

全身への歯周病原菌抗原の波及が持久性運動後の骨格筋 PGC-1 α 発現に与える影響

林 海里

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科咬合機能健康科学分野

Effect of spreading periodontopathic bacteria antigen in the whole body to PGC-1 α
expression post-endurance training

Kairi HAYASHI

Department of Masticatory Function and Health Science,
Graduate School of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University

Abstract

Background: To get the effect of training is so important in people who do sports, such as athletes, therefore, it is important to identify the factors that inhibit to get the effect of training. We thought that *P. gingivalis*, one of the most common periodontal disease pathogens, has the potential to inhibit the expression of PGC1- α which is one of the most important second messenger of mitochondria expression post endurance training at the skeletal muscle. In this study, to evaluate the relationship between *P. gingivalis* and muscle mitochondrial expression, we assess the expression of PGC-1 α in rat gastrocnemius with administration of *P. gingivalis*, in vivo.

Methods: A total of 10 male Wistar rats (eight weeks in age) were randomly divided into two groups: one intraperitoneal administered sonicated *P. gingivalis* two times per week for four weeks (*P.g* group), and one given same amount of saline (Control group). After four weeks of administration, endurance training was given in both groups using a treadmill (22m/min, 20min). 24h after training, gastrocnemius was removed, and expression of PGC1- α was evaluated by western blotting. Serum IgG titers of *P. gingivalis* was also evaluated by ELISA, and the relationship between *P. gingivalis* and expression of PGC-1 α in rat gastrocnemius were assessed.

Results and Discussion: The expression of PGC-1 α in *P.g* group were significantly lower than Control group, and serum IgG titers of *P. gingivalis* was significantly higher in *P.g* group. These results suggest that sonicated *P. gingivalis* spread in whole body, and it interfere the expression of PGC-1 α in gastrocnemius post endurance training. These results suggest the possibility that bad oral health interfere mitochondria expression post endurance training.

1. 緒言

競技レベルや目的に関わらず、すべての運動する人にとって、トレーニングを行った後に効率的にその効果を得ることは共通した願いである。例えば持久性トレーニングを行った後は、PGC-1 α などの発現増加を経てミトコンドリア新生が促進され、持久力を獲得することが出来ると言われている¹⁾が、もしこの効果獲得を阻害する因子があるならば、せっかくトレーニングを行っても競技力向上や健康増進に繋がらず、いたずらに時間を浪費することになってしまうかもしれない。そのため、もしトレーニングの効果を阻害する因子があるならば検出し、可能ならば除去するための方策を考えていくことは非常に重要なことである。

今回我々はその阻害する因子の一つとして歯周病発症に最も関連する細菌の一つである *P. gingivalis* の可能性を考えた。*P. gingivalis* は菌体外膜にリポポリサッカライド (LPS) をもつグラム陰性偏性嫌気性菌で、歯周病患者から多く検出されることが知られている。そしてこれまでの *In vivo* や疫学調査などから歯周病発症に大きく関与し²⁾、更に、口腔内で増加すると歯周ポケット内の歯肉溝上皮や破綻した口腔上皮から血流を介して菌体の抗原部分が全身に巡り、糖尿病や心疾患といった生活習慣病の憎悪因子となることも分かっている³⁻⁵⁾。この *P. gingivalis* は歯周病が発症していない若い世代においてもプラークコントロールが不良であったりすると検出されることも報告されており⁶⁾、若いアスリートでも無縁の存在というわけではない。

この *P. gingivalis* の抗原が全身に巡ると、IL-6 や TNF- α といった炎症性サイトカインが増加することも分かっている^{7,8)}。全身での炎症性サイトカインの増加は持久トレーニングの効果として獲得する事が出来るミトコンドリア新生において大きな役割を果たす PGC-1 α の発現を阻害することも報告されている⁹⁾ ため、「*P. gingivalis* が全身に波及すると持久性トレーニング後の効果獲得が阻害される」可能性が想像される。今回はこの可能性の立証のためにまず、「*P. gingivalis* 抗原を投与したラットでは持久性運動後の PGC-1 α の発現量が低下する」という仮説の立証を目的に検証を行ったので報告する。

2. 研究方法

方法概要 (図 1)

8 週齢の雄性の Wistar ラット (三共ラボラトリー) 10 匹を 1 週間の環境順応期間を経た後ランダムに 2 群に分け、一方の群には *P. gingivalis* の超音波破碎抗原の投与を (*P.g* 群)、もう一方の群には同量の生理食塩水の投与を行った (Control 群)。4 週後投与を行った後、持久性運動介入を一回行いその翌日に血液と右側腓腹筋筋を採取し、血清中の *P. gingivalis* への抗体価と骨格筋 PGC-1 α の発現量を比較した。すべての実験は東京医科歯科大学実験動物委員会の承認を得て行った (承認番号: A2022-094C2)。

2.1 *P. gingivalis* 超音波破碎抗原の作製および投与

P. gingivalis ATCC 33277 株を 35°C で 2 日間ヘミンとビタミン K1 を添加した BHI 培地で嫌気性培養し、培養した細菌を超音波破碎し、超音波破碎抗原を作製した。作製した超音波破

碎抗原は菌数計算盤を用いて数を計測し、 10^9 cell/mLになるよう生理食塩水で希釈した。*P.g* 群に対してはこの希釈した抗原を4週間・週2回の頻度で1.0mL腹腔内投与を行い、Control群に対しては同量の生理食塩水を同じ頻度で腹腔内投与した。

2.2 持久性運動介入

4週間 *P.g* 抗原を腹腔内投与した後、小動物用トレッドミル（大阪マイクロモーター社）を用いて持久性運動介入を行った。5m/min の速度から10分かけて22m/min まで加速させ、その状態で20分間持久性運動介入を行った（図2）。

2.3 血清中 *P.gingivalis* IgG 抗体価の測定

投与した貯音波破碎 *P. gingivalis* が全身に巡ったことを確認するために、血清 *P. gingivalis* IgG 抗体価の測定を行った。持久性運動刺激を加えた24時間後に二酸化酸素過剰投与による安楽死を行い、直後に心臓から血液を採取した。採取した血液は2時間常温で静置した後、4°C、2,000rpm で20分間、遠心分離し血清を分離した。採取した血清は測定を行うまで-80°Cで冷凍保存した。血清 IgG 抗体価の評価は酵素免疫測定法（ELISA 法）を用いて行った。96穴マイクロプレート（EIA plate; Costar, MA, USA）に、10g/mLの濃度になるようにコーティングバッファーで調整した超音波破碎 *P. gingivalis* ATCC233277 をコーティングしたのち、2%BSA で 2^{10} 倍希釈した血清をインキュベートし、HRP 標識された二次抗体（goat anti-rat IgG/H&L antibody, HRP conjugate; Protein Tech Japan）と TMB 溶液を用いて発色させた^{10,11}。発色させたプレートはマイクロプレートリーダーを用いて450nm で吸光度を測定した。得られた吸光度は群ごとに平均して比較検討した。

2.4 腓腹筋 PGC-1 α 発現量の評価

持久性運動を加えた24時間後に右側腓腹筋を採取し、測定を行うまで-80°Cで冷凍保存した。腓腹筋における PGC-1 α の発現量は Western Blotting 法で評価した。腓腹筋サンプルから25mg 切り出し、プロテアーゼ阻害薬を添加したホモジナイズバッファー（RIPA Lysis Buffer・Santa Cruz Biotechnology 社）1.0mL に浸漬し、氷冷したガラス製ホモジナイザーを用いて総タンパク質を抽出した。抽出したタンパク質は BCA 法を用いて（BCA Protein Assay Kit・タカラバイオ株式会社）濃度を測定し、1mg/mL になるように更にホモジナイズバッファーで調整した。濃度を調整したサンプルは、サンプルバッファー（EzApply・アトー社）を加えて95°Cで10分間熱処理してから、ポリアクリルアミドゲル（e-PAGEL・アトー社）で電気泳動を行った。その後、電気泳動したタンパク質を、セミドライブロットティング装置を用いてメンブレン膜に転写し、1:10000 に希釈した抗 PGC-1a 抗体（PGC-1 α Mouse Monoclonal antibody・Proteintech 社）と、ローディングコントロールとして抗 GAPDH 抗体（GAPDH Mouse Monoclonal antibody・Proteintech 社）を室温で2時間インキュベートし、その後 HRP 標識をした二次抗体を30分インキュベートした。発色は TMB 溶液（アトー社製）を用いて行い、ローディングコントロールの発現量から総タンパク質量による発現

誤差を補正した後、Control 群に対する *P.g* 群の発現量を比較定量した。

2.5 統計

P.g 群と Control 群間での実験開始前・介入終了後の体重、血清抗体価、骨格筋 PGC-1 α の発現量について Mann-Whitney U 検定を用いて解析を行った (BellCurve、Social Survey Research Information Co., Ltd.)。有意水準は 5%とした。

3. 結果

両群とも実験期間中、すべての実験動物に異常所見は観察されなかった。体重は実験開始前が *P.g* 群 204.64 \pm 7.04g、Control 群 203.36 \pm 8.47g、持久性運動介入後で *P.g* 群 257.56 \pm 10.01g、Control 群 263.82 \pm 10.66g でいずれも両群間に有意差は生じなかった (図 3)。

3.1 血清中 *P. gingivalis* IgG 抗体価

吸光度は *P.g* 群で 3.78 \pm 0.07、Control 群では 0.63 \pm 0.60 となり、Control 群に対して *P.g* 群で有意に高値を示した (図 4)。*P.g* 群で血清中 *P. gingivalis* IgG 抗体価が増加したことから超音波破碎 *P. gingivalis* の腹腔内投与によって全身に *P. gingivalis* 抗原が波及したことが間接的に示された。

3.2 骨格筋 PGC-1 α 発現量

Control 群の測定値の平均を 1 として (\pm 0.418) 計算すると、*P.g* 群では 0.603 \pm 0.173 という値になり、統計学的にも *P.g* 群で有意に低値となった。このことから今実験において運動介入後の腓腹筋における PGC-1 α の発現量は Control 群に対して *P.g* 群では約 60%であったことが示された (図 5)。

4. 考察

P. gingivalis は歯周病の発症・重症化に大きく関係する口腔内細菌の一つで、歯周病患者では多くの *P. gingivalis* が検出されることが分かっている¹²⁾。その関与の仕方については今なお多くの研究者たちの調査対象であるが、近年の研究では、単体で歯周病を発症させるというよりは、口腔内で増加することで細菌叢のバランスなどを崩す、言わば「歯周病のキーストーン」的な存在なのではないかと言われている¹³⁾。また歯周病はゆっくり進行するため、発症するのは高齢な患者に多いが実際には歯周病が発症していない若年者でもプラークコントロールなどが悪ければ口腔内で *P. gingivalis* が増加することも報告されている⁶⁾。*P. gingivalis* は血管侵入能を持つため、口腔内で増加すると、歯肉溝上皮などから体内に侵入することが言われており¹⁴⁾、その結果、抗原部分を全身に巡らせ、心疾患や糖尿病などの生活習慣病と関連することが言われていたり³⁻⁵⁾、母体で *P. gingivalis* が増えると低体重出産のリスクが上がるという報告¹⁵⁾があったりと、近年様々な全身疾患との関連が注目されている。今回は同様に *P. gingivalis* が全身に波及すると持久性トレーニング後の効果の獲得を阻害するのでは

ないかと考え、*In vivo*による実験で検証した。

今回の実験モデルでは超音波破碎した *P. gingivalis* を腹腔内投与し、抗原が全身に巡る状態を目指した。腹腔内投与による抗原の投与は、手技の難易度が比較的 low、確実に規定した量を体内に入れることが出来るため、今回安定した抗原の体内への波及を目的にこの手法を選択した。実際、採取した血液から血清中の *P. gingivalis* IgG 抗体価を比較したところ、*P.g* 群において有意に抗体価の上昇が起きていたことから、投与によって全身血中に *P.gingivalis* 抗原が波及したことが証明され、今モデルは *P. gingivalis* 抗原の全身波及モデルの作製としては問題なかったことが示された。

ミトコンドリアは骨格筋活動時のエネルギー産生の役割を担い、持久性トレーニングを行うと、細胞内カルシウムやフリーラジカルの増加といった一次シグナルが筋に加わり、AMPK、p38、PGC-1 α といった二次シグナル伝達分子が発現し、ミトコンドリア新生が促進される¹⁶⁾。その結果骨格筋でのエネルギー産生能力が向上し、筋持久力の向上を獲得することができる。このミトコンドリア合成の過程である PGC-1 α の発現に関して、Palomer X, et al は全身に炎症性サイトカインが増加しているような状況で発現量が減少することを報告している⁹⁾。歯周病抗原が全身に波及しているような状態では炎症性サイトカインが全身で増加することが報告されているため^{7,8)}、*P. gingivalis* 抗原が全身に波及している状態は PGC-1 α の発現を阻害する可能性がある考え、今回の実験で検証を行った。

今回の研究では *P. gingivalis* を投与した *P.g* 群において、骨格筋における PGC-1 α の発現量の有意な減少が確認された。このことから *P. gingivalis* 抗原が全身に波及することで PGC-1 α の発現が抑制されることが示され、*P. gingivalis* が口腔内から全身へ波及すると、トレーニング後のミトコンドリア合成が低下し、ひいてはトレーニングによる効果獲得を阻害する可能性も示唆された。

実際我々が以前に行った研究では、1 か月 *P. gingivalis* を投与しながらトレッドミルトレーニンングを行わせたところ、1 か月後の持久力テストで、投与していない群と比較して投与群では有意に低いスコアを示した¹⁷⁾。今回の結果はこの結果を裏付ける結果とも言えるかもしれない。

しかし、今回の研究ではいくつかの課題もある。例えば今回の研究はあくまで PGC-1 α への影響が出たということを示しただけで、実際にミトコンドリアの発現は調べていない。今後、より踏み込んだ結果を求めるなら実際にミトコンドリアの発現まで調べる必要があるかもしれない。また、今回は *P. gingivalis* を対象に研究を行ったが、実際の口腔内では *P. gingivalis* だけに限らず多くの細菌が存在し、細菌叢を形成している。例えば歯周病に関連する菌としては、*T. denticola*、*T. forsythensis*、う蝕に関連する菌としては *S. mutans* などが代表的なものとして知られている。このような他の菌の影響や、細菌叢を次世代シーケンサーなどで網羅液に解析することで、より詳細に口腔内細菌が骨格筋に与える影響について判明するかもしれない。

今回の研究では、口腔清掃不良などによって口腔内の *P. gingivalis* の増加が起きれば、血管内皮細胞から細菌が体内に侵入し、持久トレーニング後の効果獲得を阻害する可能性が示唆

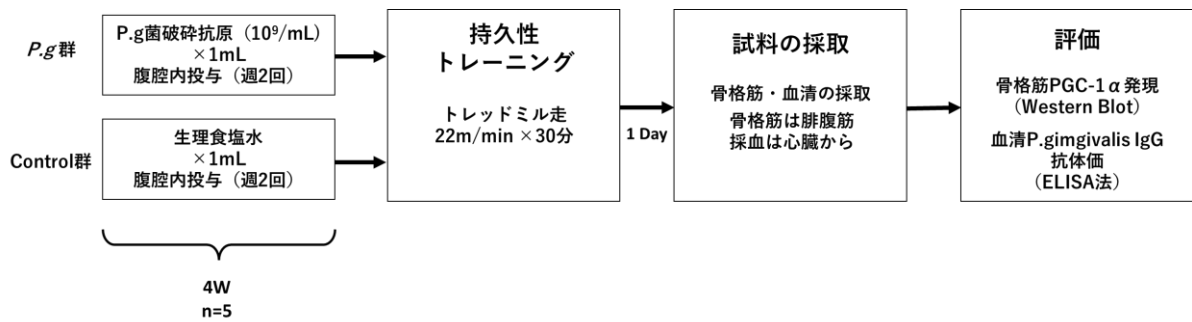
された。この結果は、口腔内環境を整えることがスポーツに役立つという方向の効果のみならず、アスリートなどに対して口腔清掃の重要性を説く際の意識づけに大いに役立つという観点からも大きな意義があったと言える。

参考文献

- 1) Lundby C, R. Jacobs. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp Physiol.* 2016 Jan;101(1):17-22.
- 2) Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:476068.
- 3) Preshaw P.M, Alba A.L, Herrera D, et al. Periodontitis and diabetes: A two-way relationship. *Diabetologia.* 2012 Jan;55(1):21-31.
- 4) Baeza M, Morales A, Cisterna C, et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: Systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci.* 2020 Jan 10;28: e20190248.
- 5) Sanz M, Marco Del Castillo, Jepsen S, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol.* 2020 Mar;47(3):268-288.
- 6) Carrouel F, Viennot S, Santamaria J, et al. Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Front Microbiol.* 2016 Jun 2;7:840.
- 7) Nakayama M, Ohara N. Molecular mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*-host cell interaction on periodontal diseases. *Jpn Dent Sci Rev.* 2017 Nov;53(4):134-140.
- 8) Kumar P.S. From focal sepsis to periodontal medicine: A century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol.* 2017 Jan 15;595(2):465-476.
- 9) Palomer X, Alvarez-Guardia D, Rodríguez-Calvo R, et al. TNF-alpha reduces PGC-1alpha expression through NF-kappaB and p38 MAPK leading to increased glucose oxidation in a human cardiac cell model. *Cardiovasc Res.* 2009 Mar 1;81(4):703-12.
- 10) Wang, D.; Koshy, G.; Nagasawa, T.; Kawashima, Y.; Kiji, M.; Nitta, H.; Oda, S.; Ishikawa, I. Antibody response after single-visit full-mouth ultrasonic debridement versus quadrant-wise therapy. *J Clin Periodontol.* 2006 Sep;33(9):632-8.
- 11) Ohtsu A, Takeuchi Y, Katagiri S, et al. Influence of *Porphyromonas gingivalis* in gut microbiota of streptozotocin-induced diabetic mice. *Oral Dis.* 2019 Apr;25(3):868-880.
- 12) Kojima T, Yano K, Ishikawa I. Relationship between serum antibody levels and subgingival colonization of *Porphyromonas gingivalis* in patients with various types of periodontitis. *J Periodontol.* 1997 Jul;68(7):618-25.
- 13) Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 2011 Nov 17;10(5):497-506.
- 14) Dorn BR, Harris LJ, Wujick CT, et al. A. Invasion of vascular cells in vitro by *Porphyromonas endodontalis*. *Int Endod J.* 2002 Apr;35(4):366-71.
- 15) Teshome A, Yitayeh A. Relationship between periodontal disease and preterm low birth weight: Systematic review. *Pan Afr Med J.* 2016 Jul 12;24:215.

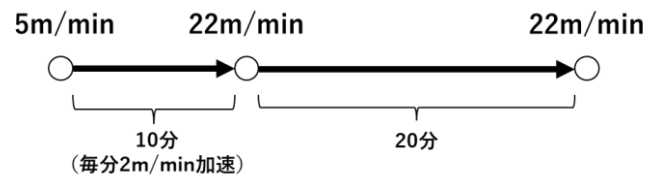
- 16) Scott K. Powers, Edward T. Howley. (内藤久士, ほか訳). 「パワーズ運動生理学」メディカルサイエンスインターナショナル, 2020年. p.317-320
- 17) Hayashi K, Takeuchi Y, Shimizu S, et al. Continuous Oral Administration of Sonicated *P. gingivalis* Delays Rat Skeletal Muscle Healing Post-Treadmill Training. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Oct 11;19(20):13046.

図1：実験概要



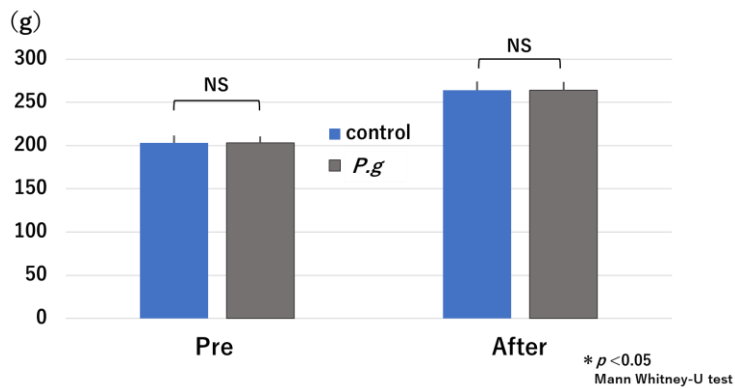
一方の群には *P. gingivalis* の超音波破碎抗原の投与を (*P.g*群)、もう一方の群には同量の生理食塩水の投与を (Control群) 4週間行い、持久性運動介入を一回行いその翌日に血液と右側腓腹筋を採取し、血清中の *P. gingivalis* への抗体価と骨格筋 PGC-1 α の発現量を比較した。

図2：トレッドミルによる運動刺激介入

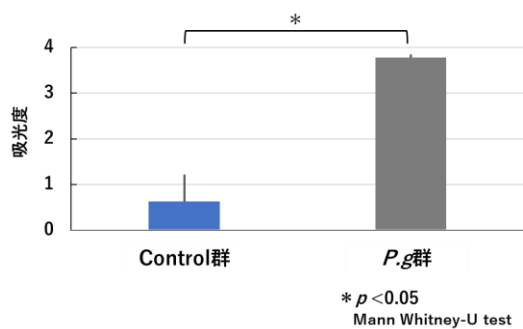


小動物用トレッドミル (大阪マイクロモーター社) を用いて持久性運動介入を行った。5m/min の速度から 10 分かけて 22m/min まで加速させ、その状態で 20 分間運動介入を行った。

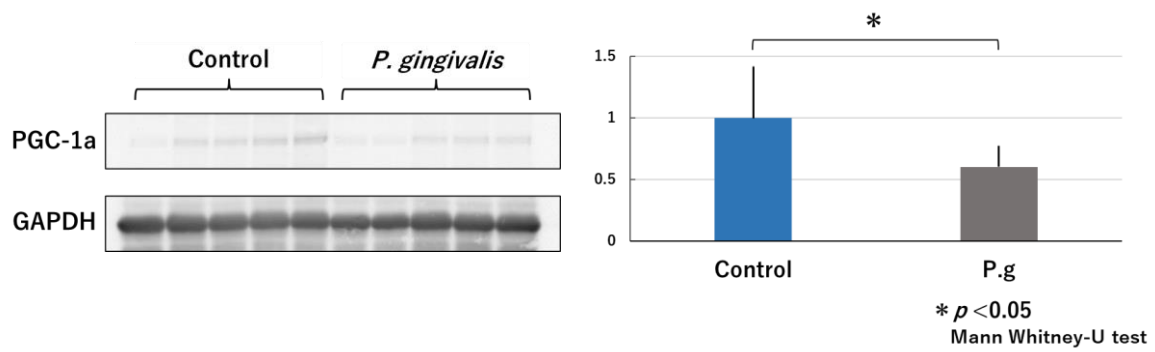
図 3：実験前後での体重変化



実験開始前後ともに両群間で体重に有意差は見られなかった。このことから群間での個体差や

図 4：血清中 *P. gingivalis* IgG 抗体価

Control 群に対して P.g 群で有意に高値を示した。P.g 群で血清中 *P. gingivalis* IgG 抗体価が増加したことから超音波破碎 *P. gingivalis* の腹腔内投与によって全身に *P. gingivalis* 抗原が波及したことが間接的に示された。

図3：骨格筋 PGC-1 α 発現量

*P.g*群で有意に低値となった。運動介入後の腓腹筋における *Pg*群の PGC-1 α の発現量は Control 群の約 60%であった。