

|         |                                                                     |
|---------|---------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 関 愛子                                                                |
| 授与した学位  | 博 士                                                                 |
| 専攻分野の名称 | 歯 学                                                                 |
| 学位授与番号  | 博甲第7258号                                                            |
| 学位授与の日付 | 令和7年3月25日                                                           |
| 学位授与の要件 | 医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻<br>(学位規則第4条第1項該当)                              |
| 学位論文の題目 | <i>Fusobacterium nucleatum</i> LPS が誘導する近位尿細管 SGLT2 の過剰発現による糖尿病増悪機構 |
| 論文審査委員  | 大原 直也 教授      仲野 道代 教授      大森 一弘 准教授                               |

### 学位論文内容の要旨

歯周病が、糖尿病合併症と糖尿病の増悪に寄与する可能性が議論されているが、糖尿病と歯周病の相互関係に関しては未だ不明な点が多い。我々は糖尿病環境下の腎糸球体内皮細胞がtoll様受容体 (toll-like receptor, TLR) 2およびTLR4を発現すること、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスの頬粘膜下へ歯周病原細菌*Porphyromonas gingivalis* (Pg) のリポ多糖 (lipopolysaccharide ; LPS) (Pg-LPS) を投与することで腎症を引き起こすことを報告している。Pg-LPSは主にToll様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) 2経路を活性化するが、このモデルにおいてはTLR4阻害剤で腎症が抑制されたことから、弱いTLR4経路の活性は糖尿病腎臓で炎症反応を引き起こすと推測された。

近年、*Fusobacterium nucleatum* (Fn) はTLR4を強力に活性化することが示されており、本研究では、FnのLPS (Fn-LPS) が糖尿病マウスの腎近位尿細管におけるナトリウム-グルコース共輸送体2 (sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2) の過剰発現を誘導することで糖尿病を増悪させる可能性を検討することを目的として行った。

始めにFn-LPSを精製し、ヒト単球マクロファージ様細胞株THP-1を用いて、THP-1の細胞接着性とIL-6の産生を指標に、さらにTLR4阻害剤を用いることで標品の活性を評価した。次に尿細管上皮細胞におけるSGLT2の発現を定量RT-PCR法、ELISA法、および免疫染色法で検討した。その結果、THP-1の接着とIL-6 mRNAの発現はFn-LPSによって増加、TLR4阻害剤で抑制され、Fn-LPSのTLR4リガンドとしての有用性が示された。尿細管上皮細胞のSGLT2発現は、Fn-LPSあるいはマウスマクロファージ株J774.1細胞との共培養ではSGLT2の産生誘導は認められなかったが、TNF- $\alpha$ の添加、あるいはFn-LPS存在下でのJ774.1細胞との共培養では、SGLT2発現の有意な亢進が認められた。Fn-LPSを感知したマクロファージなど免疫細胞が産生したTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインによって尿細管にSGLT2発現が誘導されるか、糖尿病環境下でTNF- $\alpha$ などの炎症性因子によって尿細管上皮細胞自体に発現が誘導されたTLR4を介したFn-LPSの認識によってSGLT2発現が誘導される可能性が示された。

動物実験において、Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは、Fn-LPS 無投与の糖尿病マウスと比較して、短期間かつ急激な血糖値の上昇を認め、血糖値も有意に高かった。尿中アルブミン、血中尿素窒素および血中クレアチニンは Fn-LPS 投与糖尿病マウスが有意に高く、Fn-LPS 投与糖尿病マウスの全個体が他マウスの生存期間中に人道的エンドポイントに到達したことから、*F. nucleatum* が関連する腎の炎症は糖尿病増悪因子であることが考えられた。マウス腎組織免疫染色では、未処理マウスと Fn-LPS 投与マウスの腎組織では、抗 SGLT2 抗体に対する反応がほとんど認められなかったのに対して、糖尿病マウスと Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは、抗 SGLT2 抗体が強く反応し、特に、Fn-LPS 投与糖尿病マウスにおいては、糸球体および近位尿細管で反応が認められた。また炎症性ポドプラニン陽性マクロファージと損傷尿細管内腔の分泌物の蓄積が観察され、腎炎に類似の像が観察された。腎組織における SGLT2 mRNA 量は、未処理マウスや Fn-LPS 投与マウスよりも糖尿病マウスで多く、Fn-LPS 投与糖尿病マウスで最も多かった。組織中のマクロファージや近位尿細管上皮細胞が Fn-LPS を感知し炎症反応を起こすことで SGLT2 の発現を誘導している可能性が考えられた。

口腔細菌は直接全身循環に入り容易に腎に達し免疫反応複合体が蓄積する。また Fn-LPS は TLR4 を介して強い病原性を示すことが報告されている。重度糖尿病患者の腎組織では、免疫細胞、あるいは糸球体や尿細管に異常発現した TLR2 および TLR4 を介して、血中の Fn-LPS が IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの産生を惹起する。以上の結果から、Fn は糖尿病状態で近位尿細管における SGLT2 の過剰発現を起こすことで、糖尿病の病態を悪化させることが示唆された。そして、Fn は糖尿病の増悪因子である可能性が示された。

## 論文審査結果の要旨

歯周病が糖尿病合併症や糖尿病の増悪に寄与する可能性が議論されているが、糖尿病と歯周病の相互作用に関しては未だ不明な点が多い。申請者の所属する研究グループでは、ストレプトゾトシン（STZ）誘発糖尿病マウスの頬粘膜下へ歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) のリポ多糖（lipopolysaccharide ; LPS）(Pg-LPS) を投与することで腎症を引き起こすことを報告している。Pg-LPSは主にToll様受容体（Toll-like receptor ; TLR）2経路を活性化するが、このモデルにおいてはTLR4阻害剤で腎症が抑制されたことから、弱いTLR4経路の活性は糖尿病腎臓で炎症反応を引き起こすと推測された。

近年、*Fusobacterium nucleatum* (Fn) はTLR4を強力に活性化することが示されており、本研究では、FnのLPS (Fn-LPS) が糖尿病マウスの腎近位尿細管におけるナトリウム-グルコース共輸送体2（sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2）の過剰発現を誘導することで糖尿病を増悪させる可能性を検討した。

始めにFn-LPSを精製し、ヒト単球マクロファージ様細胞株THP-1を用いて、THP-1の細胞接着性とIL-6の産生を指標に、さらにTLR4阻害剤を用いることで標品の活性を評価した。次に尿細管上皮細胞におけるSGLT2の発現を定量RT-PCR法、ELISA法、および免疫染色法で検討した。Fn-LPSあるいはマウスマクロファージ株J774.1細胞との共培養ではSGLT2の産生誘導は認められなかったが、TNF- $\alpha$ の添加、あるいはFn-LPS存在下でのJ774.1細胞との共培養では、SGLT2発現の有意な亢進が認められた。また、Fn-LPS投与糖尿病マウスでは、Fn-LPS無投与の糖尿病マウスと比較して、短期間かつ急激な血糖値の上昇を認め、血糖値も有意に高かった。未処理マウスとFn-LPS投与マウスの腎組織では、抗SGLT2抗体に対する反応がほとんど認められなかったのに対して、糖尿病マウスとFn-LPS投与糖尿病マウスでは、抗SGLT2抗体が強く反応し、特に、Fn-LPS投与糖尿病マウスにおいては、糸球体および近位尿細管で反応が認められた。また炎症性ポドプラニン陽性マクロファージと損傷尿細管内腔の分泌物の蓄積が観察され、腎炎に類似の像が観察された。腎組織におけるSGLT2 mRNA量は、未処理マウスやFn-LPS投与マウスよりも糖尿病マウスで多く、Fn-LPS投与糖尿病マウスで最も多かった。以上の結果から、Fnは糖尿病状態で近位尿細管におけるSGLT2の過剰発現を起こすことで、糖尿病の病態を悪化させることが示唆された。そして、Fnは糖尿病の増悪因子である可能性が示された。

本研究では、糖尿病環境においてはFn-LPSに対して生じた免疫応答が、腎炎につながる尿細管上皮細胞におけるSGLT2発現を亢進させることを明らかにした。得られた成果は糖尿病の増悪防止に歯周病の管理が重要であることを示す重要な知見である。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。