

**金田博夫研究助成基金  
研究成果報告書  
(第5版)**

**一般財団法人サンスター財団  
2025年4月**

# 目次

---

## 研究報告

1	歯科医師 新城 尊徳 .....	3
---	------------------	---

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

2	歯科医師 辻 忠孝 .....	15
---	-----------------	----

Harvard Medical School

Joslin Diabetes Center

選考委員一覧 .....	22
--------------	----

受給者一覧 .....	23
-------------	----

# 研究報告

---

1

齒科醫師 **新城 尊德**

九州大学大学院齒学研究院

口腔機能修復学講座齒周病学分野

2

齒科醫師 **辻 忠孝**

Harvard Medical School

Joslin Diabetes Center

## 歯肉線維芽細胞におけるインスリン抵抗性が歯周炎増悪に寄与する役割の解明

新城 尊徳

申請時：九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

現在：九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

### 要旨

肥満・糖尿病は歯周病の罹患率を上昇させるとともに、病態（歯周炎）の進行に寄与することが広く知られている<sup>1)</sup>。多くの糖尿病合併症・併存疾患において局所的なインスリン抵抗性がそれらの病態形成・進行に関与することが明らかとなりつつある<sup>2)</sup>が、糖尿病併存疾患である歯周病については、歯肉局所におけるインスリン抵抗性が歯周炎の進行にどのような影響をもたらすかは不明であった。本研究では、歯肉構成細胞におけるインスリン抵抗性が歯周炎病態進行に果たす役割を検討することを目的に、歯肉線維芽細胞でのインスリン受容体の欠損が確認された SM22α 陽性細胞特異的インスリン受容体欠損(SMIRKO)マウスに実験的歯周炎を惹起した。野生型 (WT) と比較して、SMIRKO マウスでは実験的歯周炎を惹起して 14 日後の歯槽骨吸収が有意に増大した。その原因として、好中球浸潤と炎症誘導の遅延が特徴として見られた。各マウスから外部培養した歯肉線維芽細胞における感染・炎症刺激に応答した好中球遊走因子 CXCL1 の産生量は、WT マウス由来の細胞と比較して、SMIRKO マウス由来の細胞では NF-κB 経路の活性化低下に伴い、有意に低下していた。一方、CXCL1 を歯肉局所へのアデノウイルス投与により強制発現すると、実験的歯周炎を惹起した SMIRKO マウスの歯槽骨吸収は有意に抑制され野生型並みに抑えられたことから、SMIRKO マウスで観察された歯周炎の増悪は、歯肉線維芽細胞の CXCL1 産生低下に伴う好中球の呼び込みが不十分であるために炎症が遷延化し、歯周組織の破壊が増大したと考えられた。SMIRKO マウスでの所見の多くが、高脂肪食負荷マウスでの歯周炎病態での変化と近似していた。一連の結果より、歯肉局所のインスリン抵抗性は肥満・糖尿病下において、糖・脂質代謝異常とは独立した歯周炎の病態進行に寄与する因子であることが明らかとなった。

### 内容

#### 本研究の背景：

肥満・糖尿病では歯周炎の罹患率が高く、また病態が進行しやすいことが、多くの疫学研究や基礎研究から明らかとなっている<sup>1,3)</sup>。この機序としては、高血糖に長期間曝露することによる免疫機能異常や、酸化ストレスの増大、骨質の低下など、あるいは脂質異常症に伴う慢性炎症といった要因が、病態進行に寄与すると認識されている<sup>4)</sup>。また、肥満や糖尿病ではインスリン作用が減弱し、いわゆるインス

リン抵抗性状態にあるが、基本的にインスリン抵抗性は、上述の糖・脂質異常やそれに伴う慢性炎症の結果誘発される二次的な病態であるとの認識が主であった。ところが、近年のインスリン作用に関する精力的な研究により、糖尿病合併症や併存疾患の病態形成に、臓器や組織における「局所的な」インスリン抵抗性が重要な役割を果たすことが明らかとなった<sup>2)</sup>。

肥満や糖尿病患者だけでなく、非肥満・非糖尿病であっても、インスリン抵抗性状態にある人は、歯周炎の有意な進行が見られることが示されている<sup>5)</sup>。また、筆者が留学していた King 研究室の先行研究より、肥満に伴って歯肉でもインスリン抵抗性が惹起することが示され、肥満や糖尿病で歯周炎が増悪する機序の一端としてインスリン抵抗性の関与が示唆された<sup>6)</sup>。

しかしながら、歯肉は歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞をはじめ、血管内皮細胞や免疫細胞などの多数の細胞種から構成されており、具体的にどの歯肉構成細胞におけるインスリン抵抗性が歯周炎の病態にどのように寄与するかは不明であった。そこで、ちょうど King 研究室で血管平滑筋をターゲットに動脈硬化研究に用いられていた SM22a 陽性細胞特異的インスリン(IR)受容体欠損(SMIRKO)マウスに着目し、歯肉線維芽細胞では SM22a が発現していることから、SMIRKO マウスの歯肉線維芽細胞では IR が欠損していることを見出し、このマウスと同腹仔野生型 (WT)、そして高脂肪食負荷マウスを用いて検討を行った。

#### 目的：

歯肉線維芽細胞におけるインスリン抵抗性が、肥満・糖尿病に関連した歯周炎の進行にどのような役割を果たすかを明らかにする。

#### 研究方法：

##### 《マウス実験》

14 週齢の雄性 SM22a-Cre<sup>+/-</sup>-IR<sup>fl/fl</sup> (SMIRKO) マウスと同腹仔 WT マウス (図.1A)、さらに 8 週間の 60%高脂肪食負荷をした WT (HFD) マウスに、通法に従い上顎第 2 臼歯に 7-0 絹糸を結紮して実験的歯周炎を惹起した。結紮から 4, 7, 14 日後に歯肉を採取あるいは組織切片を作成するなどして各種解析を行った。

##### 《細胞実験》

WT、SMIRKO、HFD マウスから歯肉線維芽細胞を外部培養した。

#### 本研究の成果：

##### ① SMIRKO マウスの歯肉では IR 発現が低下してインスリン抵抗性が見られ、かつ歯周炎が増悪する

SMIRKO マウスの歯肉では、WT マウスと比較して、IR 発現が約 70%低下していたが、IGF-1R 発現は変化がなかった (図.1B)。次に、WT、SMIRKO マウスの歯肉を採取して、ex vivo でインスリン刺激 (1,10,100 nM) を行い、10 分後のインスリンシグナルを確認したところ、WT マウスと比較

して、SMIRKO マウスの歯肉では、インスリン刺激による Akt リン酸化が約 50%強ほど有意に低下していたが、Erk リン酸化には有意差は見られなかった (図.1C)。

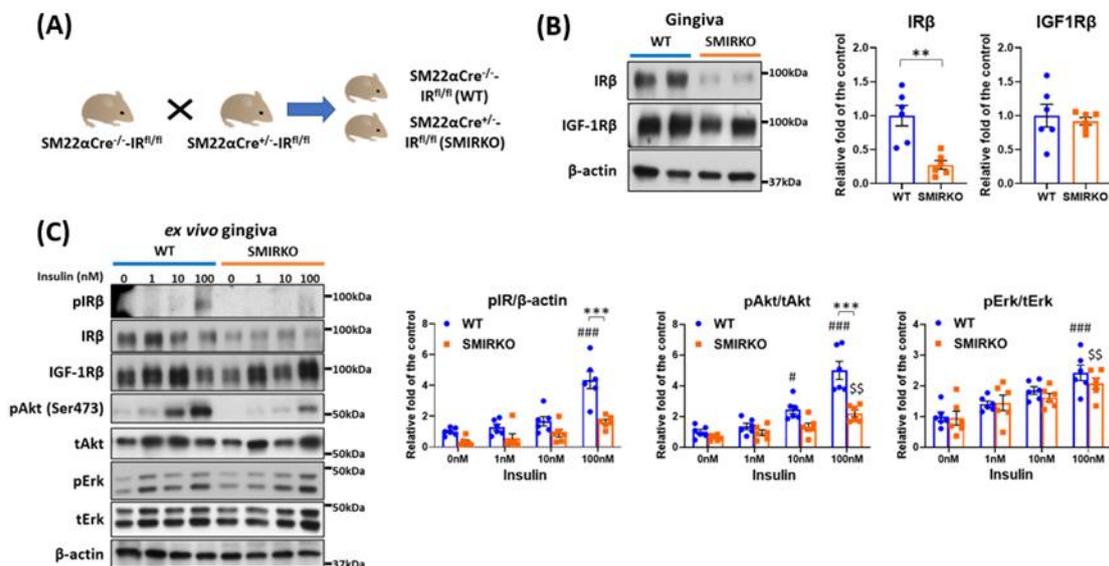


図 1. WT・SMIRKO マウスにおける歯肉 IRβ 発現とインスリンシグナルの比較解析

(A)WT・SMIRKO マウスの作成。

WT・SMIRKO マウス歯肉における(B)IRβ および IGF1Rβ 発現と、(C)インスリンシグナル。

次に、WT・SMIRKO マウスに実験的歯周炎を誘発し、歯槽骨吸収の推移を確認した。WT マウスでは 7 日後までは歯槽骨が急速に吸収され、その後 14 日目までは緩やかに進行するのに対して、SMIRKO マウスでは、4 日後の歯槽骨吸収は WT マウスよりもむしろ緩やかに起きる一方で、その後急激な歯槽骨吸収の進行が見られ、14 日後には約 2 倍の歯槽骨吸収量を呈することが分かった (図.2A)。実験的歯周炎惹起から 14 日後の時点では、歯槽骨周囲の TRAP 染色で検出した破骨細胞数は WT マウスと比して SMIRKO マウスで有意に高値であった (図.2B)。一方で、WT マウスと SMIRKO マウスの骨髄由来破骨前駆細胞の破骨細胞分化能には差は見られず、炎症反応などの外部要因によって歯槽骨吸収が促進された可能性が示唆された。また、興味深いことに、HFD マウスの歯槽骨吸収パターンや破骨細胞検出結果は、SMIRKO マウスのそれらと類似したものであることが確認された (図.2C,D)。

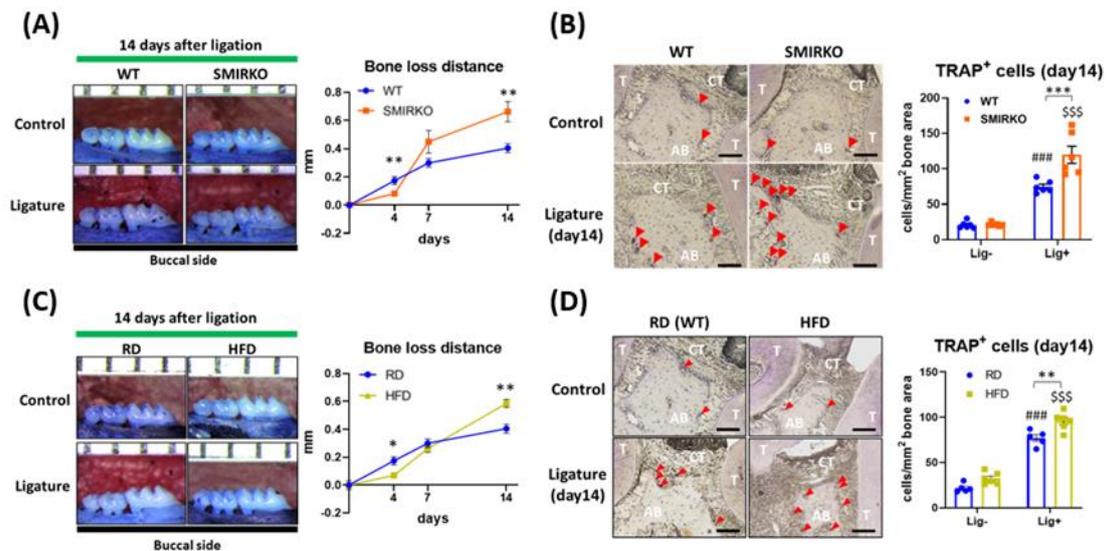


図 2. WT-SMIRKO マウスおよび HFD マウスの実験的歯周炎に伴う歯槽骨吸収

WT-SMIRKO マウスにおける(A)結紮 14 日後までの歯槽骨吸収量の推移、

(B)結紮 14 日後の歯槽骨周囲の破骨細胞の検出。

通常食(RD)および高脂肪食(HFD)負荷 WT マウスにおける(C)結紮 14 日後までの歯槽骨吸収の推移、

(D)結紮 14 日後の歯槽骨周囲の破骨細胞の検出。

## ② SMIRKO マウスでは、歯周炎初期における好中球の遊走が遅延する

歯肉組織中の細菌由来遺伝子の検出レベルは、4 日目で SMIRKO マウスの方が WT マウスよりも高く、感染がより起きていることが示唆された (図.3A)。また、歯周炎部位へ浸潤してきた免疫細胞をフローサイトメトリー法で検出したところ、WT マウスでは、歯周炎誘発後 4 日目で好中球数がピークを迎え、それから 14 日に至るまで低下したが、SMIRKO マウスでは、歯周炎誘発 4 日目の好中球数の増加の立ち上がりが遅く、14 日目によやく WT マウスでの 4 日目 (ピーク) の値近くまで増加するパターンを示し、好中球浸潤の遅延が起きていることが示された (図.3B)。また、単球に関しては、WT マウスでは歯周炎誘発後 7 日目でピークを示し、14 日目では低下するパターンを示したが、SMIRKO マウスでは 14 日目でも低下は見られず、炎症反応が遅延していることが示唆された (図.3B)。

歯周炎に関連した好中球遊走因子として、CXCL1 が知られているが、WT マウスでは結紮から 4 日後で CXCL1 発現はピークを迎え、7, 14 日と経るにしたがって発現は低下したが、SMIRKO では 4 日後での CXCL1 発現は減弱しており、以後 14 日目まで緩やかに低下をするパターンを示した (図.3C)。TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$ 、IL-17a などの主要な炎症性伝子発現については、いずれも WT マウスと比べて、SMIRKO マウスでは発現パターンが全体的に遅延して起こることが示された (図.3C)。

HFD マウスでは、おおむね歯肉中の細菌 DNA が通常食負荷 WT (RD) よりも高値を示し、歯周炎惹起後の十分な細菌のクリアランスが見られない結果が得られた (図.3D)。また、HFD マウスの歯周炎に伴う好中球浸潤パターンは、SMIRKO マウスと類似した形を示した (図.3E)。さらに、HFD マウスの歯周炎惹起前の CXCL1 発現は、WT マウスよりもすでに有意に高かったが、実験的歯周炎に

応答した CXCL1 発現は十分に誘導されず、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-17a の発現パターンについても、SMIRKO マウスと同様に遅延して誘導されていた (図.3F)。

これらの結果より、SMIRKO・HFD マウスでは、実験的歯周炎に反応した好中球浸潤が遅延することが示された。

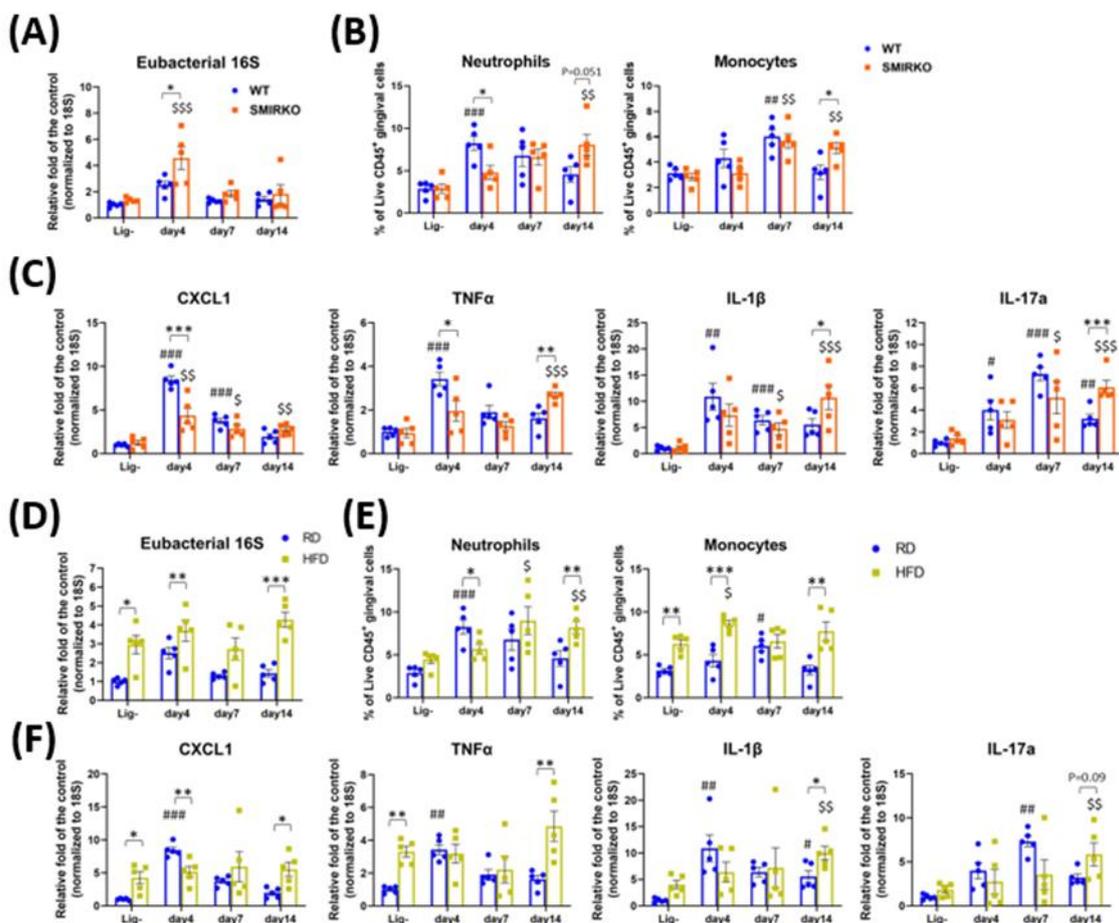


図 3. WT・SMIRKO・HFD マウスにおける歯周炎病態の解析

WT・SMIRKO マウスにおける(A)歯肉中の細菌関連遺伝子、(B)好中球・単球、(C)各種炎症関連遺伝子発現。  
RD・HFD マウスにおける(D)歯肉中の細菌関連遺伝子、(E)好中球・単球、(F)各種炎症関連遺伝子発現。

### ③ SMIRKO マウスの歯肉線維芽細胞では、感染・炎症刺激による CXCL1 産生が減弱する

次に、実際に WT・SMIRKO・HFD マウスから歯肉線維芽細胞を外部培養し、インスリン抵抗性が同細胞からの CXCL1 産生減弱に寄与するかを確かめた。既報通り、歯肉線維芽細胞は SM22 $\alpha$  を発現し、SMIRKO マウスの細胞では IR が完全に欠損していた (図.4A,B)。SMIRKO マウスの歯肉線維芽細胞では、Akt 選択的なインスリン抵抗性が見られた (図.4C)。また、HFD マウスの歯肉線維芽細胞では、インスリン受容体発現が半減しており、インスリン刺激による Akt と Erk の両方にシグナル阻害が見られた (図.4D)。WT マウスの細胞では、LPS 刺激に反応して CXCL1 発現と産生が一過性に起こり、インスリンを共刺激することでその発現・産生が有意に亢進したが、SMIRKO マウス

の細胞では、LPS 刺激にตอบสนองした CXCL1 発現・産生は有意に低く、インスリンによる発現・産生増強効果は見られなかった (図.4E)。HFD マウスの細胞でも同様に、LPS 応答性の CXCL1 発現・産生は低下しており、インスリンによる増強効果は見られなかった (図.4F)。

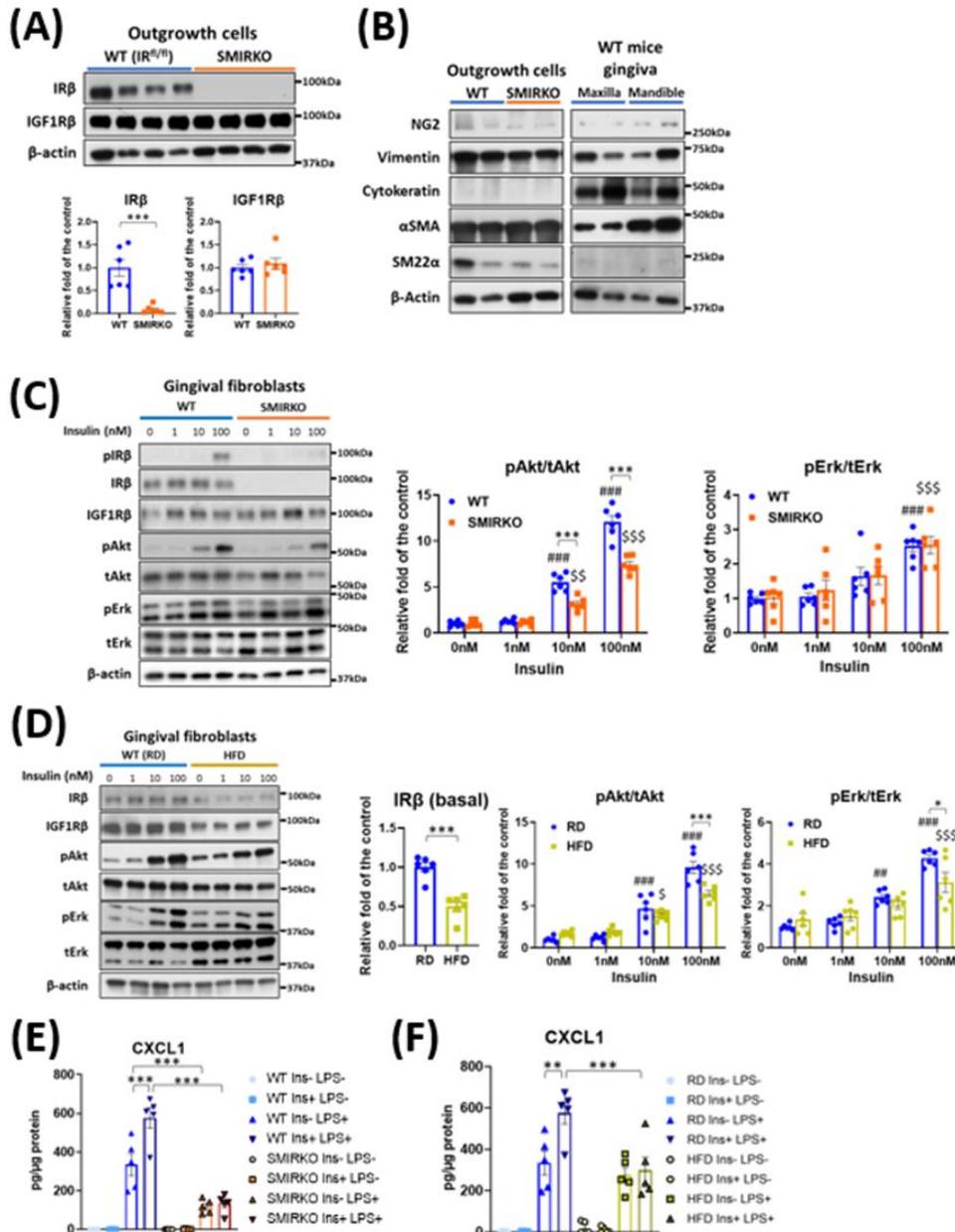


図 4. 各マウス由来歯肉線維芽細胞の IRβ 発現とインスリンシグナル  
 各マウス由来歯肉線維芽細胞における(A)IRβ・IGF-1Rβ 発現、(B)SM22α 発現、  
 (C,D)インスリンシグナルおよび(E,F)インスリン共刺激の有無による LPS 誘導性 CXCL1 産生。

CXCL1 発現は NF-κB 経路によって制御されていることから、各マウスの歯肉線維芽細胞に LPS 刺激した際の NF-κB 活性化を検討したところ、WT マウスの細胞では LPS 刺激にตอบสนองして TAK1 リン

酸化、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解、そして p65 リン酸化が見られ、インスリン共刺激によりそれらの増強効果が見られた (図.5A,B)。一方で、SMIRKO マウスの細胞では、LPS 刺激によるこれらの NF- $\kappa$ B 経路の活性化が有意に低下しており、インスリンによる増強効果も限定的であった。さらに、HFD マウスの細胞については、LPS 刺激への応答が著しく阻害されており、インスリンによる効果見られなかった (図.5A,B)。

これらの結果より、インスリン刺激は歯肉線維芽細胞の LPS 刺激に応答した NF- $\kappa$ B 経路の活性化を正に制御して、CXCL1 産生を増大させるが、同細胞におけるインスリン抵抗性あるいはインスリン受容体の発現低下は、LPS 応答性の減弱に寄与することが示唆された。

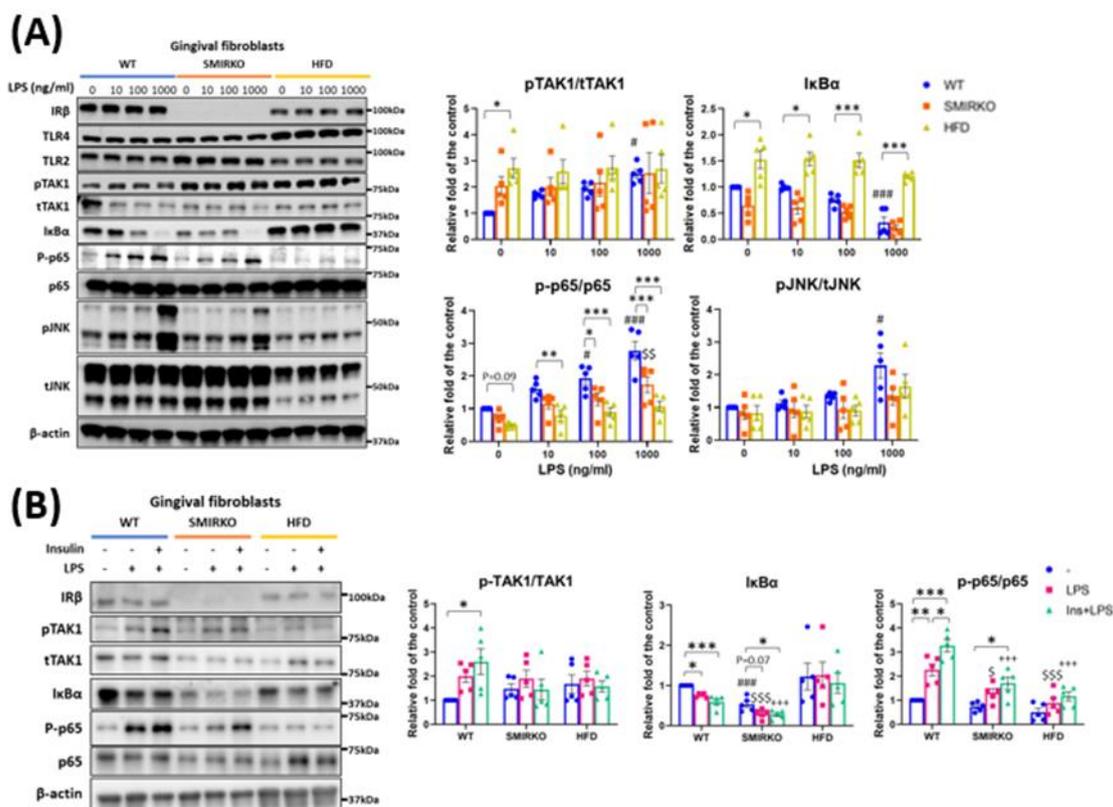


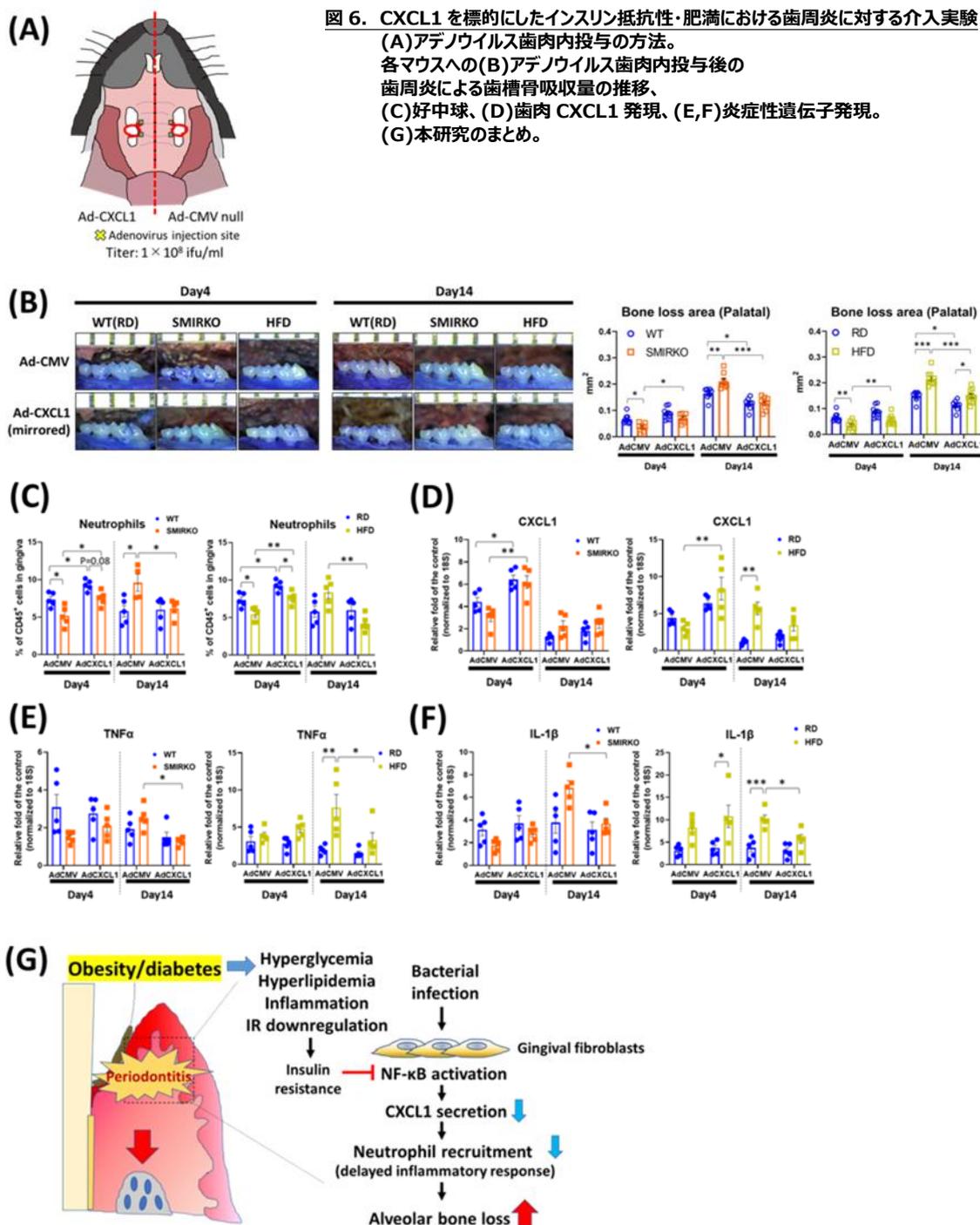
図 5. 各マウス由来歯肉線維芽細胞における LPS 誘導性 NF- $\kappa$ B 活性化とインスリンによる影響  
各マウス歯肉線維芽細胞における (A) LPS 刺激時、(B)インスリン共刺激の有無による NF- $\kappa$ B 経路活性化。

#### ④ SMIRKO・高脂肪食負荷 WT マウスの歯肉に CXCL1 を歯周炎初期に強発現すると、歯周炎の増悪が回避される

これまでの結果より、CXCL1 産生低下による好中球浸潤の遅延が SMIRKO・HFD マウスの歯周炎の増悪に寄与することが示唆されたことから、CXCL1 産生を増強することでこれらのマウスでの歯周炎増悪が回避されるかを確かめることとした。マウス Cxcl1 をコードするアデノウイルスを歯肉内投与すると、4 日後に Cxcl1 の有意な発現亢進が確認できたことから、絹糸結紮と同時に、片方の第二臼歯口蓋側歯肉には Cxcl1 をコードするアデノウイルスを、もう片方には空ベクターを発現するアデノウイルスをそれぞれ歯肉内投与し、歯槽骨吸収量などを評価した (図.6A)。

Cxcl1 発現アデノウイルスを投与した WT・SMIRKO・HFD マウスでは、いずれも絹糸結紮後 14 日目の歯槽骨吸収量が空ベクターを投与した場合よりも有意に低下し、特に SMIRKO・HFD マウスで見られた歯周炎の増悪が回避されることが確認できた (図.6B)。この条件では、歯肉中の好中球数、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  発現がいずれも結紮 14 日後で有意に低下しており、SMIRKO・HFD マウスで観察された歯周炎症の遷延化 (収束不全) が緩和されることが示された (図.6C-F)。

**図 6. CXCL1 を標的にしたインスリン抵抗性・肥満における歯周炎に対する介入実験**  
**(A)** アデノウイルス歯肉内投与の方法。  
**(B)** 各マウスへのアデノウイルス歯肉内投与後の歯周炎による歯槽骨吸収量の推移、  
**(C)** 好中球、**(D)** 歯肉 CXCL1 発現、**(E, F)** 炎症性遺伝子発現。  
**(G)** 本研究のまとめ。



## ⑤ まとめ

以上の結果より、肥満・糖尿病で誘発された糖・脂質代謝異常や慢性炎症、また IR 発現低下に伴う歯肉線維芽細胞のインスリン抵抗性は、細菌感染に応答した NF- $\kappa$ B 経路の活性化を阻害することで CXCL1 発現・産生が低下し、それによって好中球の遊走・浸潤が低下して炎症反応が遷延化するために、結果的に歯槽骨吸収の増悪を招き、歯周炎の進行に寄与することが示唆された（図.6G）。この研究成果は、肥満・糖尿病患者の歯肉局所のインスリン抵抗性を改善することで歯周炎の増悪を回避する可能性を示唆するとともに、糖尿病患者における歯周炎の進行予防のための新たな方法の開発に寄与することが期待される。

## 引用文献：

1. Polak D, Sanui T, Nishimura F, Shapira L. Diabetes as a risk factor for periodontal disease-plausible mechanisms. *Periodontol* 2000, 83:46–58, 2020.
2. Fu J, Yu MG, Li Q, Park K, King GL. Insulin's actions on vascular tissues: Physiological effects and pathophysiological contributions to vascular complications of diabetes. *Mol Metab*, 52:101236, 2021.
3. Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, Alkafajei A, Batayha WQ. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications*, 20(1):59-68, 2006.
4. Shinjo T, Nishimura F. The bidirectional association between diabetes and periodontitis, from basic to clinical. *Jpn Dent Sci Rev*, 60:15-21, 2024.
5. Song IS, Han K, Park YM, Ji S, Jun SH, Ryu JJ, Park JB. Severe Periodontitis Is Associated with Insulin Resistance in Non-abdominal Obese Adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 101(11):4251-4259, 2016.
6. Mizutani K, Park K, Mima A, Katagiri S, King GL. Obesity-associated Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance. *J Dent Res*, 93(6):596-601, 2014.

## 発表業績一覧

### ■論文

1. Shinjo T, Onizuka S, Zaitso Y, Ishikado A, Park K, Li Q, Yokomizo H, Zeze T, Sato K, St-Louis R, Fu J, I-Hsien W, Mizutani K, Hasturk H, Van Dyke TE, Nishimura F, King GL. Dysregulation of CXCL1 Expression and Neutrophil

- Recruitment in Insulin Resistance and Diabetes-Related Periodontitis in Male Mice. *Diabetes*, 72(7):986-998, 2023.
2. Zeze T, Shinjo T, Sato K, Nishimura Y, Imagawa M, Chen S, Ahmed AK, Iwashita M, Yamashita A, Fukuda T, Sanui T, Park K, King GL, Nishimura F. Endothelial Insulin Resistance Exacerbates Experimental Periodontitis. *J Dent Res*. 102(10):1152-1161, 2023.
  3. Park K, Li Q, Lynes MD, Yokomizo H, Maddaloni E, Shinjo T, St-Louis R, Li Q, Katagiri S, Fu J, Clermont A, Park H, Wu IH, Yu MG, Shah H, Tseng YH, King GL. Endothelial Cells Induced Progenitors Into Brown Fat to Reduce Atherosclerosis. *Circ Res*. 131(2):168-183, 2022.
  4. Fu J\*, Shinjo T\*, Li Q, St-Louis R, Park K, Yu MG, Yokomizo H, Simao F, Huang Q, Wu IH, King GL. Regeneration of glomerular metabolism and function by podocyte pyruvate kinase M2 in diabetic nephropathy. *JCI insight*, 7(5):e155260, 2022. (\*: co-first)
  5. Gordin D, Shah H, Shinjo T, St-Louis R, Qi W, Park K, Paniagua SM, Pober DM, Wu IH, Bahnam V, Brissett MJ, Tinsley LJ, Dreyfuss JM, Pan H, Dong Y, Niewczas MA, Amenta P, Sadowski T, Kannt A, Keenan HA, King GL. Characterization of Glycolytic Enzymes and Pyruvate Kinase M2 in Type 1 and 2 Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care*. 42(7):1263-1273, 2019.
  6. Shinjo T, Ishikado A, Hasturk H, Pober DM, Paniagua SM, Shah H, Wu IH, Tinsley LJ, Matsumoto M, Keenan HA, Van Dyke TE, Genco RJ, King GL. Characterization of periodontitis in people with type 1 diabetes of 50 years or longer duration. *J Periodontol*. 90(6):565-575, 2019.
  7. Park K, Li Q, Evcimen ND, Rask-Madsen C, Maeda Y, Maddaloni E, Yokomizo H, Shinjo T, St-Louis R, Fu J, Gordin D, Khamaisi M, Pober D, Keenan H, King GL. Exogenous Insulin Infusion Can Decrease Atherosclerosis in Diabetic Rodents by Improving Lipids, Inflammation, and Endothelial Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 38(1):92-101, 2018.

#### ■学会発表

1. 1. 新城 尊徳, 佐藤 晃平, 瀬々起朗, 岩下 未咲, 横溝久, 西村 英紀. 歯周炎による糖尿病性腎症増悪における糸球体内の分子メカニズム. 第 66 回歯科基礎医学会学術大会 アップデートシンポジウム 9 「Update on Periodontal Medicine -基礎研究と臨床 研究における歯周医学アップデート-」 2024 年 11 月 4 日

2. 新城 尊徳, 瀬々 起朗, 西村 英紀. 糖尿病関連歯周炎の新たな病態形成因子-インスリン抵抗性. 第 67 回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム 21 糖尿病と歯周病～最新データから考える新時代の医科歯科連携～ 2024 年 5 月 18 日
3. 新城 尊徳, 佐藤晃平, 瀬々起朗, Ahmed Al-kafee, 大塚穂佳, 岩下未咲, 西村英紀. 歯周病による糖尿病性腎症の増悪に関する新たな分子メカニズム. 第 14 回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会 ジョイントシンポジウム 14 多職種コラボレーションで支える腎疾患患者の健口とは 2024 年 3 月 17 日
4. Takanori Shinjo. An emerging mechanism in diabetes-related periodontitis: the pathogenic role of insulin resistance in periodontal tissue. 第 71 回国際歯科研究学会日本部会(JADR)総会・学術大会 Rising Scientist Session 2023 年 11 月 26 日
5. 新城 尊徳. 糖尿病関連歯周炎の新たな病態基盤～インスリン抵抗性の観点から. 第 38 回日本糖尿病合併症学会 シンポジウム 6.歯周病を取り巻く最新の話題と医科歯科連携 2023 年 10 月 21 日
6. 新城 尊徳, 佐藤晃平, 横溝久, 瀬々起朗, 今川滯, 岩下未咲, 山下明子, 西村英紀. 実験的歯周炎によって 2 型糖尿病モデル KK-Ay マウスにおける腎症は増悪する. 第 66 回日本糖尿病学会年次学術集会 2023 年 5 月 12 日
7. Takanori Shinjo. Insulin Resistance and Obesity-Related Periodontitis: a Novel Molecular Basis and Potential Therapeutic Targets. 2022 IADR/APR General Session & Exhibition PRG Symposium 2022 年 6 月 23 日
8. 新城 尊徳, 佐藤晃平, 瀬々起朗, 西村英紀. 糖尿病性腎症モデルマウスを用いた歯周病による腎症増悪機構の解明. 第 76 回日本口腔科学会学術集会 シンポジウム 3「Periodontal Medicine の SDGs と未来」 2022 年 4 月 22 日
9. Takanori Shinjo. The pathogenic role of insulin resistance in obesity/diabetes-related periodontitis. The 105th American Academy of Periodontology annual meeting 2019 年 11 月 5 日
10. 新城 尊徳, 西村英紀. 歯肉におけるインスリン抵抗性は歯周炎を増悪する. 第 62 回秋季日本歯周病学会学術大会 2019 年 10 月 25 日
11. Takanori Shinjo. The pathogenic role of insulin resistance in obesity/diabetes-related periodontitis. The 9th Japan-Thailand-Korea Joint Symposium 2019 年 10 月 17 日
12. Takanori Shinjo. Insulin-regulation of CXCL1 expression is important for neutrophil recruitments, periodontitis, and poor wound healing in diabetes. The 79th Scientific session, American Diabetes Association 2019 年 6 月 7 日

13. Takanori Shinjo. Pyruvate kinase M2 overexpression in podocytes ameliorates nephropathy in diabetic mice. The 79th Scientific session, American Diabetes Association 2019年6月7日
14. Takanori Shinjo. Protection from periodontal disease among insulin-dependent type 1 diabetic patients with disease duration of 50 years or longer-The Joslin 50-Year Medalist Study. The 78th Scientific session, American Diabetes Association 2018年6月22日
15. Takanori Shinjo. Depletion of Insulin receptor beta in gingiva exacerbates alveolar bone loss in mice model of experimental periodontitis. The 103rd American Academy of Periodontology Annual Meeting 2017年9月11日

#### 受賞

- 2024年 2024年度国際歯科研究学会・日本部会(JADR) Lotte 学術賞
- 2023年 令和5年度九大歯学優秀研究者賞(FWCI部門)
- 2022年 令和4年度九大歯学優秀研究者賞(臨床教員・IF部門)
- 2022年 第37回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」優秀発表賞
- 2019年 Young Investigator Travel Grant Award, 79th Scientific sessions, American Diabetes Association
- 2019年 ADA Presidents' Select Abstract: Pyruvate Kinase M2 Overexpression in Podocytes Ameliorates Nephropathy in Diabetic Mice. 79th Scientific sessions, American Diabetes Association
- 2018年 日本歯周病学会 若手研究者育成ファンド奨学金
- 2017年 Research Forum Poster Session Award (Basic Science), American Academy of Periodontology, 103rd Annual Meeting

## 脂肪組織-視床下部間の回路を介した新しい光応答性代謝調節

辻 忠孝

申請時：大阪大学大学院歯学研究科口腔外科学第一教室

現在：Harvard Medical School

Joslin Diabetes Center

### 要旨

近年、肥満の世界的な増加により、糖尿病や心疾患などの深刻な健康リスクが広がっています。現行の治療法は一部の患者に効果を示すものの、高額で副作用があり、持続的な効果を得られないケースも少なくありません。本研究では、これらの課題に対応する安価で持続可能な治療法の開発を目指しています。脂肪組織はエネルギーの貯蔵や消費だけでなく、さまざまな生理活性分子を分泌します。特に白色脂肪組織で高発現する光感受性タンパク質 Opsin3 (Opn3) に着目し、代謝機能改善の新たなメカニズムを探ります。実験の結果、青色光刺激が Opn3 を介してマウスおよびヒトの脂肪細胞や組織に作用し、皮下白色脂肪の蓄積を減少させることが確認されました。さらに、青色光刺激を受けた白色脂肪がヒスチジンの分泌を促進し、この分子が血液脳関門を通過して視床下部に到達することが示されました。視床下部内のヒスタミン作動性ニューロンが活性化され、その結果、交感神経系を介して褐色脂肪組織の活性が向上しました。この作用は、褐色脂肪組織内および血中のノルエピネフリン濃度の上昇によっても支持されています。これらの結果は、光刺激に応答する新たな脂肪組織-視床下部間の回路を明らかにするとともに、代謝障害治療への光療法の応用可能性を示唆しています。

### 内容

#### 本研究の背景：

最近数十年で、肥満とその関連する代謝性心血管障害の蔓延が全世界で急増しています。肥満は、異常な脂肪蓄積を特徴とし、代謝や炎症に系統的な影響を及ぼす可能性があります。脂肪組織には異なる機能を持つ種類があり、白色脂肪組織（WAT）はエネルギーの主要な貯蔵場所であり、褐色脂肪組織及びベージュ脂肪組織（BAT）は熱産生器官としての役割を果たします。また、両脂肪組織は内分泌器官としても機能し、生理活性物質を分泌してエネルギー代謝を調節しています。

肥満は、遺伝的要因や環境要因（食事、運動、温度、光など）との相互作用の不均衡によって引き起こされます。特に光は、人間や動物の生理学および生化学的プロセスに重要な役割を果たし

ています。G タンパク質共役受容体（GPCR）のひとつである Opsin は光受容体として知られており、中でも Opsin3（Opn3）は 1999 年にマウスの小脳で発見され（PMID: 10234000）、2008 年にマウス組織の GPCR 発現プロファイリングにより Adipose Cluster に分類されました（PMID: 18984166）。最近の研究では、Opn3 が脂肪細胞機能の調節において非視覚的な役割を持つことが明らかにされています（PMID: 32040503）。青色光は脂肪細胞において代謝を調節するための Opn3-GPCR シグナリングを活性化し、寒冷環境下では脂肪分解を誘導します。Opn3 を特異的に欠損させたマウスは、寒冷に対する正常な体温調節ができないことが示されています（PMID: 31968245）。

また、脂肪組織は神経系と密接に関連しており、特に脳との間で情報を交換しています。脂肪組織からの感覚神経は中央神経系（CNS）に情報を伝達し、さらに交感神経系（SNS）を介して脂肪組織の代謝を調節します。この研究では、青色光が皮下白色脂肪組織（scWAT）の脂質蓄積を減少させ、肥満による代謝異常の改善をもたらすことが発見されました。この効果は scWAT における Opn3 に依存しており、光により scWAT からヒスチジンが放出され、視床下部のヒスタミンニューロンを活性化し、BAT を介して代謝を調整します。本研究では、肥満における代謝障害を改善するための脂肪組織-視床下部間の回路を介した新しい光応答性代謝調節機構を解明しています。

## 本研究の成果：

### ① A wireless closed-loop system for optogenetics stimulation の確立

2017 年に Shin G らが、wireless closed-loop system のデザイン設計を行い報告しました（PMID: 28132830）。今回、生体内の脂肪組織を直接照射できる光装置で、スイッチオン・オフが遠隔操作で可能なシステムを設計しました。光照射による熱産生の影響を排除するために、有意に熱上昇しない光照射のセッティングを行いました（PMID: 32040503, 図 1）。

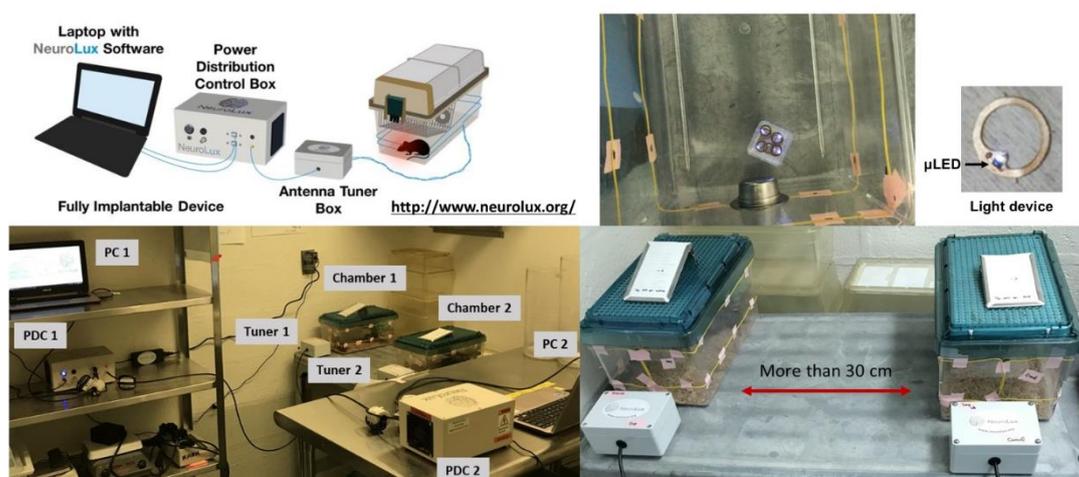
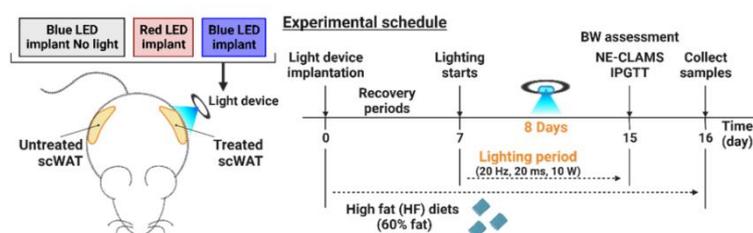


図 1. A wireless closed-loop system for optogenetic stimulation

## ② 青色光刺激は scWAT でのベージュ化を誘導せずに、脂質合成を減少させる

scWAT に対するオプトジェニックな青色光刺激が、マウスの高脂肪食（HFD）によって引き起こされる代謝機能障害を軽減するかどうかを検討しました。埋め込み可能な  $\mu$ LED を使用し、8 日間の青色光（470 nm）照射は、オスのマウスにおいて体重増加、脂肪量、インスリン抵抗性を有意に減少させ、熱産生能力と糖耐性を向上させました。これらの効果はメスのマウスでは弱いものでした。メカニズム的には、青色光は scWAT における脂質蓄積を減少させ、ベージュ化を誘導することなく、脂質合成（Srebf1、Fasn、Acaca、Scd1）および脂肪分解（Pnpla2、Lipe）遺伝子の発現を抑制しました（図 2）。in vitro では、マウスおよびヒトの脂肪細胞における青色光照射は時間依存的な代謝変化を示し、短期間の照射は脂肪分解を促進し、長期間の照射は脂質合成と脂肪分解の両方を抑制しました。これらの発見は、青色光が脂肪代謝を調整し、肥満関連の代謝障害に対抗するための非侵襲的アプローチの潜在性を示しています。

### Experimental Design



### Treated scWAT in C57BL/6J male

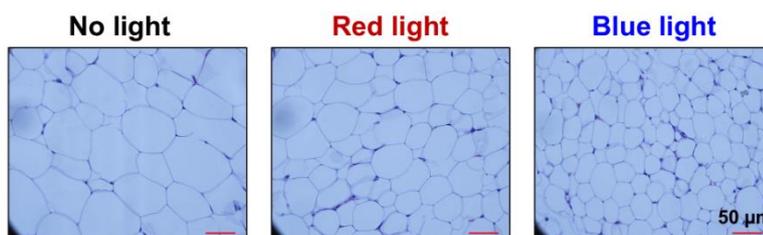


図 2. 青色光刺激は、皮下脂肪への脂質合成を減少させる

## ③ scWAT への青色光照射が褐色脂肪組織（BAT）を活性化させるトリガーとなる

scWAT に対する直接の青色光照射は、scWAT 内でのベージュ化を誘導することなく、熱生成と代謝を促進しました。代わりに、この処置は褐色脂肪組織（BAT）を交感神経系（SNS）活動の増加を通じて活性化させました。対照群と比較して、青色光照射群の BAT は多数のミトコンドリアの形態を維持し、トリグリセリドレベルが低く、脂肪分解および熱生成に関与する遺伝子（例：Ucp1、Prdm16、Elovl3）の発現が上昇しました。循環中のノルエピネフリン（NE）と BAT 内の NE レベルは上昇しましたが、scWAT における SNS 由来の NE の増加は検出されませんでした。青色光照射は scWAT における脂質合成を減少させましたが、血圧や心拍数には影響を与えなかったため、その代謝的利点は scWAT の直接的な SNS 刺激ではなく、BAT の活性化に起因していることを示しました。

#### ④ 青色光の代謝効果は、皮下白色脂肪組織（scWAT）における光受容体 Opn3 を介して発現する

Opn3 の発現が scWAT において欠如している Opn3 全身ノックアウト（Opn3-GKO）マウスは、8 日間の青色光照射後に野生型（WT）マウスで観察された代謝的利点を示しませんでした。WT マウスとは異なり、Opn3-GKO マウスは体重増加、脂肪量の減少、またはグルコース耐性の改善が見られませんでした。青色光はノルエピネフリン（NE）レベル、BAT の熱生成能力、または BAT における熱生成および脂肪分解遺伝子の発現を増加させることができませんでした。さらに、青色光によって引き起こされる脂質代謝の変化や scWAT 内のトリグリセリドレベルの低下も Opn3-GKO マウスでは見られませんでした。これらの発見は、Opn3 が青色光の代謝効果を媒介するために不可欠であることを示唆しています。

#### ⑤ 青色光が scWAT に照射されると、循環する代謝物に変化を引き起こす

メタボロミクス解析により、青色、赤色、無色光グループの間で異なる代謝プロファイルが明らかになり、青色光が特にアミノ酸代謝、特にヒスチジン代謝を変化させることが示されました（図 3）。循環するヒスチジンレベルの上昇は、オスおよびメスのマウスの両方で確認されましたが、この増加は Opn3-GKO マウスでは見られませんでした。青色光処理を受けた scWAT では、ヒスチジンレベルも有意に高く、循環するヒスチジンと scWAT 中のヒスチジン含量との間に正の相関関係が観察されました。青色光の照射は、ヒスチジンをヒスタミン（Hdc）およびカルノシン（Carns1）に変換する酵素の発現を、マウスおよびヒトの白色脂肪細胞の両方で抑制し、青色光がヒスチジンの蓄積と scWAT からの放出を促進することを示唆しています。これらの発見は、青色光による代謝効果が scWAT 由来のヒスチジンを生理活性のある循環因子として関与させていることを示唆しています。

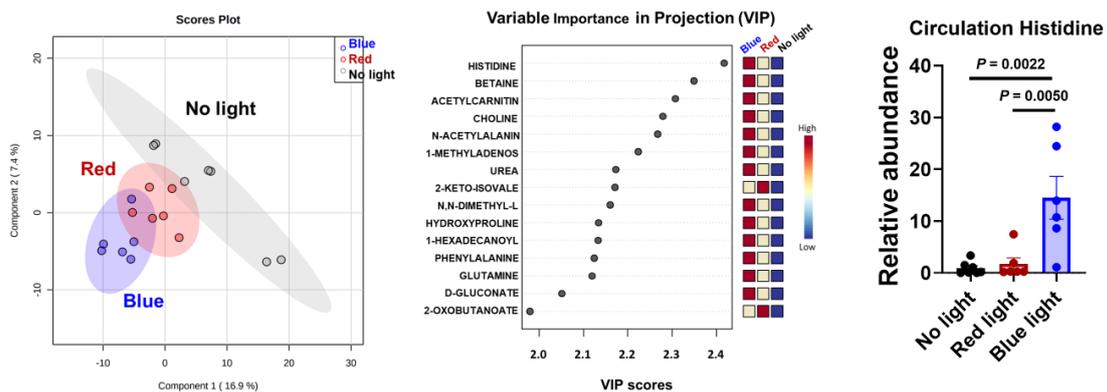


図 3. 皮下脂肪への青色光刺激が循環するヒスチジン量を増加させる

⑥ 青色光が scWAT に照射されると、循環するヒスチジンが増加し、これが視床下部のヒスタミン作動性ニューロンを活性化させ、交感神経系（SNS）を介して褐色脂肪組織（BAT）の活性化を促進する

腹腔内に L-ヒスチジンを投与すると、BAT の熱生成および脂肪分解関連遺伝子の発現が用量依存的に増加し、これは青色光照射の効果を反映しています。ヒスチジンの体重および脂肪量への影響は、HDC 阻害剤 FMH によってブロックされ、ヒスチ

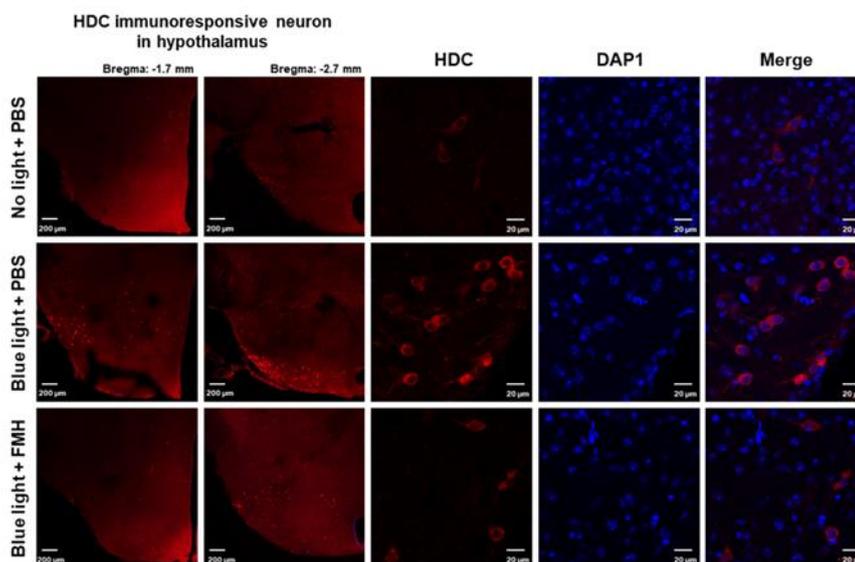


図 4. 皮下脂肪への青色光刺激が視床下部のヒスタミン作動性ニューロンを活性化する

ジンは BAT に直接影響を与えるのではなく、神経伝達物質としてのヒスタミンへの変換を介して作用することが示唆されています。青色光処理により視床下部の HDC レベルとヒスタミン応答性ニューロンが増加し、この効果は FMH の投与によって消失しました（図 4）。さらに、青色光は BAT におけるチロシン水酸化酵素（Tyrosine hydroxylase: Th）のタンパク質を増加させ、これは SNS 活性化のマーカであり、FMH によって逆転されました。免疫蛍光染色により、青色光照射後の BAT において Th 陽性神経繊維が増加していることが確認され、FMH によって抑制されました。これらの発見は、青色光による代謝的変化がヒスタミン依存の視床下部-SNS-BAT 軸を介して調節されていることを示しています。

⑦ 青色光による代謝の変化は、ヒスチジン脱炭酸酵素拮抗薬または BAT の神経切断によって抑制される

ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）を FMH で阻害すると、食物摂取量に影響を与えずに、青色光による脂肪蓄積および体重の減少が無くなりました。FMH はまた、青色光によって引き起こされる BAT の熱生成および脂肪分解関連遺伝子の発現の増加、循環ノルエピネフリン（NE）レベルの上昇も抑制しましたが、循環中のヒスチジンには変化が見られませんでした。また、BAT の神経切断は、青色光による BAT の熱生成や遺伝子発現の増加、体重減少やグルコース耐糖能の改善などの代謝的利益を消失させました。しかし、青色光は依然として scWAT の質量を直接減少させ、循環するヒスチジンを増加させており、これは局所的な効果を示しています。

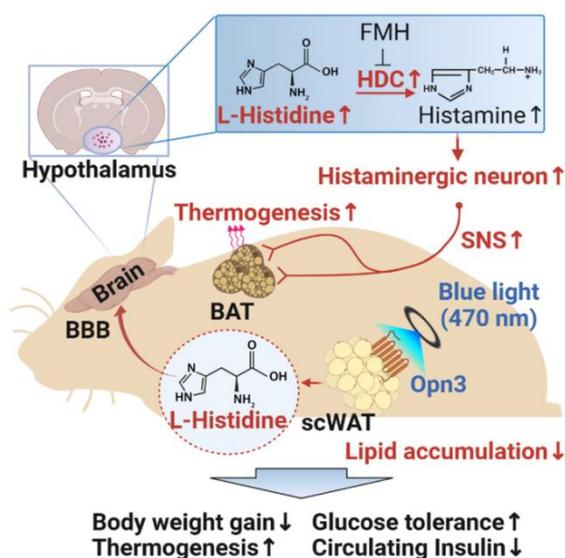


図 5. 脂肪組織-視床下部間の回路を介した新しい光応答性代謝調節

全体として、これらの発見は青色光照射が循環するヒスチジンを増加させ、視床下部のヒスタミン作動性ニューロンを活性化し、SNS 駆動の BAT 熱生成を促進する光応答性の脂肪-視床下部軸を強調しています (図 5)。これが青色光の代謝的利益にとって重要であることが示されており、現在、増加する肥満疫病に対する光ベースの治療法を開発するための分子メカニズムを提供しています。

## 発表業績一覧

### ■論文

1. Xiao L, De Jesus DF, Ju CW, Wei JB, Hu J, DiStefano-Forti A, Gonzales VS, Tsuji T, Wei S, Blüher M, Tseng YH, He C, Kulkarni RN. Divergent roles of m(6)A in orchestrating brown and white adipocyte transcriptomes and systemic metabolism. *Nat Commun.* 2025 Jan 9;16(1):533. PMID: 39788955.
2. Xiao L, De Jesus DF, Ju CW, Wei JB, Hu J, DiStefano-Forti A, Tsuji T, Cero C, Männistö V, Manninen SM, Wei S, Ijaduola O, Blüher M, Cypess AM, Pihlajamäki J, Tseng YH, He C, Kulkarni RN. m(6)A mRNA methylation in brown fat regulates systemic insulin sensitivity via an inter-organ prostaglandin signaling axis independent of UCP1. *Cell Metab.* 2024 Oct 1;36(10):2207-2227.e9. PMID: 39255799.
3. Wang CH†, Tsuji T†, Wu LH, Yang CY, Huang TL, Sato M, Shamsi F, Tseng YH. Endothelin 3/EDNRB signaling induces thermogenic differentiation of white adipose tissue. *Nat Commun.* 2024 Aug 22;15(1):7215. PMID: 39174539. (†Co-first author)
4. Tsuji T, Tolstikov V, Zhang Y, Huang TL, Camara H, Halpin M, Narain NR, Yau KW, Lynes MD, Kiebish MA, Tseng YH. Light-responsive adipose-hypothalamus axis controls metabolic regulation. *Nat Commun.* 2024 Aug 8;15(1):6768. PMID: 39117652.

5. Tsuji T, Tseng YH. Adipose tissue-derived lipokines in metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2023 Aug; 81:102089. Review. PMID: 37473635.
6. Iwasaki K, Lalani B, Kahng J, Carapeto P, Sanjines S, Hela F, Abarca C, Tsuji T, Darcy J, Bartke A, Tseng YH, Kulkarni RN, Aguayo-Mazzucato C. Decreased IGF1R attenuates senescence and improves function in pancreatic  $\beta$ -cells. *Front Endocrinol.* 2023; 14:1203534. PMID: 37441495.
7. Tsuji T, Zhang Y, Tseng YH. Generation of Brown Fat-Specific Knockout Mice Using a Combined Cre-LoxP, CRISPR-Cas9, and Adeno-Associated Virus Single-Guide RNA System. *J Vis Exp.* 2023 Mar 24;(193). PMID: 37036212.
8. Sugimoto S, Mena HA, Sansbury BE, Kobayashi S, Tsuji T, Wang CH, Yin X, Huang TL, Kusuyama J, Kodani SD, Darcy J, Profeta G, Pereira N, Tanzi RE, Zhang C, Serwold T, Kokkotou E, Goodyear LJ, Cypess AM, Leiria LO, Spite M, Tseng YH. Brown adipose tissue-derived MaR2 contributes to cold-induced resolution of inflammation. *Nat Metab.* 2022 Jun;4(6):775-790. PMID: 35760872.
9. Tsuji T, Bussberg V, MacDonald AM, Narain NR, Kiebish MA, Tseng YH. Transplantation of Brown Adipose Tissue with the Ability of Converting Omega-6 to Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Counteracts High-Fat-Induced Metabolic Abnormalities in Mice. *Int J Mol Sci.* 2022 May 10;23(10). PMID: 35628137.
10. Sato M†, Tsuji T†, Yang K, Ren X, Dreyfuss JM, Huang TL, Wang CH, Shamsi F, Leiria LO, Lynes MD, Yau KW, Tseng YH. Cell-autonomous light sensitivity via Opsin3 regulates fuel utilization in brown adipocytes. *PLoS Biol.* 2020 Feb;18(2): e3000630. PMID: 32040503. (†Co-first author)

### 受賞

- 2024年 The First Place Poster Award, Joslin Diabetes Research Day, Joslin Diabetes Center
- 2024年 The Eleanor and Miles Shore Program Award in Medicine, Harvard Medical School
- 2024年 The Winner of The Presidential Poster Competition, The Endocrine Society
- 2024年 The Outstanding Abstract Award, The Endocrine Society
- 2021年 American Heart Association postdoctoral fellowship

## 選考委員一覧（2024年度）

（敬称略）

委員長 村上 伸也 大阪大学 名誉教授  
関西女子短期大学歯科衛生学科 教授

### 委員（五十音順）

稲垣 暢也 京都大学 名誉教授  
公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院 理事長

岩田 隆紀 東京医科歯科大学大学院 主任教授

下村 伊一郎 大阪大学大学院医学系研究科 教授

寺内 康夫 横浜市立大学大学院医学研究科 教授

益崎 裕章 琉球大学大学院医学研究科 教授

山田 聡 東北大学大学院歯学研究科 教授

## 受給者一覧

(敬称略)

年度	氏名	申請時の所属	留学先機関	留学先PI
2009	水谷 幸嗣	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	George L. King
	福井 健司	大阪大学大学院 医学系研究科 内分泌・代謝内科学	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	C. Ronald Kahn
2010	秋山 優	山口大学大学院 医学研究科 応用医工学系学域病態制御内科学分野	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Rohit N. Kulkarni
2011	片桐 さやか	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	George L. King
	藤坂 志帆	富山大学附属病院 第一内科	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	C. Ronald Kahn
2012	佐竹栄一郎	浜松医科大学 医学部 小児科	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Andrzej S. Krolewski
2013	(対象者なし)			
2014	四釜 洋介	徳島大学 病院糖尿病対策センター	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Steven E. Shoelson
	佐藤 真理	北海道大学大学院 歯学研究科	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Yu-Hua Tseng
2015	新城 尊徳	九州大学大学院 歯学研究科	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	George L. King
	小塚 智沙代	琉球大学大学院 医学研究科	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Mary-Elizabeth Patti
2016	木村 友彦	川崎医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科学	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Rohit N. Kulkarni
	楠山 譲二	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 口腔生化学分野	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Laurie Goodyear
2017	長尾 博文	大阪大学大学院 医学系研究科 内分泌・代謝内科学	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	C. Ronald Kahn
	辻 忠孝	大阪大学大学院 歯学研究科 口腔外科学第一教室	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Yu-Hua Tseng
中断				
2020	鬼塚 理	九州歯科大学 口腔機能学講座歯周病学分野	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	George L. King
2021	高垣 雄太	金沢医科大学 糖尿病内分泌内科学	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Laurie Goodyear
	芝 多佳彦	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野	Oral Medicine, Infection and Immunity, Harvard School of Dental Medicine	William V. Giannobile
2022	樋口 雄亮	京都府立医科大学大学院 医学研究科 循環器内科学	Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School	Shingo Kajimura

(敬称略)

年度	氏名	申請時の所属	留学先機関	留学先PI
2023	細川 友誠	神戸大学大学院 医学研究科 糖尿病・内分泌内科学部門	Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School	Edward T. Chouchani
	大杉 勇人	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯周病学分野	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	George L. King
2024	岡村 拓郎	京都府立医科大学大学院 医学研究科 内分泌代謝内科学	Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School	Mary-Elizabeth Patti
	外山 直樹	岡山大学学術研究院 医歯薬学域 予防歯科学分野	Department of Pathology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School	Shuji Ogino