

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670895

研究課題名(和文)3次元リアルタイム培養システムによる歯周病とNASH関連機序のイメージング解析

研究課題名(英文)Imaging analysis of periodontitis and NASH related mechanism in 3D incubating system

研究代表者

齋藤 俊行(SAITO, Toshiyuki)

長崎大学・医歯学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：10170515

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): NASHの発症については、肥満などによる脂肪肝の状態である1st Hitに、エンドトキシン(LPS)や様々なサイトカイン、アディポカインによる2nd Hitが必要であり、この部分は多様なプロセスによるため未解明な部分が多い。本研究では、肝細胞と血管内皮細胞を培養し、歯周病関連細菌由来LPSで刺激後の各々の細胞の動態および細胞表面のICAM-1、P-selectinなどの接着因子発現やTGF- β などのサイトカイン産生の変化を確認した。現在、人工膜マトリックス上での3D培養やヒト単球系細胞や好中球との共培養における影響についても解析している。

研究成果の概要(英文): For the development of NASH, obesity is a state of fatty liver due to 1st Hit, and it is necessary to 2nd Hit by endotoxin (LPS) and various cytokines. It is unexplained part for of this processes. In this study, we cultured liver cells and vascular endothelial cells, ICAM-1 and P-selectin of adhesion molecules of the cells and various cytokines after stimulation with periodontal disease-related bacteria-derived LPS. Currently, we are also analyzed the influence in co-culture with human monocytic cells and neutrophils and 3D culture on the artificial membrane matrix.

研究分野：社会系歯学

キーワード：歯周病 NASH

1. 研究開始当初の背景

歯周病が全身に及ぼす影響について、我々は歯周病が耐糖能異常を引き起こしている可能性を後ろ向きコホート調査で報告した(Saito T, et al., *J Dent Res*, 2004; Saito T, et al. *J Periodontol*, 2006)、血液検査により肝臓の脂肪化に炎症、線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎(Non-Alcoholic steato-hepatitis (NASH))を引き起こしている可能性を指摘した(Saito T, et al., *J Int Acad Periodontol*, 2006)。NASHの発症については、肥満などによる脂肪肝の状態である1st Hitに、エンドトキシン(LPS)や様々なサイトカイン、アディポカインによる2nd Hitが必要であり、この部分は多様なプロセスによるため未解明な部分が多い。NASH患者の歯周病菌保有率が健康な人と比べて約3.9倍もの高率で、歯周病のあるNASH患者10人に歯周治療を行うと3カ月後に肝機能の数値がほぼ正常になったとの報告もあることから、歯周病はNASHの2nd Hit に関与している可能性がある。我々は、これらの疾患のきっかけとなる肥満との関連で、脂肪細胞が産生するアディポカインに着目し、その1つであるレジスチンの末梢血中の濃度が、歯周病を有する者では有意に高いことを明らかにした(Saito T, et al., *J Dent Res*, 2008; Furugen R, et al., *J Periodont Res*, 2008)。レジスチンはヒトでは肥満より炎症との関連が強いことが報告されているが、我々は歯周病原細菌*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(Aa)白血球毒素(Furugen R, Hayashida, Saito T et al., *FEMS*

Microbiol Lett, 2011)や*Porphyromonas gingivalis*(Pg)由来LPS刺激でもヒト好中球からレジスチンが放出することを報告した(Furugen R, Hayashida H, Saito T, *Oral disease*, 2013)。NASH患者の血清中レジスチン濃度が高いとの報告もあるが、マクロファージや好中球が産生するサイトカインやアディポカインがメタボリックシンドロームやNASHの進展に寄与していることが報告されていることから、歯周病も何らかの関連があるかもしれない。

2. 研究の目的

肝細胞と血管内皮細胞を培養し、リアルタイム培養システムにおいて歯周病関連細菌菌体またはLPSで刺激後の各々の細胞の動態および細胞表面のICAM-1、P-selectinなどの接着因子発現やNO・スーパーオキシド(SOD)産生の変化を確認する。また、人工膜マトリックス上での3D培養やヒト単球系細胞や好中球との共培養における影響についても解析する。

3. 研究の方法

(1) 培養条件の検証

肝細胞(HepG2)・血管内皮細胞(HUVEC)・単球系細胞株(U937)、ヒトボランティアより分離した樹状細胞、単球、好中球を用いて培養条件を整える。さらに、人工膜マトリックス上で3D培養する条件を整える。

(2) 細胞数および細胞形態変化の確認

LPS 添加の有無および濃度の違いによる、細胞の形態的な違いとその動態の変化を、リアルタイム培養システムおよび共焦点レーザー顕微鏡にて確認する。

(3) 各種遺伝子発現確認

各種細胞より mRNA を抽出し、Real time-PCR 法により各種遺伝子 (MMP-9, TGF- β 、IL-8) の mRNA レベルを LPS 添加の有無で比較する。

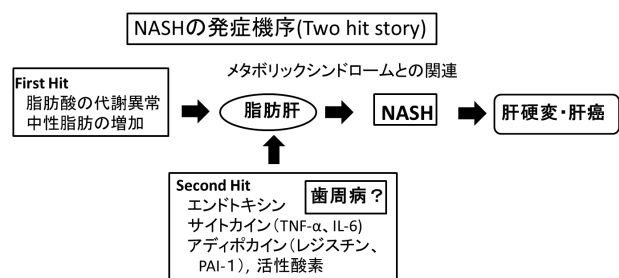
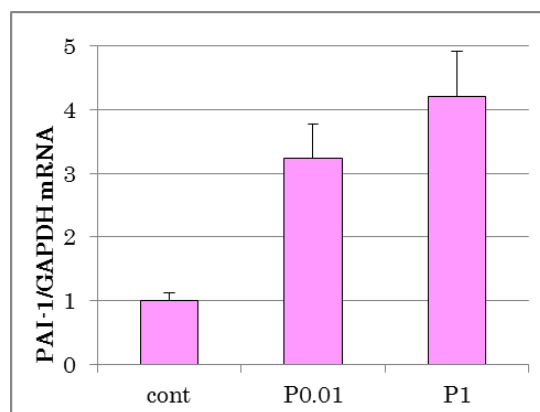
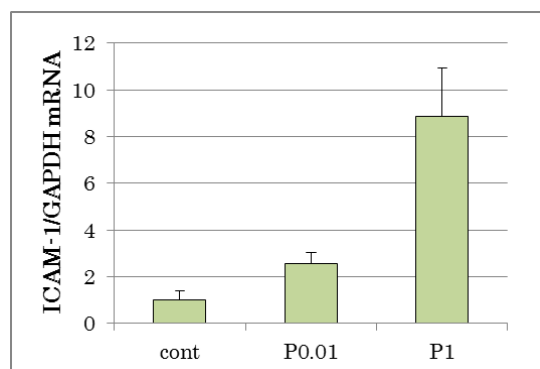
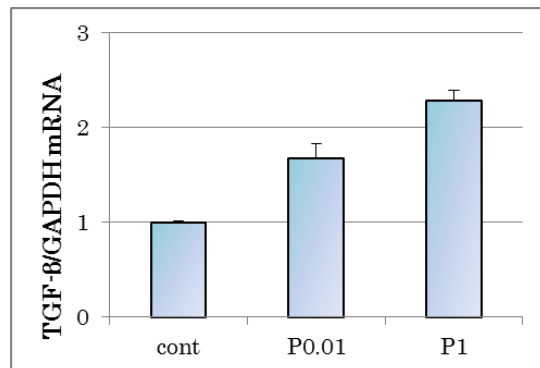
(4) 細胞表面接着因子発現の変化と NO 産生、SOD 産生の比較

各種細胞を培養後、BD FACSCalibur(フローサイトメトリー)により接着因子 (ICAM-1、P-selectin など) 発現を、また Griess-Romijin nitrite reagent を用い、NO 産生を比較する。SOD は Xanthine-Xanthine oxidase 系を利用し、SOD 活性を比色測定する。NO 産生については、蛍光色素を用いて顕微鏡上でも確認する。

4 . 研究成果

(1)

肝細胞株(HepG2)に *P.gingivalis* および *E.coli* 由来 LPS を添加後 6 時間後の細胞を回収し、RT-PCR 法にて各種発現を比較した。LPS 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加した方が、より発現が高かった。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Hideaki Hayashida, Toshiyuki Saito, Koji Kawasaki, Masayasu Kitamura, Reiko Furugen, et.al. : Association of periodontitis with carotid artery intima-media thickness and arterial stiffness in community-dwelling people in Japan: the Nagasaki Islands study. *Atherosclerosis*, 査読有, 229, 2013, 186-91

Reiko Furugen, Hideaki Hayashida, Toshiyuki Saito.: *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide causes resistin release from neutrophils. *Oral Dis.* 査読有, 19, 2013, 479-83.

[学会発表] (計2件)

古堅麗子、林田秀明、齋藤俊行 : *Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激によるヒト単球系細胞における Pentraxin3 産生について 第63回日本口腔衛生学会・総会、2014年5月30日、熊本市民会館 崇城ホール、熊本市

Reiko Furugen, Hideaki Hayashida, Toshiyuki Saito. Resistin release by Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis* via JNK and MAP kinase pathways. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and related bacterial species. August

27,2012 Ryojun Hall, Nagasaki University, Nagasaki city, Japan

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 俊行 (SAITO, Toshiyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授

研究者番号 : 1 0 1 7 0 5 1 5

(2) 研究分担者

古堅 麗子 (FURUGEN, Reiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教

研究者番号 : 9 0 2 5 3 6 7 4

林田 秀明 (HAYASHIDA, Hideaki)
長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号 : 2 0 2 3 8 1 4 0