学位論文

Fusobacterium nucleatum 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

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 機能再生・再建科学専攻 歯科麻酔・特別支援歯学分野

関 愛子

(令和6年12月4日受付)

緒 言

歯周病が糖尿病の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不明な点が多い¹⁻⁵⁾.ナトリウム-グルコース共輸送体2 (sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2) は近位腎尿細管でのグルコース再吸収に関与 しており、血糖値制御に SGLT2 阻害薬が注目されている^{6,7)}.しかし、糖尿病環境下での 尿細管における SGLT2 増加機構は十分には解明されていない⁸⁻¹¹⁾.我々は糖尿病環境下の 腎糸球体内皮細胞は Toll 様受容体(Toll-like receptor, TLR) 2 および TLR4 を発現し、周 囲の腎小血管には発現しないことを報告した¹²⁻¹⁴⁾.

高血糖環境下では、血中タンパク質の非触媒的グルコース修飾によって終末糖化産物 (advanced glycation end products, AGEs)が生成される. AGEs は腎糸球体のような複 雑な構造を持つ臓器に蓄積して白血球を刺激し、あるいは普遍的に発現している AGE 受容 体(receptor for AGEs, RAGE)との相互作用を介した慢性刺激によって、糸球体内皮細胞 における TLR2 および TLR4 の発現を誘導することが報告されている ¹⁵⁻²². また、糖尿病 患者と動物モデルにおいて白血球と腎における TLR2 および TLR4 の発現レベルが上昇し ていることが報告されており、高血糖環境で誘導された TLR2 および TLR4 を介して腎組 織内白血球に AGEs が認識されることが示唆されている.そして、腎における TLR による AGEs の認識は、糖尿病性腎症における尿細管炎症および間質線維化を促進する候補の1つ に示唆されている ¹⁶⁻²⁷. さらには、腎微小循環系における歯周病原細菌の存在下で、腎組 織および白血球の TLR を介した炎症反応が、腎における炎症性サイトカインの産生を誘導 することが推測されている ¹⁹⁻²⁵.

我々は、歯周病原細菌の口腔内循環侵入の感染モデルとして Porphyromonas gingivalis のLPS を頬粘膜下に投与すると、ストレプトゾトシン(streptozotocin, STZ)誘発糖尿病 マウスで腎症が引き起こされることを報告した^{13,14)}. そして、P. gingivalis の LPS(Pg-LPS)を投与された糖尿病マウスは、糖尿病マウスあるいは LPS を投与された健康なマウ スの生存期間内に腎症に伴う人道的エンドポイントに到達すること、また、TLR4 阻害剤エ リトラン(eritoran)により、LPS 投与による STZ 誘発糖尿病マウスにおける腎症を抑制 することを示した¹⁴⁾. このことから、Pg-LPS は TLR2 優位リガンドであるものの、TLR4 の低レベルの活性化でも糖尿病腎症を引き起こすと推測された. 以上の結果は、TLR4 のリ ガンドは糖尿病患者に腎症を誘発する可能性があることを示唆する. よって本研究では、こ のことを検証するために、STZ 誘発糖尿病マウスおよび培養腎尿細管上皮細胞を用いて、 TLR4 の経路を強力に活性化することが報告されている Fusobacterium nucleatum LPS

(Fn-LPS) が糖尿病マウスの腎尿細管における 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.

材料と方法

1. 細胞

ヒト単球マクロファージ様細胞株(THP-1, JCRB0112, Japanese Collection of Research Bioresources, Ibaraki, Japan) およびマウス単球マクロファージ様細胞株(J774.1, JCRB0018, Japanese Collection of Research Bioresources)は、10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 にて培養した.また、C57BL/6 マウス初代近位尿細管上皮細胞(C57-6015, Cell Biologics Inc., Chicago, IL)は上皮細胞培地(M6621, Cell Biologics)で培養した. MC3T3-E1 細胞(RCB1126, RIKEN BioResource Research Center, Tsukuba, Japan)はα-MEM で培養した.

2. 細菌培養

F. nucleatum(ATCC 25586)は岐阜嫌気性培地(Code 05422, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)で嫌気性容器を用いた嫌気条件下にて 37° Cで7日間, 波長 595 nm での吸光度が 1.0 に達するまで培養した. その後, $1.0 \times 10^{\circ}$ CFU/ml に調整し, アキュレートTM NV 加 ABHK 寒天培地(Shimadzu Diagnostics Corporation, Tokyo, Japan)に 播種してコロニーを計数することで生菌数を算定した. 細菌細胞は, $4000 \times g$ で 30 分間遠 心分離して回収したペレットを 60° Cで1時間加熱することで不活性化させ, 同寒天培地上 で増殖がないことを確認した.

3. 歯周病原細菌 F. nucleatum LPS の精製

Fn-LPS は, *F. nucleatum* (ATCC 25586) から LPS 抽出キット (iNtRON Biotechnology, Inc., Seongnam, Korea) を使用して精製した. 精製 Fn-LPS の活性は, THP-1の interleukin-6 (IL-6) mRNA 発現増加と TLR4 阻害剤 TAK-242 (IC50=1.3 nM, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) による IL-6 mRNA 産生阻害を RT-PCR で分析することで評価した. 具体 的には,まず THP-1 (1.0×10^8 cells/well) を 6 穴プレートにて Fn-LPS (100 ng/ml) のみ, または Fn-LPS (100 ng/ml) および TAK-242 (1μ M) を含む RPMI1640 培地で, 24 時間培養した. 培養後,付着細胞をトリプシンで処理し,浮遊細胞とともに遠心分離で回収した. 細胞ペレットを下記に記載したリアルタイム PCR 法により解析した. Fn-LPS の収量 は, ToxinSensor (LAL Endotoxin Assay Kit, GenScript Biotech Corporation, Piscataway, NJ, USA) を用いてマイクロプレートリーダーの波長 545 nm で測定し,評価した. 以上 は, すべて製造元の指示および既報 28-30に従って実施した.

4. 細胞生存率試験

Fn-LPS (100 ng/ml), TAK-242 (1 μM), およびリコンビナントマウス TNF-α (10 pg/ml, sodium azide free, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) を含む培地で培養した細胞の生 存率は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Tokyo, Japan)の水 溶性テトラゾリウム塩 WST-8 (2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル) -5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)を使用して解析した.これらの濃度は、 データシートおよび先行研究³¹⁻³⁴⁾に従い決定した.生細胞数は、WST-8を基質として産生 されたホルマザン色素量をマイクロプレートリーダーにおける波長 450 nm の吸光度で測 定することで推定した.実験培養物の相対生存率を対照培養物の吸光度測定値に正規化し、 任意の単位で表した.

5. 細胞接着試験

精製 Fn-LPS の抗原性は、細胞の接着により評価した. Fn-LPS を培養液に添加し、単球 様 THP-1 からマクロファージ様 THP-1 に分化してシャーレに接着した細胞数を調べた. 同時に TLR4 阻害剤 TAK-242 による細胞接着阻害効果も評価した. THP-1 を 6 穴プレー トに播種し、Fn-LPS (100 ng/ml) または Fn-LPS (100 ng/ml) と TAK-242 (1 µM) を 添加後、24 時間 RPMI1640 培地にて培養した. 培養後新鮮な培地で5 回洗浄した. 6 穴プ レートに付着した細胞を WST-8 の基質を含む培地で4 時間培養し、WST-8 代謝物を吸光 度 450nm で測定し、また THP-1 から分化した付着細胞数を測定し評価した. 実験培養物 の付着細胞数を対照培養物の吸光度測定値に正規化し、任意の単位で表した.

6. 細胞活性化試験

Fn-LPS, TNF-a, および Fn-LPS 添加 J774.1 との共培養によるマウス初代近位尿細管 上皮細胞の活性化について検討した. 方法および投与量は, データシートおよび先行研究 ^{13,31,32,35-38)} に従った. 近位尿細管上皮細胞は, 24 穴プレートあるいはガラススリップを入 れた 6 穴プレートを用い, Fn-LPS (100 ng/ml) または TNF-a (10 pg/ml) (azide free, ED50: 8-50 pg/m, aa80-235; R&D Systems Inc.) を添加して, 培養した. Fn-LPS (100 ng/ml) 添加 J774.1 との共培養にはインサート (pore size 0.4um, Falcon, Thermo Fisher Scientific Inc., Chino, CA) を用いた. SGLT2 の発現は, RT-PCR, ELISA, および免疫染 色によって解析した.

7. 動物実験

すべての動物実験は、福岡歯科大学動物センターにおいて、既報 8.12-14,35,36) に従って行っ た.実験計画は福岡歯科大学動物実験倫理委員会(No.19010) によって承認された.4週齢 の雄 ICR マウス(Kyudo, Fukuoka, Japan)を使用した⁸⁾.本研究では、Fn-LPS 未投与 健常 ICR マウス(ICR 群)、Fn-LPS 投与非糖尿病マウス(LPS 群)、STZ 誘発糖尿病マウ ス(STZ 群)、および Fn-LPS 投与糖尿病マウス(STZ-LPS 群)の4群(各群 9匹)を用 いた.人道的エンドポイントはARRIVE ガイドラインに従って毎日評価し、該当するマウ スにはペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射による麻酔導入により安楽死させた. 本研究では、すべてのマウスが実験および対照データに含まれ除外はなかった.STZ 誘発 糖尿病マウスの作製法および糖尿病マウスへの LPS 投与法は、既報 ^{12-14,35,36)} に従った.吸入麻酔下のマウスに、0.05 M クエン酸緩衝液(pH 4.5) に溶解した STZ(200 mg/kg body weight; Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)を腹腔内に、また Fn-LPS を頬粘膜下にそれぞれ 1 回注射し、血糖濃度を週 2 回グルテストセンサー (Sanwa Kagaku Kenkyusyo CO., LTD. Nagoya, Japan)で測定した. 血糖値が 300 mg/dl 以上のマウスを糖尿病と判定し、血糖値が 600 mg/dl を超えるマウスを既報に従い ^{12-14,35,36},重症糖尿病モデルとして各種解析に用いた. Fn-LPS の投与量は、Pg-LPS を用いた既報 ^{39,40}と同量である 3 mg/kg とし、ICR マウスの健康状態に影響を与えないことを確認した ^{35,36}). Fn-LPS 投与糖尿病マウスの尿および血液サンプルは、マウスが人道的エンドポイントに到達した日に安楽死させ採取し、他群は Fn-LPS 投与糖尿病マウスが人道的エンドポイントに到達した日に採取した.サンプルは、尿中アルブミン(Alb)をアルブミン ELISA キット(Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, Texas, USA)で、血中尿素窒素(Blood urea nitrogen, BUN)をUrea Nitrogen Colorimetric Detection Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)で、また血中クレアチニン(Creatinine, CRE)をLabAssay(Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)を用いて分析した.

8. 定量 RT-PCR 法

THP-1のヒトIL-6 mRNA, マウス近位尿細管上皮細胞およびマウス腎臓組織中のSGLT2 と IL-6のmRNA 発現量は定量 RT-PCR 法によって行った. 6-アクチンのmRNA を対照と した. マウス腎臓組織中の全RNAは,摘出後すぐにマウス腎から採取した 5mm四方の組 織を氷上ガラス板上でメスにてペースト状に粉砕した材料をもとに,RNeasy Mini キット (Qiagen, Hilden, Germany)を製造元のプロトコルに従って使用した.抽出した RNA を テンプレートとして PrimeScriptTM RT reagent Kit (Takara, Shiga, Japan)を用いて 37℃, 15 分にて mRNA の逆転写産物である complementary DNA (cDNA)を合成した.その後, 85℃,5 秒間の加熱で逆転写酵素を不活性化した.得られた cDNA は遺伝子特異的プライ マーと PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR)分析により解析した. PCR 産物の相対レベルは Stratagene Mx3000P リアルタイム PCR システム (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA)を使用し評価した.この実験で使用した遺伝子 特異的プライマーを表1に示す.

9. 細胞 ELISA

細胞を 100%メタノールで・20°C で 5 分間固定した後、ヤギ血清(0.1%)を含む PBS ブロッキング溶液で 20°C にて 30 分間処理し、ウサギ抗マウス SGLT2(Abcam, Cambridge, UK)を含むブロッキング溶液で 4°C にて 8 時間処理した.一次抗体処理後、切片を PBS で 10 分間 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識二次抗体(Vector Elite ABC kit; Vector

Laboratories, Burlingame, CA)を含むブロッキング溶液で20℃にて1時間処理し,TMB キット(Thermo Fisher Scientific Inc.)と室温で反応させ,450 nmの吸光度変化をマイ クロプレートリーダーで測定した.SGLT2 タンパク質の相対的産生量は,TMB代謝の吸 光度とコントロールに対する標準化により評価し,任意の単位で表した.

10. 免疫組織化学染色

クライオスタットでスライドガラス上に切り出したマウス腎臓組織凍結切片 (10 μm)を, 100%メタノールで-20°C にて5分間固定後した.切片を10mM PBS で洗浄し,20°Cで30 分間ブロッキングした.一次抗体として近位尿細管識別のためにウサギ抗マウス SGLT2

(Abcam) および腎糸球体有足細胞とマクロファージ識別のために、ハムスター抗マウス ポドプラニンクローン 8.8.1 抗体 (BioLegend, San Diego, USA) を用いた. 一次抗体を 4[°]C にて 8 時間反応させた後、PBS で 10 分間×3 回洗浄し、Alexa Fluor 488/568 標識ヤギ抗 ハムスターIgG またはヤギ抗ウサギ IgG (Probes Invitrogen Com. Eugene, OR) を反応さ せた. その後、切片を 50%ポリビニルピロリドン溶液で封入し、CFI Plan Apo Lambda レ ンズシリーズと蛍光顕微鏡 (DS-Ri2/Qi2, Nikon Corp., Tokyo, Japan) で観察した. すべ ての実験は、複数の切片を用い、3 回繰り返した.

培養細胞については、THP-1 および近位尿細管上皮細胞を抗 IL-6 抗体と抗 SGLT2 抗体 にて免疫染色で解析した. 培地中に浮遊していた単球様 THP-1 は遠心分離により回収した. 一方、Fn-LPS で活性化されたマクロファージ様 THP-1 は、トリプシン処理後遠心分離に より回収した.回収した細胞ペレットを PBS に懸濁し、細胞懸濁液(10 µl) をスライドガ ラス上に置き、風乾させた.ガラス製カバースリップ上で培養した近位尿細管上皮細胞も同 様に風乾させた.これらの細胞も一次抗体までの操作を凍結切片と同様に行った. THP-1 は ウサギ抗ヒト IL-6 (Abcam)、近位尿細管上皮細胞はウサギ抗マウス SGLT2 を一次抗体と して用いた.その後、細胞を二次抗体 (Alexa Fluor 488/568 標識ヤギ抗ウサギ IgG、Probes Invitrogen) で反応させ、核は DAPI で対比染色した.細胞の染色切片は組織切片と同様に 観察した.

11. 組織切片の免疫染色領域の測定

抗 SGLT2 抗体で染色した SGLT 陽性糸球体数を蛍光顕微鏡で計測した.内腔側が抗 SGLT2 抗体で染色された近位尿細管数も計測し,SGLT2 過剰発現尿細管として判定した. SGLT2 陽性器官の相対数は,対照の ICR に対する正規化の式(Fn-ICR, STZ-ICR または Fn-STZ / ICR の器官数)に従い任意の単位で表した.すべての実験は5回繰り返した.

12. 統計解析

動物実験は、4 群 36 匹 (各群 9 匹)を用いて実施した.免疫組織染色、リアルタイム PCR および ELISA に関するすべての実験は 5 回繰り返した.データは平均値±SD で表され、

平均値は標準偏差で計算した. 統計的有意差は,STATVIEW4.51 ソフトウェア(Abacus concepts, Calabasas, CA, USA)を使用した一元配置分散分析(one-way ANOVA) および 対応のない両側 t 検定により判定した.

結果

1. 精製 Fn-LPS の抗原性評価

THP-1 は通常 TLR2 と TLR4 を発現していることが確認された(図1A). THP-1 において、細胞接着および IL-6 発現を指標に、精製 LPS の抗原性を評価した. 培養プレートに付着したマクロファージ様細胞数は Fn-LPS により有意に増加し、また、その細胞接着はTLR4 阻害剤により抑制された(図1B上段、C). Fn-LPS により IL-6 発現が見られ、またその発現は TLR4 阻害剤により抑制された(図1B下段). THP-1 の IL-6 mRNA 発現量は、Fn-LPS 処理で有意に増加し、TLR4 阻害剤で抑制された(図1D). THP-1 の生存率はFn-LPS および TLR4 阻害剤の影響を受けなかった(図1C).

2. 近位尿細管上皮細胞における SGLT2 の発現

未処理および Fn-LPS 処理した近位尿細管上皮細胞は, SGLT2 発現がほとんど観察され なかったが, TNF-α 処理した近位尿細管上皮細胞は Fn-LPS 添加 J774.1 と共培養した細 胞と同様に SGLT2 発現が観察された(図 2A). 近位尿細管上皮細胞の生存率は実験による 影響を受けなかった(図 2B, 白バー). SGLT2 タンパク質発現を ELISA にて解析したと ころ,免疫染色の結果と同様に未処理および Fn-LPS 処理, J774.1 と共培養した近位尿細 管上皮細胞の間では SGLT2 タンパク質発現量に差は無かったが, TNF-α 処理細胞は Fn-LPS 添加 J774.1 と共培養した細胞よりその発現が有意に増加した. さらに, Fn-LPS 添加 J774.1 と共培養において SGLT2 発現は有意に増加した(図 2 B). 近位尿細管上皮細胞の SGLT2 mRNA の発現解析においても,未処理と Fn-LPS 処理または J774.1 と共培養した 細胞との間で SGLT2mRNA 発現に差は無く, TNF-α 処理により SGLT2 発現が有意に増 加した. さらに, Fn-LPS 添加 J774.1 と共培養した細胞は, TNF-α 処理に比べ, 有意に発 現が増加した(図 2C).

3. Fn-LPS による血糖値および生存曲線の変化

血糖値が 300 mg/dl 以上の糖尿病状態に到達するまでの時間は, Fn-LPS 投与糖尿病マウ スでは,糖尿病マウスよりも短く,急激な血糖値上昇が認められた(図 3A, B). さらに Fn-LPS 投与糖尿病マウスの平均血糖値は糖尿病マウスよりも高値を示した(図 3C). Alb, BUN, および CRE は Fn-LPS 投与糖尿病マウスの方が他のマウスより有意に高値を示した(図 4A, B, C). 生存曲線については, Fn-LPS 投与糖尿病マウスの全個体がその他のマウスの 生存期間中に人道的エンドポイントに到達した(図 4D). 4. マウス腎組織における SGLT2 の発現

マウス腎組織における SGLT2 の発現を免疫染色にて解析した. Fn-LPS 未投与健常 ICR マウスと Fn-LPS 投与非糖尿病マウスの腎組織では、抗 SGLT2 抗体の反応はほとんど見ら れなかった.一方,糖尿病マウスと Fn-LPS 投与糖尿病マウスの腎組織では抗 SGLT2 抗体 に対する強い免疫反応が見られた(図5).糖尿病マウスと Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは, 糸球体と腎近位尿細管に抗 SGLT2 抗体陽性反応物が見られた(図 6.7). 糖尿病マウスで は、抗 SGLT2 抗体との反応物は近位尿細管外壁付近の細胞質に見られたが、Fn-LPS 投与 糖尿病マウスでは近位尿細管外壁付近および内壁の両方の細胞質で見られ、反応物は管腔 内にも拡散していた(図 7). Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは糖尿病マウスよりも近位尿細 管内腔において SGLT2 の発現が強く誘導された.また,ポドプラニン陽性の炎症性マクロ ファージが見られ、傷害を受けた尿細管の内腔に分泌物が充満していたことから、組織は腎 症であることが示唆された(図7).マウス腎組織における SGLT2 mRNA 発現の定量分析 では,糖尿病マウスは Fn-LPS 未投与健常 ICR マウスおよび Fn-LPS 投与非糖尿病マウス よりも SGLT2 mRNA の発現が増加したが、Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは糖尿病マウス よりもさらにその発現が増加した(図8A).抗SGLT2抗体陽性反応物を有する糸球体数は、 糖尿病マウスで Fn-LPS 未投与健常 ICR マウスおよび Fn-LPS 投与非糖尿病マウスよりも 多かったが,糖尿病マウスと Fn-LPS 投与糖尿病マウスの間には統計的な有意差は認めら れなかった(図 8B).一方,管腔側に抗 SGLT2 抗体陽性反応物を認めた近位尿細管数は, Fn-LPS 投与糖尿病マウスが最も多く他の群と比較して有意に増加していた(図8C).

考察

P. gingivalis は、免疫不全患者における歯周病と循環器および腎臓障害との関連について 研究されている最も重要な歯周病原細菌である.しかし、Pg-LPS の TLR4 活性化能は非常 に弱かったため、P. gingivalis よりも糖尿病増悪により強く関与する歯周病原体の同定が求 められていた^{14,35)}.近年、多くの研究者が F. nucleatum による TLR4 の活性化によって 大腸での癌や炎症が誘発されることを報告している⁴¹⁻⁴⁴⁾.したがって、F. nucleatum が糖 尿病を悪化させ、腎症を誘発する可能性があるという知見は、糖尿病と歯周炎の進行および 合併症の関係を解明する上で重要である.LPS を含む加熱不活化 F. nucleatum の実験的抗 原性および臨床病原性が報告されている^{28,29,44)}.また、マウスおよびヒトの単球マクロファ ージ様細胞株 J774.1 および THP-1 では、TLR4 を介して LPS を感知することにより、IL-6 および TNF-a が誘導されることもよく知られている^{28,29,38)}.精製 Fn-LPS の抗原性試験 では、TLR2 および TLR4 を発現する浮遊性単球様 THP-1 から分化した接着性マクロファ ージ様細胞が Fn-LPS 処理によって有意に増加し、その分化は TLR4 阻害剤によって抑制 されたことから、精製 Fn-LPS は TLR4 を介して単球を活性化できることが示された(図 1). THP-1 における IL-6 mRNA の発現量は Fn-LPS 処理によって有意に増加し, その発 現は TLR4 阻害剤によって阻害されたことから,本研究で精製した Fn-LPS の抗原性は TLR4 リガンドとして有用であることが示された(図1). 尿細管上皮細胞における SGLT2 の発現は IL-6 や TNF-a などの炎症性サイトカインによって増加することが報告されてい る³⁷⁾. 尿細管上皮細胞では, SGLT2 の発現は Fn-LPS の影響を受けなかったが, TNF-a 処 理によって増加した. Fn-LPS 添加 J774.1 と共培養した細胞は,炎症性サイトカインによ り SGLT2 発現がさらに増加した(図2). これまでの研究では, TLR2 および TLR4 の発現 は糸球体や尿細管上皮細胞では通常観察されないが,糖尿病状態のヒトやマウスの体細胞 組織では報告されている^{12,13)}. 炎症を起こした尿細管上皮細胞が TLR4 を介して病原体を 感知し,炎症性サイトカインを産生するという報告もある^{15,45,46)}. 以上の結果から,尿細管 上皮細胞の SGLT2 発現は, TLR4 を介して Fn-LPS を感知するマクロファージなどの免疫 細胞に由来する TNF-a などの炎症性サイトカインによって誘導されることを示唆している. SGLT2 の過剰発現は,糖尿病状態の尿細管上皮細胞自体に発現している TLR4 による Fn-LPS の認識によって起こる可能性がある.

歯周病が歯周組織循環の観点から糖尿病増悪の重要な危険因子であることを示唆する報告がある¹⁻⁵⁾.本研究では糖尿病モデルマウスの頬粘膜下に Fn-LPS を投与したところ,通常の糖尿病モデルマウスと比較して血糖値の急上昇を伴い糖尿病状態に至る時間が短縮した(図3).このことから,*F. nucleatum*の感染が糖尿病増悪の促進を可能にすることが示唆された.*P. gingivalis*が糖尿病モデルマウスの腎組織における TLR2 の異常な免疫反応により重篤な糖尿病性腎症を惹起することを報告した¹⁴⁾.*F. nucleatum*の検出レベルは糖尿病非罹患患者よりもコントロール不良の糖尿病患者で高く,*F. nucleatum*は胎児死亡⁴⁷⁾や大腸などの TLR4を介した強力な炎症⁴¹⁻⁴⁴⁾を引き起こすことが報告されている.さらに,Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは,他の対照マウスよりも尿中アルブミン値と血中 BUN および CRE 値が有意に高値であったことから,*F. nucleatum*が関連する腎の炎症は糖尿病増悪因子であることだけでなく糖尿病腎症を誘発する危険因子でもあると考えられる.Fn-LPS 投与糖尿病マウスは他の対照マウス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,Fn-LPS が致死因子となったことを示している(図4).

これまでに Pg-LPS が糖尿病マウス腎臓において SGLT2 を含む複数の分子の異常な発現 誘導を引き起こし、重篤な腎症を誘導することを報告してきた^{12-14,35,36)}. 腎組織において、 免疫染色では、SGLT2 の発現は Fn-LPS の有無にかかわらず健康なマウスではほとんど見 られなかった.しかし、糖尿病マウスおよび Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは腎近位尿細管 および糸球体の両方で発現が認められた(図 5,6,7).また,*in vitro*実験モデルの結果(図 2)から考えると、糖尿病条件下で腎は、炎症細胞または炎症を起こした糸球体・尿細管細 胞自体の TLR2 および TLR4 を介して Fn-LPS を感知し、SGLT2 の過剰発現を誘導する可 能性が示唆された.SGLT2 の発現は通常近位尿細管上皮細胞の刷子縁側で認めされること が報告されている^{48,49)}. 健常組織では SGLT2 の発現は免疫染色で検出されるレベルには達 しないが,高血糖環境下では過剰な発現が認められた.糖尿病マウスでは近位尿細管の基底 側における SGLT2 の集積が有意に増加し,Fn-LPS 投与糖尿病マウスでは管腔側への輸送 および管腔内への SGLT2 の拡散が顕著に観察された(図7).また,核近傍の粗面小胞体に 存在する SGLT2 は基底側に一時的に貯蔵された後,管腔側に移動し,腎尿細管を流れるグ ルコースの再吸収に関与すると考えられる^{46,47)}.重症糖尿病マウスの腎臓では,尿細管間 に多数のポドプラニン陽性マクロファージが認められた(図7).これらのマクロファージ や尿細管上皮細胞が Fn-LPS を感知し,炎症反応を引き起こすことで SGLT2 の異常発現に 寄与している可能性がある.腎 SGLT2 の mRNA 量は健常マウスに比べ糖尿病マウスで増 加し,Fn-LPS 投与によりさらに有意に増加していた(図8).糸球体の SGLT2 発現には Fn-LPS 投与によりさらに有意に増加していた(図8).糸球体の SGLT2 発現には SGLT2 の内腔への拡散が Fn-LPS 投与により有意に増加していた(図8).以上の結果か ら,Fn-LPS は,糖尿病環境下で感染感受性が高まった尿細管上皮細胞やマクロファージの 炎症反応を介して SGLT2 発現を促進する可能性が示唆された.

ロ腔内細菌は直接全身循環に入ることで容易に腎臓に到達し、免疫反応複合体が腎臓に 蓄積する一方,腸内細菌は腸肝循環を肝臓に到達して速やかに殺菌される 370.健常状態で は糸球体毛細血管は TLR2 および TLR4 をほとんど発現しないが,糖尿病条件下で異常発 現した TLR2 および TLR4 が循環中の歯周病菌を感知し,炎症性サイトカイン産生を引き 起こすことで糖尿病性腎症を誘導する 8^{11,33,35,36,50} (図 9). *F. nucleatum* は TLR4 に対し 強い病原性を示すことが報告されており,糖尿病腎条件下で過剰発現した糸球体や白血球 上の TLR4 が Fn-LPS を認識することで腎炎症を誘導すると考えられる. この結果,炎症 性サイトカインの産生が促進され,糸球体や腎近位尿細管での SGLT2 の異常発現が引き起 こされる 35-38) (図 9). SGLT2 は腎機能障害により代謝されずに蓄積し,IL-6 や TNF- α な どの炎症性サイトカインが腎炎の進行とともに糖尿病腎での SGLT2 の過剰発現をさらに 誘導する 6.7.44.51.52).本研究の結果から,糖尿病状態で感染感受性が亢進した患者では,尿 細管上皮細胞が Fn-LPS を感知し,SGLT2 の発現増加を亢進させ,尿細管間質性腎炎を引 き起こす可能性が示唆された(図 9). 慢性的な高血糖を伴う糖尿病患者では SGLT2 が増 加することから,歯周炎による SGLT2 の過剰発現はさらなる糖尿病増悪因子となる可能性 が示唆された.

結論

F. nucleatum は糖尿病状態下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.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 懇篤なるご指導とご校閲を賜りました岡山大学学術研究院歯薬学域 歯科麻酔・特別支援歯科学分野宮脇卓也教授に深甚なる感謝の意を表します.また, 懇切な るご校閲と本研究の遂行に際しご指導いただきました岡山大学学術研究院歯薬学域口腔機 能解剖学分野沢禎彦教授に謹んで感謝の意を表します.さらに,本研究に際し多くのご配慮, ご助言をいただきました岡山大学学術研究院歯薬学域口腔機能解剖学分野の寺町順平准教 授に厚く御礼申し上げます.最後に,本研究を行うにあたり種々のご援助とご協力をいただ きました岡山大学病院スペシャルニーズ歯科センター江草正彦教授をはじめ諸先生方に謹 んで感謝の意を表します.

- Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, Rengo G. Periodontal Disease: a risk factor for diabetes and cardiovascular disease. Int J Mol Sci. 2019; 20(6): 1414
- Garcia RI, Henshaw MM, Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. Periodontol 2000. 2001; 25: 21-36.
- 3) Olsen I. From the Acta Prize Lecture 2014: the periodontal-systemic connection seen from a microbiological standpoint. Acta Odontol Scand. 2015; 73(8): 563-568.
- Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. J Evid Based Dent Pract. 2012; 12(3 Suppl): 20-28.
- 5) Wu T, Trevisan M, Genco RJ, Dorn JP, Falkner KL, Sempos CT. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. Arch Intern Med. 2000; 160(18): 2749-2755.
- 6) Yaribeygi H, Butler AE, Atkin SL, Katsiki N, Sahebkar A. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and inflammation in chronic kidney disease: possible molecular pathways. J Cell Physiol. 2018; 234(1): 223-230.
- 7) Wang XX, Levi J, Luo Y, Myakala K, Herman-Edelstein M, Qiu L, Wang D, Peng Y, Grenz A, Lucia S, Dobrinskikh E, D'Agati VD, Koepsell H, Kopp JB, Rosenberg AZ, Levi M. SGLT2 protein expression is increased in human diabetic nephropathy: sglt2 protein inhibition decreases renal lipid accumulation, inflammation, and the development of nephropathy in diabetic mice. J Biol Chem. 2017; 292(13): 5335-5348.
- 8) Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. Diabetes. 2005; 54(12): 3427-3434.
- Abdul-Ghani MA, Norton L, Defronzo RA. Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. Endocr Rev. 2011; 32(4): 515-531.
- 10) Wilding JP. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. Metabolism. 2014; 63(10): 1228-1237.

- 11) Górriz JL, Navarro-González JF, Ortiz A, Vergara A, Nuñez J, Jacobs-Cachá C, Martínez-Castelao A, Soler MJ. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition: towards an indication to treat diabetic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2020; 35(Suppl 1): i13-i23.
- 12) Takata S, Sawa Y, Uchiyama T, Ishikawa H. Expression of toll-like receptor 4 in glomerular endothelial cells under diabetic conditions. Acta Histochem Cytochem. 2013; 46(1): 35-42.
- 13) Sawa Y, Takata S, Hatakeyama Y, Ishikawa H, Tsuruga E. Expression of toll-like receptor 2 in glomerular endothelial cells and promotion of diabetic nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. PLoS One. 2014; 9(5): e97165.
- 14) Kajiwara K, Takata S, To TT, Takara K, Hatakeyama Y, Tamaoki S, Darveau RP, Ishikawa H, Sawa Y. The promotion of nephropathy by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide via toll-like receptors. Diabetol Metab Syndr. 2017; 9: 73.
- 15) Cheng A, Dong Y, Zhu F, Liu Y, Hou FF, Nie J. AGE-LDL activates Toll like receptor 4 pathway and promotes inflammatory cytokines production in renal tubular epithelial cells. Int J Biol Sci. 2013; 9(1): 94-107.
- 16) Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. Diabetes. 2008; 57(11): 3090-3098.
- 17) Devaraj S, Tobias P, Kasinath BS, Ramsamooj R, Afify A, Jialal I. Knockout of tolllike receptor-2 attenuates both the proinflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; 31(8): 1796-1804.
- 18) Li F, Yang N, Zhang L, Tan H, Huang B, Liang Y, Chen M, Yu X. Increased expression of toll-like receptor 2 in rat diabetic nephropathy. Am J Nephrol. 2010; 32(2): 179-186.
- 19) Lin M, Yiu WH, Wu HJ, Chan LY, Leung JC, Au WS, Chan KW, Lai KN, Tang SC. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2012; 23(1): 86-102.
- 20) Mudaliar H, Pollock C, Komala MG, Chadban S, Wu H, Panchapakesan U. The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. Am J Physiol Renal Physiol. 2013; 305(2): F143-154.
- 21) Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. Diabetes Care. 2010;

33(4): 861-868.

- 22) Jialal I, Major AM, Devaraj S. Global toll-like receptor 4 knockout results in decreased renal inflammation, fibrosis and podocytopathy. J Diabetes Complications. 2014; 28(6): 755-761.
- 23) Kaur H, Chien A, Jialal I. Hyperglycemia induces Toll like receptor 4 expression and activity in mouse mesangial cells: relevance to diabetic nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol. 2012; 303(8): F1145-1150.
- 24) Van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of tolllike receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). Angiogenesis. 2008; 11(1): 91-99.
- Wong FS, Wen L. Toll-like receptors and diabetes. Ann N Y Acad Sci. 2008; 1150: 123-132.
- 26) Feng Y, Yang S, Ma Y, Bai XY, Chen X. Role of Toll-like receptors in diabetic renal lesions in a miniature pig model. Sci Adv. 2015; 1(5): e1400183.
- 27) Ma J, Chadban SJ, Zhao CY, Chen X, Kwan T, Panchapakesan U, Pollock CA, Wu H. TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. PLoS One. 2014; 9(5): e97985.
- 28) Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, Ishimaru N, Kudo Y. Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fusobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral cancer cells. Sci Rep. 2021; 11(1): 14943.
- 29) Koike R, Cueno ME, Nodomi K, Tamura M, Kamio N, Tanaka H, Kotani A, Imai K. Heat-killed *fusobacterium nucleatum* triggers varying heme-related inflammatory and stress responses depending on primary human respiratory epithelial cell type. Molecules. 2020; 25(17): 3839.
- 30) Shabir K, Gharanei S, Orton S, Patel V, Chauhan P, Karteris E, Randeva HS, Brown JE, Kyrou I. Asprosin exerts pro-inflammatory effects in THP-1 macrophages mediated via the toll-like receptor 4 (tlr4) pathway. Int J Mol Sci. 2022; 24(1): 227.
- 31) Yang S, Sugawara S, Monodane T, Nishijima M, Adachi Y, Akashi S, Miyake K, Hase S, Takada H. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. Infect Immun. 2001; 69(4): 2025-2030.

- 32) Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, Nishiyama N. Role of TNF-α and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure. J Toxicol Sci. 2008; 33(1): 71-83.
- 33) Sawa Y, Ueki T, Hata M, Iwasawa K, Tsuruga E, Kojima H, Ishikawa H, Yoshida S. LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. J Histochem Cytochem. 2008; 56(2): 97-109.
- 34) Takenawa T, Kanai T, Kitamura T, Yoshimura Y, Sawa Y, Iida J. Expression and dynamics of podoplanin in cultured osteoblasts with mechanostress and mineralization stimulus. Acta Histochem Cytochem. 2018; 51(1): 41-52.
- 35) Kajiwara K, Sawa Y. Overexpression of SGLT2 in the kidney of a *P. gingivalis* LPSinduced diabetic nephropathy mouse model. BMC Nephrol. 2021; 22(1): 287.
- 36) Kajiwara K, Sawa Y, Fujita T, Tamaoki S. Immunohistochemical study for the expression of leukocyte adhesion molecules, and FGF23 and ACE2 in *P. gingivalis* LPS-induced diabetic nephropathy. BMC Nephrol. 2021; 22(1): 3.
- 37) Maldonado-Cervantes MI, Galicia OG, Moreno-Jaime B, Zapata-Morales JR, Montoya-Contreras A, Bautista-Perez R, Martinez-Morales F. Autocrine modulation of glucose transporter SGLT2 by IL-6 and TNF-alpha in LLC-PK (1) cells. J Physiol Biochem. 2012; 68(3): 411-420.
- 38) Kim YK, Hwang JH, Lee HT. Differential susceptibility to lipopolysaccharide affects the activation of toll-like-receptor 4 signaling in THP-1 cells and PMA-differentiated THP-1 cells. Innate Immun. 2022; 28(3-4): 122-129.
- 39) Li Q, Li L, Fei X, Zhang Y, Qi C, Hua S, Gong F and Fang M. Inhibition of autophagy with 3-methyladenine is protective in a lethal model of murine endotoxemia and polymicrobial sepsis. Innate Immun. 2018; 24(4): 231-239.
- 40) Mémain N, Arvaniti K, Bruneel F, Leport C, Wolff M, Regnier B. Septic shock with liver abscess in an immunocompetence patient. Presentation of an unusual Fusobacterium nucleatum infection. Presse Med. 2001; 30(36): 1777-9.
- 41) Li G, Sun Y, Huang Y, Lian J, Wu S, Luo D, Gong H. *Fusobacterium nucleatum*derived small extracellular vesicles facilitate tumor growth and metastasis via TLR4 in breast cancer. BMC Cancer. 2023; 23(1): 473.
- 42) Kong C, Yan X, Zhu Y, Zhu H, Luo Y, Liu P, Ferrandon S, Kalady MF, Gao R, He J, Yin F, Qu X, Zheng J, Gao Y, Wei Q, Ma Y, Yan-Liu J, Qin H. *Fusobacterium nucleatum* promotes the development of colorectal cancer by activating a

cytochrome p450/epoxyoctadecenoic acid axis via TLR4/Keap1/NRF2 signaling. Cancer Res. 2021; 81(17): 4485-4498.

- 43) Engevik MA, Danhof HA, Ruan W, Engevik AC, Chang-Graham AL, Engevik KA, Shi Z, Zhao Y, Brand CK, Krystofiak ES, Venable S, Liu X, Hirschi KD, Hyser JM, Sprinler JK, Britton RA, Versalovic J. *Fusobacterium nucleatum* Secretes Outer Membrane Vesicles and Promotes Intestinal Inflammation. mBio. 2021; 12(2): e02706-20.
- 44) Yang Y, Weng W, Peng J, Hong L, Yang L, Toiyama Y, Gao R, Liu M, Yin M, Pan C, Li H, Guo B, Zhu Q, Wei Q, Moyer MP, Wang P, Cai S, Goel A, Qin H, Ma Y. *Fusobacterium nucleatum* increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor-kb, and up-regulating expression of microRNA-21. Gastroenterology. 2017; 152(4): 851-866.e824.
- 45) Li M, Khan AM, Maderdrut JL, Simon EE, Batuman V. The effect of PACAP38 on MyD88-mediated signal transduction in ischemia-/hypoxia-induced acute kidney injury. Am J Nephrol. 2010; 32(6): 522-532.
- 46) Ding Y, Yang H, Xiang W, He X, Liao W, Yi Z. CD200R1 agonist attenuates LPSinduced inflammatory response in human renal proximal tubular epithelial cells by regulating TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF-κB and MAPK pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2015; 460(2): 287-294.
- 47) Han YW. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen. Curr Opin Microbiol. 2015; 23: 141-147.
- 48) Vestri S, Okamoto MM, de Freitas HS, Aparecida Dos Santos R, Nunes MT, Morimatsu M, Heimann JC, Machado UF. Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. J Membr Biol. 2001; 182(2): 105-112.
- 49) Tabatabai NM, Sharma M, Blumenthal SS, Petering DH. Enhanced expressions of sodium-glucose cotransporters in the kidneys of diabetic Zucker rats. Diabetes Res Clin Pract. 2009; 83(1): e27-30.
- 50) Syed MM, Phulwani NK, Kielian T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia. J Neurochem. 2007; 103(4): 1461-1471.
- 51) Freitas HS, Anhê GF, Melo KF, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Bordin S, Machado

UF. Na(+)-glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity. Endocrinology. 2008; 149(2): 717-724.

52) Ghezzi C, Loo DDF, Wright EM. Physiology of renal glucose handling via SGLT1, SGLT2 and GLUT2. Diabetologia. 2018; 61(10): 2087-2097.

脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯科麻酔・特別支援歯学分野 (指導:宮脇卓也教授)

図の説明

図 1. THP-1 に対する Fn-LPS の抗原性の解析

(A) ヒト単球マクロファージ様 THP-1 に対する TLR2 および TLR4 の免疫染色.(B) 細胞接着試験および IL-6 発現.未処理細胞(cont), Fn-LPS(LPS), Fn-LPS+TLR4 拮抗薬 TAK-242(LPS+TAK)を添加処理した.核は DAPI(青)で対比染色した.下段:上記処理した細胞を全て回収し, IL-6 発現(赤)を免疫染色にて解析した.スケールバー:100 um.

(C) 付着細胞量の定量的解析. 付着細胞量は, 細胞計数キットで測定し(黒バー; 培養細胞, 白バー; 生細胞). (D) IL-6 mRNA 発現の定量的解析. IL-6 mRNA はリアルタイム PCR にて解析し, 全てのデータを未処理細胞(cont)に対して正規化した. (P<0.01)

図 2. 近位尿細管上皮細胞における SGLT2 の発現

(A) 抗 SGLT2 抗体による免疫染色. MC3T3-E1 細胞,未処理細胞(cont), Fn-LPS 処理 (LPS), TNF-α 処理(TNF-α) および Fn-LPS 添加 J774.1 (J774.1+LPS) と共培養した 近位尿細管上皮細胞における SGLT2 免疫染色(赤).核は DAPI(青)で対比染色した.ス ケールバー:100 μm.(B) SGLT2 タンパク質発現量の定量的解析. SGLT2 の発現量を ELISA で測定した(黒バー). 白バーは核細胞の細胞増殖を WST8 で解析した.全てのデ ータは,未処理の対照細胞(cont)に対する相対値として示した.(P<0.01)(C) SGLT2 mRNA の発現解析.発現量は β-アクチン cDNA に対して正規化した.(P<0.01)

図3. 血糖値の定量的解析

(A) STZ 誘導性糖尿病マウス: STZ-Fn(−) (B) Fn-LPS 投与糖尿病マウス: STZ-Fn(+) (C)
各マウスの平均血糖値. STZ 誘導性糖尿病マウス (破線) Fn-LPS 投与糖尿病マウス (実線)

図 4. 尿検査値および生存曲線の定量的解析

 (A) 尿中 Alb 値(B) 血中 BUN 値(C) 血中 CRE 値(D) 生存曲線の比較. Fn-LPS 未 投与健常 ICR マウス, Fn-LPS 投与非糖尿病マウス, STZ 誘導性糖尿病マウス(破線), Fn-LPS 投与糖尿病マウス(実線).

図 5. マウス腎組織における SGLT2 発現

各マウス腎組織凍結切片を作成し,抗 SGLT2 抗体(赤)および抗ポドプラニン抗体(緑) による免疫染色.核を DAPI(青)で対比染色した.上段は HE 染色を示す.矢印は近位尿 細管における SGLT2 陽性反応物を,矢頭は SGLT 2 陽性糸球体を示す.スケールバー:100 μm.

図 6. 糸球体における SGLT2 発現

各マウス腎組織凍結切片を作成し,抗 SGLT2 抗体 (赤) および抗ポドプラニン抗体 (緑) により免疫染色した. 核を DAPI (青) で対比染色した. 上段は HE 染色を示す. 矢印は SGLT2 陽性反応物を示す. スケールバー: 20 μm.

図 7. 近位尿細管における SGLT2 発現分布

各マウス腎組織凍結切片を作成し,抗 SGLT2 抗体 (赤) および抗ポドプラニン抗体 (緑) により免疫染色した.核は DAPI (青) で対比染色した.上段は HE 染色を示す.矢印は近 位尿細管の基底部付近細胞質に認められる SGLT2 反応物を示す.アスタリスクは近位尿細 管内腔の SGLT2 陽性反応物を示す.矢頭は炎症性マクロファージにおけるポドプラニン陽 性反応物を示す.スケールバー:20 μm.

図 8. マウス組織における SGLT2 発現の定量的解析

(A)各群マウス腎組織における SGLT2mRNA の発現をリアルタイム PCR にて解析した.
(P<0.01)(B, C)免疫染色画像を基に,SGLT2 陽性糸球体数および SGLT2 陽性近位尿細管数を計測した.

図 9. 歯周炎による糖尿病および腎症増悪の機序

糖尿病状態で生成され循環系を流れる AGEs は糸球体に蓄積し, TLR2 および TLR4 の過 剰発現を誘導する(点線).糖尿病患者が歯周病(実線)や大腸・肝臓機能低下(破線)を 有する場合,循環系から糸球体に入り込んだ歯周炎由来病原体が腎臓および TLR2 および TLR4 を介して病原体を認識する免疫細胞において,炎症性サイトカインおよび白血球接着 分子の産生を誘導する.

表1 プライマーセット

gene	bp	Upper (5`-3`)	Lower (5`-3`)
human IL-6	101	CTGGATTCAATGAGGAGACTTGCC	CTCACTACTCTCAAATCTGTTCTGGA
mouse IL-6	263	ATGTTCTCTGGGAAATCGTGGAAAT	TCTCTGAAGGACTCTGGCTTTGT
mouse SGLT2	209	CCCATCCCTCAGAAGCATCTCC	CTCATCCCACAGAACCAAAGCA
mouse β-actin	441	GTTCTACAAATGTGGCTGAGGA	ATTGGTCTCAAGTCAGTGTACAG
human β-actin	495	ATGTTTGAGACCTTCAACAC	CACGTCACACTTCATGATGG