腎症の促進機構の解明

研究課題名(英文) The promotion mechanisms of diabetic nephropathy by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide via toll-like receptors in glomerular endothelial cells.

研究代表者

沢 禎彦 (SAWA, YOSHIHIKO)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70271666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：重度歯周疾患を有する糖尿病患者は腎症を合併する危険性が2-3倍高いことが喫緊の問題となっています。私たちは糖尿病性腎症になった糸球体血管は免疫受容体TLRを発現すること、TLRと結合する歯周病原細菌Porphyromonas gingivalisの成分を微量投与した糖尿病マウスが、同様に投与した健常マウスの全生存期間内に、すべて腎症で死亡したことを示しました。扁桃、口腔粘膜や歯周ポケットなどから血中に入った細菌は解剖学的に腎臓に入ること、重度歯周疾患では、はみがきで容易に血液に細菌が入ることに原因があるのではないかと考えられました。現在、TLR拮抗剤による腎症予防研究に入りました。

研究成果の概要(英文)：We showed that the glomerulus blood endothelial cells with Diabetes mellitus expressed toll-like receptors (TLRs), and that all of the diabetic mice injected with Porphyromonas gingivalis LPS, which is the ligand of TLRs and the causative agent of periodontitis, died for diabetic nephropathy within all survival periods of non-diabetic mice with the LPS likewise. Diabetic nephropathy might be a cause in oral bacteria entering in the circulation because bacteria easily enter into the blood vessels of the patients with severe periodontitis by toothbrushing. The bacteria entering into the circulation at the intestine go to the liver but at the oral and maxillofacial circulation bacteria anatomically reach to kidney. Now, we began the study to prophylactically inhibit diabetic nephropathy by using the TLR antagonists.

研究分野：解剖学、免疫学、予防医学

キーワード：糖尿病 toll-like receptor 腎糸球体 糖尿病性腎症 AGE 歯周病 予防医学 TLR拮抗剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病合併症

2014年に公開された厚生労働省2012年国民健康・栄養調査における糖尿病の有病者数は約950万人に上る。その40%に合併する糖尿病性腎症を発症した患者は、歯周疾患有病率が非腎症糖尿病患者より有意に多いこと、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倍高いことが喫緊の問題となっている。

(2) 糖尿病性腎症の発症機構

糖尿病性腎症の病態像は糸球体硬化であるがその分子メカニズムは未解決である。糖尿病性腎症ではメサンギウム基質の増生と糸球体毛細血管壁の肥厚が認められ、高分子蛋白の高血糖による非酵素的な糖修飾と酸化によって形成される終末糖化産物 advanced glycosylated endoproducts (AGEs) がその原因物質とされる。糸球体に蓄積する血清 AGEs 中で最も多い Ne-carboxymethyl-lysine (CML) の分子構造には免疫原性があり、血管内皮細胞は CML を AGEs 受容体で認識して NF- κ B 活性化経路で白血球接着因子の発現を増強する^{1,2)}。また CML はメサンギウム細胞にサイトカイン産生を促し、IV型コラーゲンなど細胞外基質の増生による糸球体硬化を亢進させ

る¹⁻³⁾。一方、申請者らは平成22~24年度⁴⁾、口腔扁平上皮癌と糸球体上皮の共通抗原 podoplanin (PDPN) 特異抗体を開発した (Cancer Sci のトピックス In this issue に選定)^{5,6)}：ラット抗マウス PDPN 抗体 (PMab-1)、ラット抗ヒト PDPN 抗体 (NZ-1.2) (特許 PCT/JP2010/067141) (MBL, Imgenex, Sigma, Millipore で販売)。国内外で先行する抗体 (クローン D2-40, 8.1.1) より糸球体上皮特異性が強いこれら開発抗体を用いて糖尿病ヒトおよびマウス腎糸球体の免疫分子発現の微細形態学的検索が可能となった。

2. 研究の目的

本研究は、高血糖環境下で CML 蓄積など長期的酸化ストレスによって TLR 発現が誘導された腎糸球体の毛細血管内皮細胞が、歯周炎などの慢性口腔感染症によって体循環系に入った口腔微生物成分を認識し、TGF- β 産生と IV型コラーゲンの増生による基底膜肥厚、すなわち糸球体硬化を特徴とする糖尿病性腎症の発症機構を、糖尿病モデルマウスと培養細胞によって明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病モデルマウス

Streptozotocin (STZ) 投与による腭ラン

ゲルハンス島破壊型 I 型糖尿病 ICR マウス、I 型糖尿病 NOD マウス (九動)、II 型糖尿病の遺伝背景をもつ KK/Ta・KK/AyJcl マウス (九動) を高カロリー餌で飼育した II 型糖尿病マウス。血糖値と尿検査はヒト血糖測定器 (グルテストセンサー、アークレイ) と検査紙 (ウリエース、テルモ) でモニタリングした。STZ 誘発性糖尿病マウスは 1 ヶ月でほぼ 100%、高カロリー餌飼育の II 型糖尿病マウス KK/Ta および KK/AyJcl は 4 ヶ月で 70% が血糖値 600 以上となる。

(2) 糖尿病マウスへの TLR リガンド投与による糖尿病性腎症の誘発

糖尿病マウス腹腔に lipopolysaccharide (LPS) (Porphyromonas gingivalis, Wako) を投与した。グルテストセンサーと検査紙でモニタリングしつつ、尿・血清のタンパク (アルブミン)、糖、血中クレアチニンと尿素窒素測定を外注し (九動)、検査値から糖尿病性腎症の発症を判定、腎症の進行は生存曲線によって決定した。

(3) 糖尿病マウスの腎症の分析

肉眼解剖と組織像、および糸球体血管内皮細胞の TLR 活性化で誘導される IL-6, TNF- α と IL-1 などの炎症性サイトカインの産生、

また TGF- β の産生とコラーゲンの増生による糸球体硬化について、HE 染色、免疫染色と染色領域のスキャン・ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) による面積定量、ならびにリアルタイム PCR による遺伝子定量で決定した。

4. 研究成果

臨床サンプルと I 型・II 型糖尿病マウスで、糖尿病性腎症の糸球体毛細血管内皮細胞が toll-like receptor (TLR)2 と TLR4 を発現することを報告した (業績 1,2)。TLR は主に貪食細胞が発現する自然免疫受容体で、一般組織血管、また糖尿病の腎でも糸球体以外の腎血管は通常では発現は見られない。ところが、糸球体血管は糸玉状の特殊構造のため一般組織血管と比較して病原因子や免疫複合体が沈着しやすく、糖尿病環境で発生した免疫原性のある終末糖化産物 advanced glycosylated end-products (AGE) が糸球体血管に沈着し慢性的に刺激して、内皮細胞に白血球接着因子や TLR など免疫分子の発現をもたらすと考えられた。TLR2 はグラム陽性菌成分 lipoteichoic acid (LTA) を、TLR4 はグラム陰性菌成分 lipopolysaccharide (LPS) を、特異性をもたずに広く認識して TLR 発現細胞にサイトカイン産生を誘導する。本研究で、歯

周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (クルードでは TLR2 と TLR4 のリガンド) を定期的に微量投与した糖尿病マウスが、同様に投与した健常マウスの全生存期間内に、全マウスが腎症で死亡もしくは生活活性が humane endpoint に達したことを示した(業績 1,2)。腎症を合併した糖尿病マウスでは、糸球体血管内皮細胞における炎症性サイトカイン IL-1, IL-6 と TNF- α の産生およびメサンギウム細胞にコラーゲン産生を促す TGF- β の産生、またメサンギウムにおける大量の type1・4 コラーゲンの蓄積、強い蛋白尿、血清検査でのクレアチニンと尿素窒素異常が観察された。これらは同様の LPS 投与を行った健常マウスでは見られなかった(業績 1)。さらに腎はリンパ管が乏しく腎実質に入った微生物の排出が構造的に難しいこと、糸球体硬化では浮腫が発生しリンパ管増生が起こることを示した(業績 3)。腹部消化管で循環系に入った細菌は門脈を經由して肝臓で処理されるが、頭頸部で血中に入った細菌は直接体循環から腎循環に入るため、例えば慢性扁桃炎は連鎖球菌と IgA の免疫複合体が糸球体に蓄積する IgA 腎症を起こす。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ため、血中に入った口腔微生物が腎に辿り着き糸球体内皮細胞の TLR と結合して糖尿病性腎症を

発症させたと考えられた。

【結論】

糖尿病環境で発生した AGE が糸球体毛細血管に蓄積して内皮細胞に TLR 発現を誘導し、同時に慢性歯周疾患に起因して血中に入った歯周病原細菌成分の TLR リガンドが TLR を介して糸球体内皮細胞に認識され TGF- β 産生を促進することで、TGF- β 誘導性にメサンギウム細胞のコラーゲン過剰産生による糸球体硬化が誘導される(図 1)。

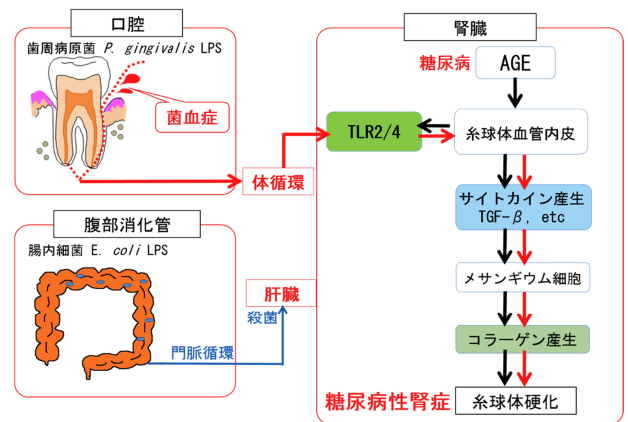


図 1 歯周疾患と糖尿病性腎症の相関経路の仮説

<引用文献>

- 1) Wang, et al. Atherosclerosis. 2012, 221: 387-96.
- 2) Nerlich, et al. Ann N Y Acad Sci 2007, 1096:239-248.
- 3) Alkhalaf, et al. PLoS One 2012, 7: e40427.
- 4) 平成 22-24 年度基盤研究 B 「リンパ管内微小環境における CLEC2-PLAG 複合体の癌性形質誘導に関する研究」 22390345、沢 (代表)

5) Kaji, et al. Acta Histochem Cytochem 2012, 45: 227-237.

6) Kaneko, et al. Cancer Sci 2012, 103: 1913-1919.

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計3件)

1) Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. Sawa Y, Takata S, Hatakeyama Y, Ishikawa H, Tsuruga E. PLOS ONE 2014, e97165.

2) Expression of toll-like receptor 4 in glomerular endothelial cells under diabetic conditions. Takata S, Sawa Y, Uchiyama T, Ishikawa H. Acta Histochemica et Cytochemica 2013, 46(1):35-42.

3) Altered dynamics in the renal lymphatic circulation of type 1 and type 2 diabetic mice. Uchiyama T, Takata S, Sawa Y, Ishikawa H. Acta Histochemica et Cytochemica 2013, 46(2):97-104.

【学会発表】(計15件)

1) 高田俊輔,内山貴誠,敦賀英知,畠山雄次,石川博之,沢禎彦:糖尿病環境下の腎系球体におけるTLR2とTLR4の発現について.第118回

日本解剖学会総会・全国学術集会.高松.2013,3

2) 内山貴誠,高田俊輔,敦賀英知,畠山雄次,石川博之,沢禎彦:糖尿病モデルマウスの腎リンパ管増生について.第118回日本解剖学会総会・全国学術集会.高松.2013,3

3) 高田俊輔,内山貴誠,敦賀英知,畠山雄次,石川博之,沢禎彦:Expression of toll-like receptors in glomerular endothelial cells under diabetic conditions.第38回日本微小循環学会総会.東京.2013,2

4) 高田俊輔,内山貴誠,石川博之,沢禎彦:糖尿病モデルマウス腎系球体におけるTLR2とTLR4の発現.第28回日本糖尿病合併症学会.旭川.2013,9

5) 内山貴誠,高田俊輔,敦賀英知,畠山雄次,石川博之,沢禎彦:型と型糖尿病モデルマウスにおける腎リンパ管新生.第55回歯科基礎医学会学術大会・総会.岡山.2013,9

6) 高田俊輔,内山貴誠,敦賀英知,畠山雄次,石川博之,沢禎彦:糖尿病環境下の腎系球体内皮細胞におけるTLR2とTLR4の発現.第55回歯科基礎医学会学術大会・総会.岡山.2013,9

7) 内山貴誠,高田俊輔,石川博之,沢禎彦:型と型糖尿病マウスにおける腎リンパ管増生について.第51回日本糖尿病学会九州地方会.沖縄.2013,11

8) 高田俊輔,内山貴誠,敦賀英知,畠山雄次,石川博之,沢禎彦:糖尿病環境下の腎系球体におけるToll-like receptor(TLR)2と4の発現.第51回日本糖尿病学会九州地方会.沖縄.2013,11

9) 内山貴誠,高田俊輔,石川博之,沢禎彦:

型と 型糖尿病モデルマウスにおける腎リ
ンパ管新生について.第 40 回福岡歯科大学学
会総会.福岡.2013.12

10) 高田俊輔、内山貴誠、石川博之、沢禎彦：
糖尿病モデルマウスの腎系球体における TLR2
と TLR4 の発現.第 40 回福岡歯科大学学会総会.
福岡.2013.12

11) 高田俊輔，梶原弘一郎，沢禎彦，石川博
之．糖尿病マウス腎系球体における歯周病原
菌由来 LPS による TLR2/4 依存性サイトカイン
発現．日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講
演会.千葉.2014,5

12) 高田俊輔，梶原弘一郎，沢禎彦，石川博
之． Severe Periodontal Disease exacerbate
Diabetic Nephropathy through Toll-like
receptor (TLR) 2 and TLR4. 第 57 回春季日
本歯周病学会学術集会.岐阜.2014,5

13) 高田俊輔，梶原弘一郎，石川博之，沢禎
彦．歯周病原菌由来 TLR リガンドによる糖尿
病性腎症の促進．第 56 回歯科基礎医学会(福
岡.2014,9.)

14) 高田俊輔，梶原弘一郎，石川博之，沢禎
彦．歯周病原性 LPS による TLR を介した糖尿
病性腎症の促進について．第 41 回福岡歯科
大学学会総会(福岡.2014,12)

15) 高田俊輔，梶原弘一郎，沢禎彦，石川博
之． Porphyromonas gingivalis 由来 LPS は腎
系球体の TLR2/4 を介して糖尿病性腎症を促
進する．第 73 回日本矯正歯科学会大会(福岡.
2014,10)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沢 禎彦 (SAWA, Yoshihiko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：70271666

(2) 研究分担者

畠山 雄次 (HATAKEYAMA, Yuji)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：40302161

岡 暁子 (OKA, Kyoko)

福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授

研究者番号：60452778

敦賀 英知 (異動により 2014 年度辞退)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：30295901

谷口 邦久 (退職により 2014 年度辞退)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：90105685