

厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
口腔内細菌叢とがん，糖尿病など全身疾患との関わりとその予防戦略  
分担研究報告書

マウスにおける歯周病原細菌 *P. gingivalis* 由来 LPS の全身投与が  
腎臓に与える影響に関する研究

研究分担者 小林正伸 北海道医療大学 看護福祉学部 教授

研究分担者 安彦善裕 北海道医療大学 歯学部 教授

研究分担者 藏満保宏 北海道医療大学 がん予防研究所 教授

研究分担者 濱田淳一 北海道医療大学 看護福祉学部 教授

研究分担者 寺崎 将 北海道医療大学 薬学部 講師

研究要旨：

近年，歯周病は糖尿病，感染性心内膜炎，自己免疫疾患などの全身疾患に関連する危険因子となることが報告されている．腎臓疾患との関連を示唆する報告もあるが，そのメカニズムは明らかとっていない．本研究では，歯周病原菌の腎臓への影響を観察するために，これまでの先行研究を元に *P. gingivalis* 由来の LPS が諸臓器に急性炎症を引き越さないマウスのモデル系の確立を試みた．さらにこのモデルにおける腎臓の遺伝子発現を網羅的に検索した．

6～8 週齢のマウスに *P. gingivalis* 由来 LPS (5 mg/kg) を 1 ヶ月間腹腔内投与した．マウスの血中 LPS の濃度を確認，摘出した臓器の薄切標本作製，組織像の観察，Total RNA の抽出を行った．Total RNA から cDNA を作成し，マイクロアレイによる mRNA 発現の変化の網羅的解析を行い，合わせてパスウェイ解析を行った．

LPS 投与マウスは 1 ヶ月間の LPS 投与により死亡するものはみられず，腎臓の組織標本での観察では明らかな急性炎症所見は確認されなかった．マイクロアレイによる解析では，4 倍以上に発現上昇した遺伝子は 1,080 プローブ，0.5 倍以下に発現減少した遺伝子は 803 プローブであった．

本研究では PG-LPS 投与によって発現の変化した遺伝子を 5 つ同定した (*Saa3*, *Ticam2*, *Reg3b*, *Oxct2a* および *Xcr1*)．これらの遺伝子はマウス腎内皮細胞で発現上昇しており，腎臓での遺伝子発現上昇は KEC に由来すると考えられる．これらの遺伝子は慢性腎障害に関わっていると考えられるが，詳細な機構は明らかになっていないため今後の研究が必要とされる．

A．研究目的

近年、歯周病は糖尿病、感染性心内膜炎、自己免疫疾患などの全身疾患に関連する危険因子となることが報告されている。歯周病は炎症性サイトカインや種々の起炎物質が産生され、破壊された毛細血管を介して血流に入ることによって全身疾患に影響を与えられている。慢性腎障害が3ヶ月続いた状態を指し、世界的に加齢、糖尿病、高血圧、肥満および心臓血管疾患との相関が見られている。歯周病と腎臓疾患との関連を示唆する報告もあるが (Ricardo AC et al. 2015)、その機序は明らかとっていない。

尿路感染や腎盂炎を引き起こす大腸菌は特に尿路感染病原性大腸菌と呼ばれ、大腸菌由来LPSを用いて尿路細菌感染を引き起こすモデルが一般的に知られている。このLPSはグラム陰性菌としてTLR-4と結合する。一方で同じグラム陰性菌である*P. gingivalis*由来のLPS(PG-LPS)はTLR-4とTLR-2に結合する。近年、PG-LPSが糸球体内皮細胞のTLR-2の発現を亢進させ、糖尿病モデルマウスの腎障害を悪化させる事が報告された。CKDと歯周病は全身疾患を介して関連していると考えられるが、それらを介さず直接的に影響している可能性も考えられる。これまでに、動物に内毒素Lipopolysaccharide(LPS)を全身投与し諸臓器の変化を観察した報告はあるが (Ding SP et al. 2003)、歯周病を想定し歯周病原菌由来のLPSを全身投与した報告は少ない。また、LPSの全身投与による研究では局所に急性炎症を引き起こすことが多く、これらは慢性的な歯周炎の全身への影響を観察するモデルとしては相応しくない。

本研究では、PG-LPSの腎臓への影響を観察するために、これまでの先行研究を元にPG-LPSが諸臓器に急性炎症を引き越さないマウスのモデル系の確立を試みた。そしてこのモデルにおける腎臓の遺伝子発現を網羅的に検索し、その再現性を評価した。

## B. 研究方法

### 【研究1】

6~8週齢のマウス (C57BL/J, 三協ラボ) に生理食塩水で調製したPG-LPSを5 mg/kgになるよう腹腔内投与し3日毎 (84h) に1回、1ヶ月間 (10回) 投与した。各群5匹飼育し、LPS溶液と同量の生理食塩水を投与した群を対照群とした。最終投与より3日後にマウスを屠殺し、腎臓を摘出した。摘出に先立ち、マウスより血液を採取し血中PG-LPS濃度をELISAで確認した。摘出した臓器より薄切標本作製し組織像の観察と炎症性変化を評価した。また摘出臓器よりTotal RNAを抽出し、cDNAを合成し、SurePrint G3 Rat GE 8x60K Ver.2.0 (Agilent) によるmRNA発現の変化の網羅的解析を行った。その後、発現増加が大きかった遺伝子発現の再現性をreal-time RT-PCRにて観察した。

### 【研究2】

マイクロアレイの再現性の確認および遺伝子発現変化の要因となる細胞を確認する為にマウス腎内皮細胞 (KEC) の培養を行った。KECを60mmシャーレに培養し ( $4.0 \times 10^4$  cells/ml), LPSを添加あるいは非添加で4日及び1ヶ月間培養した。添加したLPS濃度はそれぞれ0.1, 1, 10, 100, 1,000 ng/mlで、非添加群を対照群とした。PG-LPSの添加はそれぞれ3日 (48h) 毎に

行い、培養4日間および33日間培養を行った。培養後はTotal RNAを抽出し、cDNAを合成しreal-time RT-PCRによるmRNA発現の変化の解析を行った。

## C. 研究結果

### 【研究1】

1. LPS投与から15分後において、マウス血中のLPS濃度はPG-LPS投与群で $22.2 \pm 8.94$  ng/mL、対照群で $8.21 \pm 2.65$  ng/mLであり、両者には有意差を認めた(図1,  $p < 0.05$ )。

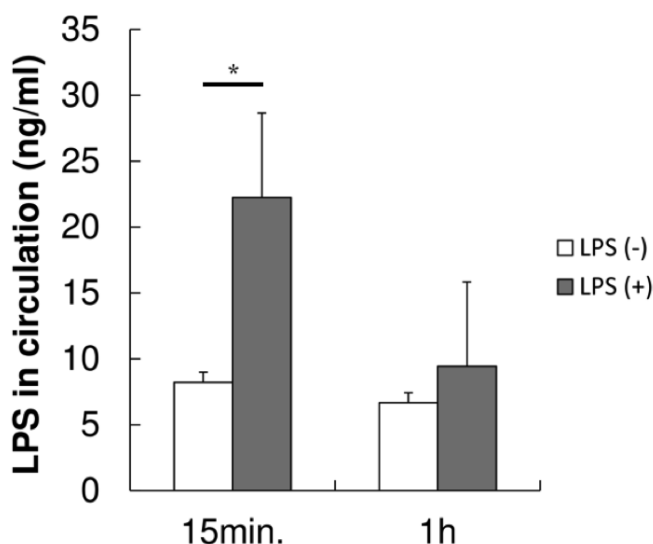
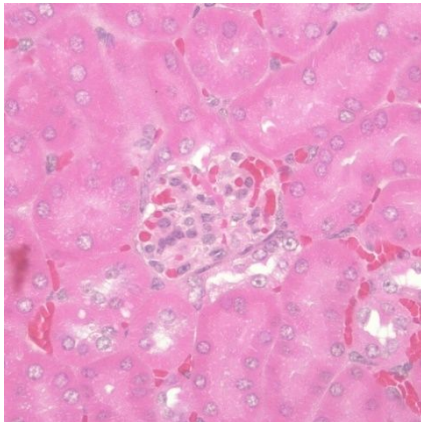


図1 LPSのマウス血中濃度

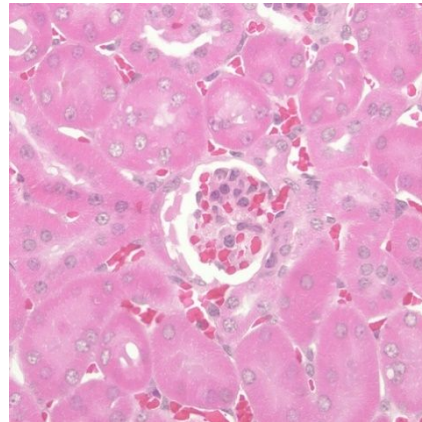
\* LPS(-) : 対照群, LPS(+): PG-LPS 投与群

2. 腎臓の組織標本での観察では、PG-LPS投与群で糸球体の破壊やメサングウム細胞の増加などの明らかな急性炎症所見は確認されなかった(図2 a, b, c)。
3. 免疫染色の結果から、腎臓の糸球体細胞にPG-LPS投与群でTNF- $\alpha$ に弱陽性、eNOSに強陽性を示し、対照群ではいずれも弱い染色を認めただけであった(図3 a, b)。
4. マイクロアレイによる解析で、発現上昇の見られた上位10遺伝子のうち、既知の遺伝子はserum amyloid A3 (*Saa3*), toll-like receptor adaptor molecule 2 (*Ticam2*), regenerating islet-derived 3 beta (*Reg3b*), 3-oxoacid CoA transferase 2A (*Oxct2a*) and chemokine (*C motif*) receptor 1 (*Xcr1*)の5遺伝子であった(表1)。
5. マイクロアレイでの発現増加群の上位5遺伝子のmRNAは、腎組織においていずれもPG-LPS投与群で発現が増加しており、有意差を認めた(図4 a-e,  $p < 0.05$ )。

a

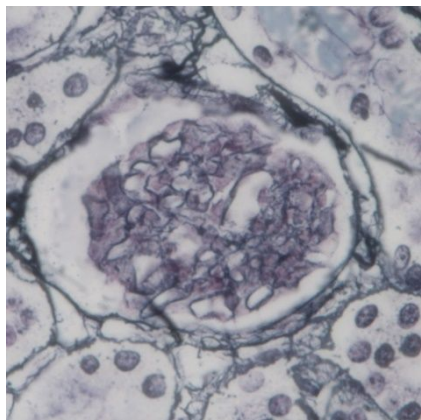


対照群

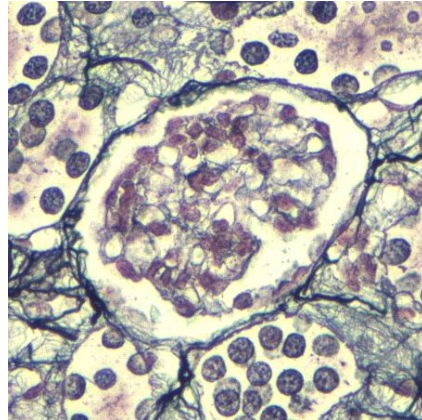


LPS 投与群

b

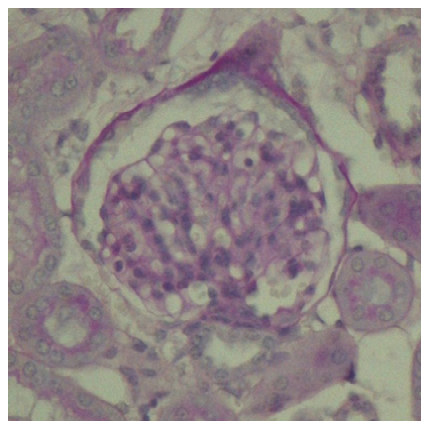


対照群

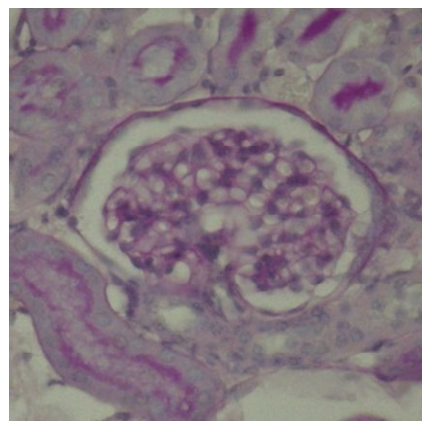


LPS 投与群

c



対照群

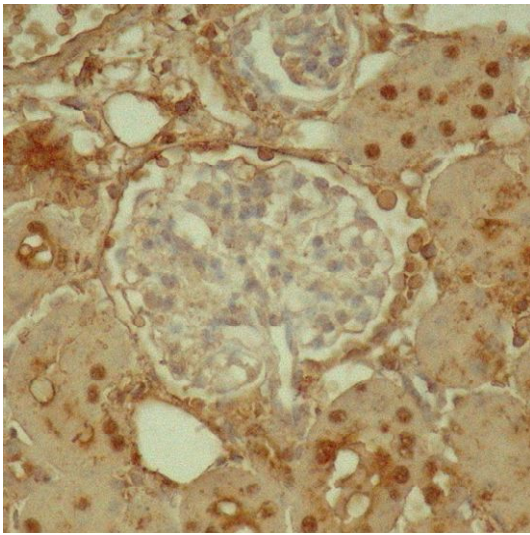


LPS 投与群

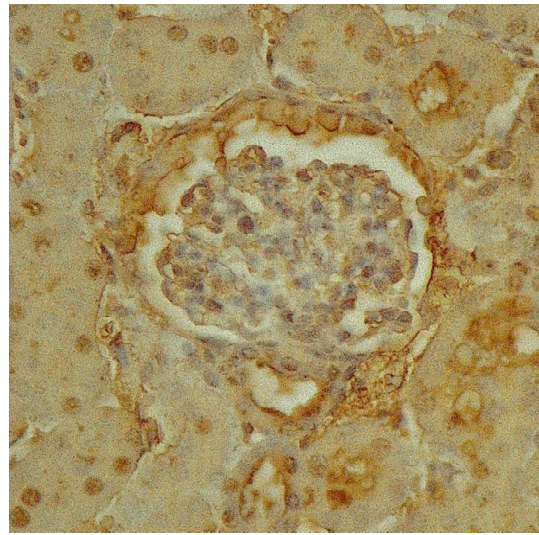
図2 腎臓の組織学的評価 (a HE 染色, b 鍍銀染色, c PAS 染色)



a

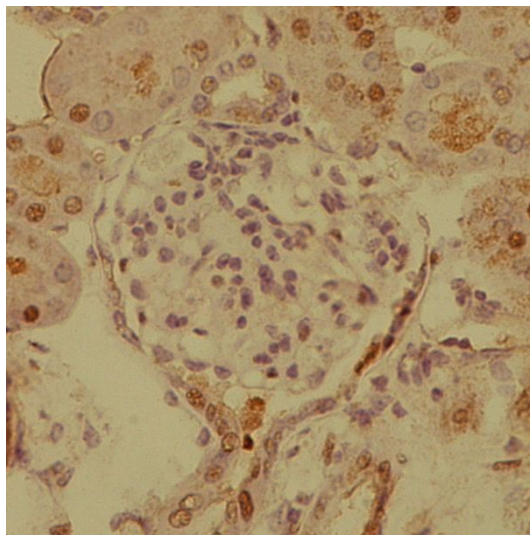


対照群

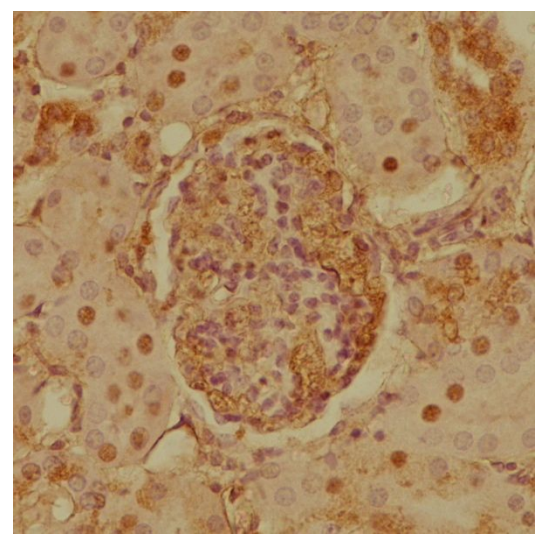


LPS 投与群

b



対照群



LPS 投与群

図3 免疫染色による TNF- $\alpha$  および eNOS の評価 (a TNF- $\alpha$  , b eNOS)

表1 マイクロアレイ解析（発現上昇遺伝子）

Gene symbol	Accession number	Description	Fold change
D830026I12Rik	NR_102304	Long non-coding RNA	193.67
C030017B01Rik	AK046738	Unclassifiable	190.13
<u>Saa3</u>	NM_011315	Serum amyloid A 3	162.39
<u>Ticam2</u>	NM_173394	Toll-like receptor adaptor molecule	90.66
<u>Reg3b</u>	NM_011036	Regenerating islet-derived 3 beta	84.00
<u>Oxct2a</u>	NM_022033	3-oxoacid CoA transferase 2A	81.63
Gm11710	NM_001101656	Predicted gene 11710	79.35
1520401A03Rik	XM_011238308	1520401A03 gene	78.32
<u>Xcr1</u>	NM_011798	Chemokine (C motif) receptor 1	76.70
AK078702	AK078702	Adult male eyeball cDNA	73.61

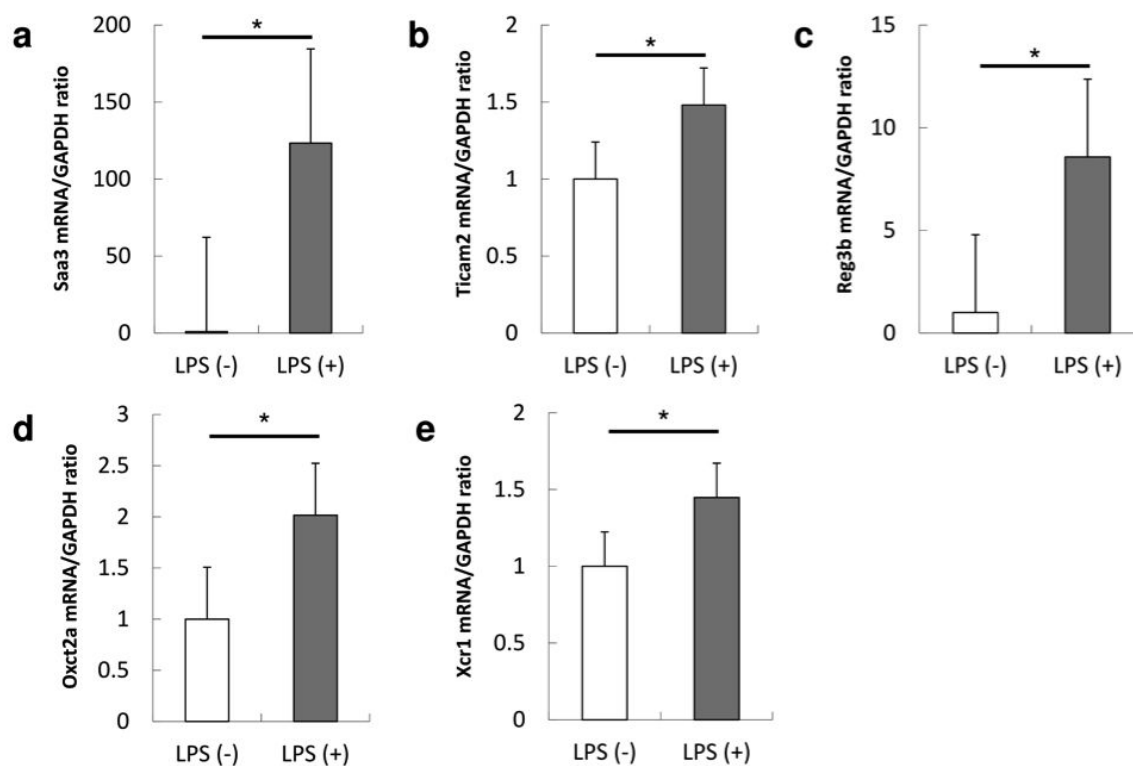


図4 マイクロアレイで発現上昇を認めた5遺伝子の mRNA 発現

【研究2】

1. 培養4日目では1,000ng/ml添加群を除くすべての群で、5遺伝子の有意な発現変化は認めなかった。一方で1,000ng/ml添加群ではすべての遺伝子のmRNA発現の増加と有意差を認めた(図5 a,  $p < 0.05$ )。
2. 培養33日目では*Saa3*, *Oxct2a*および*Xcr1*で*Saa3*の100ng/ml群を除くすべての濃度のPG-LPS投与群で各遺伝子の発現が増加し、有意差を認めた。また*Ticam2*および*Reg3b*の10, 100, 1,000ng/mlのPG-LPS投与群で各遺伝子の発現が増加し、有意差を認めた(図5 b,  $p < 0.05$ )。

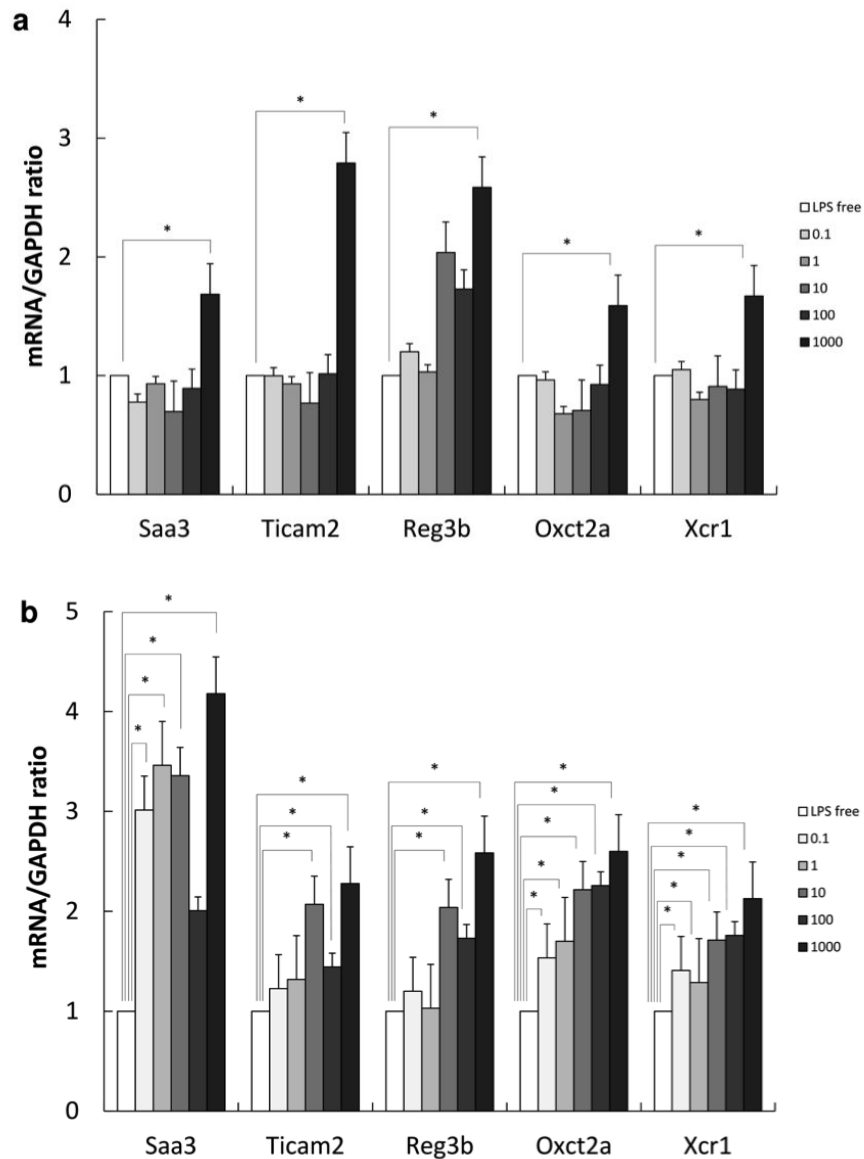


図5 KECにおけるPG-LPS投与による5遺伝子のmRNA発現の変化  
(a 培養4日目, b 培養33日目)

#### D．考察

【研究1】の結果より，本研究におけるマウスモデルは腎臓において組織学的に明らかな急性炎症を引き起こさなかったが，免疫染色にて炎症性物質の発現がみられた．これらが遺伝子発現の変化を引き起こし，腎臓における発がんリスクの上昇，および脂質代謝に悪影響を及ぼす可能性が示唆された．

【研究2】の結果より，発現変化の見られた5遺伝子すべてがKECにおいて発現が増加しており，PG-LPSによる作用の標的細胞はKECである可能性が示唆された．

#### E．結論

本研究ではPG-LPS投与によって発現の変化した遺伝子を5つ同定した（*Saa3*, *Ticam2*, *Reg3b*, *Oxct2a*および*Xcr1*）．これらの遺伝子はKECで発現上昇しており，腎臓での遺伝子発現上昇はKECに由来すると考えられる．これらの遺伝子はCKD発症に関わっていると考えられるが，詳細な機構は明らかになっていないため今後の研究が必要とされる．

#### F．健康危険情報

（総括研究報告書において記載）

#### G．研究発表

（総括研究報告書において記載）

#### H．知的財産権の出願・登録状況

##### 1．特許取得

なし

##### 2．実用新案登録

なし

##### 3．その他

なし