

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17364

研究課題名(和文) 歯周炎による動脈硬化の進展に対するToll-like receptorの関与

研究課題名(英文) Involvement of Toll-like receptors in the development of arteriosclerosis due to periodontitis

研究代表者

鈴木 佑基 (Suzuki, Yuki)

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：50783057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：実験的歯周炎を惹起したラットにおいて血中の白血球数、血糖値、トリグリセリドの有意な増加を認めた。また、歯肉における炎症性細胞浸潤の増加、また μ -CTにおける歯槽骨吸収の増加が認められた。また、動脈の評価として、動脈硬化に関連するTLR2、TLR4、MyD88、ICAM-1の動脈における遺伝子発現解析を行い、全てにおいて歯周炎惹起によって有意に増加した。以上より、歯周炎が動脈硬化を増悪させるメカニズムにTLRの関与があることは示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は、口腔内の細菌感染による炎症・免疫反応の結果歯周組織の破壊が起こる疾患である。歯周組織という局所の疾患でありながら全身への影響もあり、糖尿病や心筋梗塞などの関連も明らかとなり、生活習慣病の一つとして位置づけられている。現在、国民の8割は歯周病に罹患しており、歯周治療の必要性が増してきている。これまでに歯周病が動脈硬化の進展に関与する可能性が疫学研究や動物実験により報告されてきた。今回の結果から、歯周炎が動脈硬化を増悪させるメカニズムとしてTLRの関与の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Significant increases in blood leukocyte count, blood glucose level, and triglyceride were observed in rats that induced experimental periodontitis. In addition, an increase in inflammatory cell infiltration in the gingiva and an increase in alveolar bone resorption in μ -CT were observed. In addition, as an evaluation of arteries, gene expression analysis of TLR2, TLR4, MyD88, and ICAM-1 related to arteriosclerosis was performed, and all of them were significantly increased by the induction of periodontitis. These results suggest that TLRs are involved in the mechanism by which periodontitis exacerbates arteriosclerosis.

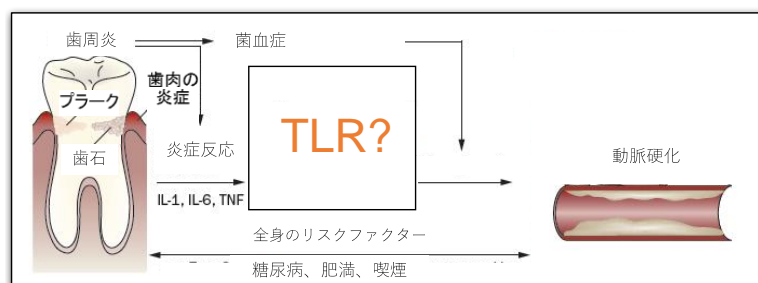
研究分野：歯周病

キーワード：動脈硬化 実験的歯周炎 炎症性サイトカイン TLR

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周ポケット内に存在する細菌の感染が中心となって歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である。歯周病が狭心症・心筋梗塞や脳卒中の主な原因である動脈硬化のリスク因子となることが多くの疫学調査により報告されている。動脈硬化は血管壁の機能障害および炎症を基盤とした複雑な病理過程により形成される進行性の病態である。Yamazaki らは、歯周炎患者において動脈硬化のリスクマーカーとされている血清高感度 C-reactive protein (CRP) が上昇しており、歯周治療によりその値が低下することを報告した (Yamazaki *et al*, *J Periodontol Res*, 2005)。また、動脈硬化の古典的なリスク因子として知られる脂質異常症について、歯周炎患者において high density lipoprotein (HDL) コレステロールが低下していることを報告した。申請者らは歯周炎によって産生された炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α

(TNF- α) が単球を活性化することにより、大動脈における血管内皮細胞の vascular cell adhesion molecule type-1 (VCAM-1) に接着し、動脈硬化の初期病変に関与する

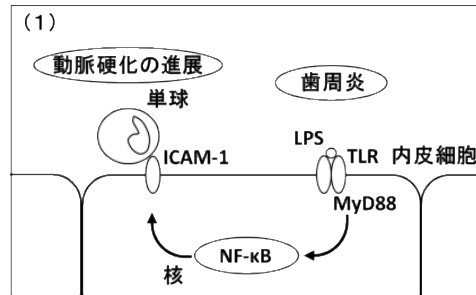


ことを報告した (Miyajima *et al*, *Sci Rep*. 2014)。

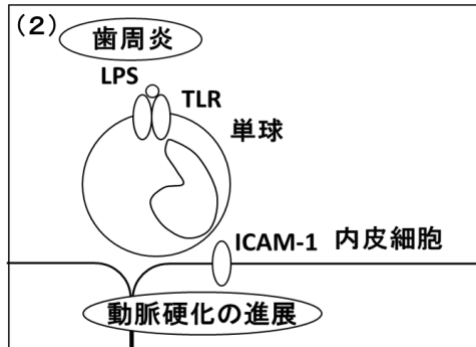
Toll-like receptor (TLR) は自然免疫においてウイルス・細菌の構成成分を認識し、炎症性サイトカイン産生の誘導、樹状細胞の成熟化を介してリンパ球に感染防御のシグナルを伝達するパターン認識レセプターである。Kawashima らは、血管内皮細胞における TLR2 と TLR4 の両者の発現により動脈硬化が相乗的に増強されること、その機序として両受容体のシグナル伝達のクロストークにより転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の相乗的活性化が生じ、その結果接着因子をはじめとした種々の動脈硬化関連遺伝子の発現が増強することを示唆した (Kawashima *et al*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007)。さらに、TLR4 や TLR2 のアダプター分子である myeloid differentiation factor 88 (MyD88) のノックアウトマウスでは、アテローム病変形成が抑制される事が報告されており (Kawai *et al*, *Immunity*, 1999)、TLR2 や TLR4、MyD88 等の TLR signal pathway が動脈硬化発症に関与する事が示唆されている。

Mori らは、正常歯肉と比較して重度歯周炎罹患歯肉では TLR2 および TLR4 の発現が上昇していることを報告した (Mori *et al*, *Oral Microbiol Immunol*, 2003)。これは歯周病原細菌の内毒素 Lipopolysaccharide (LPS) が TLR の発現に関与していることが考えられる。そこで申請者らは以下の発想に至った。

(1) 歯周炎により細菌が血中に入り、大動脈の血管内皮細胞に作用し、歯周病原細菌由来の LPS が TLR により認識され、MyD88 等の TLR signal pathway が転写因子の発現を上昇させることで、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) の発現を上昇させ、単球の動脈への接着を誘導し、動脈硬化初期病変に関与する事が考えられる。



(2) LPS が TLR を介し単球を活性化することにより、大動脈の血管内皮細胞における ICAM-1 接着分子の発現が上昇する可能性が考えられる。



以上の着想より、歯周炎が動脈硬化を増悪させるメカニズムとして想定される、TLR の関与を明らかにする目的で解析を実施する。

2. 研究の目的

歯周病は歯周ポケット内に存在する細菌の感染によって歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である。歯周病原細菌の刺激により活性化されたマクロファージ等の免疫細胞によって産生される TNF- α 等の炎症性サイトカインは免疫応答に重要な役割を果たしており、それぞれ特異的な受容体に結合する。これまでに、歯周炎が動脈硬化の進展に関与する可能性が疫学研究や動物実験により報告され、また我々は歯周炎を惹起させることにより歯周組織のみでなく大動脈においても炎症性サイトカインの増加、大動脈における接着分子の発現が増加することを明らかとし、歯周組織における局所の炎症が大動脈に影響を与える可能性を示してきた。一方、動脈硬化と菌体成分を認識する自然免疫受容体である TLR との関連を示唆する多くの報告がある。今回、歯周炎が動脈硬化を増悪させるメカニズムとして想定される、自然免疫系に作用する TLR の関与を明らかにする目的で、動物実験および培養実験を用いて解析を行う。

3. 研究の方法

本研究期間内において、*in vivo* の実験として、ラットに歯周炎を誘導する。歯周炎の評価として、歯肉における炎症性細胞浸潤を病理学的に検討し、 μ -CT を使用して歯槽骨吸収に対する評価を行い、実験的歯周炎の惹起を確認する。

動脈の評価として、動脈硬化に関連する TLR2、TLR4、MyD88、ICAM-1 等の動脈における遺伝子発現解析を行い、歯周炎誘導による TLR 受容体および転写因子の発現、接着分子の発現を評価する。

(1) 歯周炎モデルラットの作成

7 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに対し、上顎両側第二臼歯の歯頸部に縫合用ナイロン糸を留置し、プラークの停滞を促進させることにより実験的歯周炎を惹起し実験群とする。また無処置のラットを対照群とする。

(2) 組織の採取および検討

歯周炎誘導後 4 週間後に屠殺時の体重、血液および組織の採取を行い、血液、歯周組織および動脈の組織の解析を行う。

(3) 歯周組織の解析

凍結包埋にて歯肉における連続切片を作製し、組織染色を用いて炎症性細胞浸潤の程度を病理組織学的に評価する。歯槽骨吸収の解析は、 μ -CT を用いて評価する。

(4) 大動脈の解析

大動脈の評価として下行大動脈を採取し、qPCR 法を用いて、動脈硬化に関連する TLR2、TLR4、MyD88、ICAM-1 の遺伝子発現解析を行い、遺伝子レベルで評価する。

Fig.1 体重および血液解析

	Control	Periodontitis
weight,g	380±21	381±18
WBC,ul	3900±543	4700±654*
blood glucose ,mg/dl	95±10	110.1±11*
total LPS, pg/ml	ND	ND
serum CRP, mg/dl	ND	ND
triglyceride	101±24	132.1±20*
total cholesterol	53±4	54.3±6

4. 研究成果

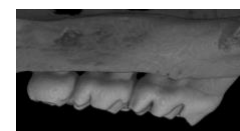
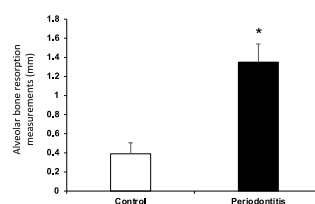
(1) 体重、血液

歯周炎群と対照群との間に有意な差は認めなかった。血液の解析では、白血球数、血糖値、トリグリセリドにおいて歯周炎群で有意な増加を認めたが、総 LPS、血清 CRP、総コレステロールでは差は認めなかった ($p < 0.05$; fig. 1)。

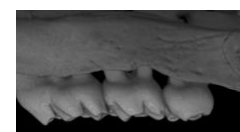
(2) 実験的歯周炎による骨吸収

歯周炎群はナイロン糸を留置した部位を中心として著明な歯槽骨の吸収を認めた。またセメントエナメル境 (CEJ) から歯槽骨頂までの距離を計測した結果、歯周炎群は対照群と比較して有意な歯槽骨の吸収が認められた ($p < 0.01$; Fig. 2)。

Fig.2 実験的歯周炎惹起後の歯槽骨変化



Control

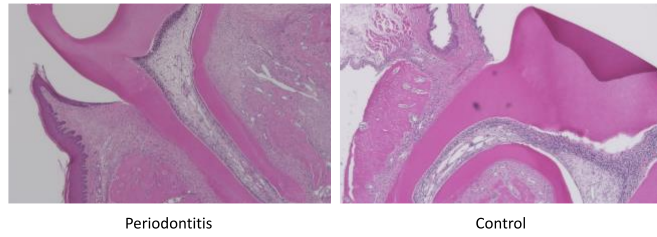


Periodontitis

(3) 歯肉における病理組織学的変化

歯肉組織切片のヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色により炎症性細胞浸潤の評価をした。対照群では、炎症性細胞浸潤は認められないが、歯周炎の惹起により炎症性細胞浸潤の増加を認められた (Fig. 3)。

Fig.3 歯肉における病理組織学的評価



(4) 大動脈における遺伝子解析

歯周炎群大動脈は対照群大動脈と比較して、歯周炎誘導による TLR 受容体および転写因子の TLR-4、TLR-2、MyD88 の遺伝子発現の有意な増加を認めた ($p < 0.05$; Fig. 4)。また、接着分子の発現の評価としての ICAM-1 でも歯周炎群大動脈で有意な遺伝子発現の増加を認めた ($p < 0.05$; Fig5)。

Fig.4 大動脈における動脈硬化に関連する遺伝子発現

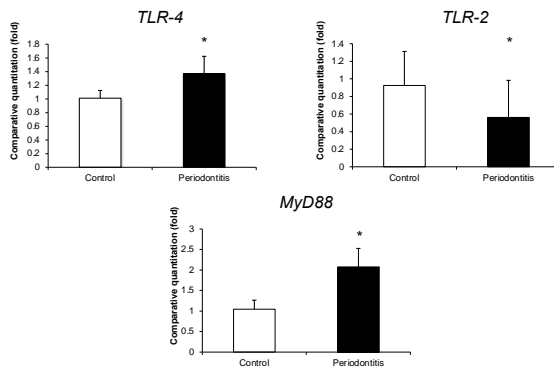
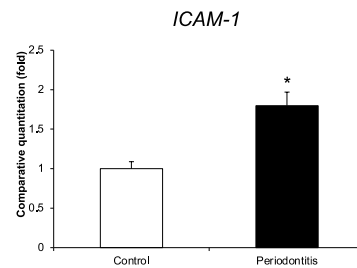


Fig.5 大動脈における接着分子の遺伝子発現



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------