

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592440

研究課題名(和文) 血清アミロイド A を介した歯周病による動脈硬化発症予測の検討

研究課題名(英文) Prediction study of atherosclerosis by periodontal disease through serum amyloid A.

研究代表者

吉成 伸夫 (YOSHINARI NOBUO)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20231699

研究成果の概要(和文)：歯周病と動脈硬化症の関連に関する血清アミロイド A (Serum Amyloid A: SAA) の関与を検索するのが本研究の目的である。このために動脈硬化易形成性 ApoE ノックアウトマウスに IL-6 を投与し、肝臓での SAA 遺伝子発現、血中 SAA 濃度、大動脈での動脈硬化程度を観察、計測した。その結果、SAA の mRNA 量、血中タンパク量ともに発現が上昇し、血管内壁の脂肪沈着量は増大した。以上より、歯周病により産生される IL-6 刺激で、肝臓での SAA 産生が上昇し、動脈硬化発症を誘導することが確認された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study concerning the relation between periodontitis and arteriosclerosis is to examine whether Serum Amyloid A: SAA could be a marker of atherosclerogenesis in homozygous ApoE deficient mice. In mice, periodontopathic IL-6 was inserted to intraperitoneal injection. SAA m-RNA level in liver, serum SAA level, and the atherosclerosis level were measured. In IL-6 injected group, serum SAA m-RNA level, SAA level in IL-6 were higher than PBS injected group, and the area rate of an atherosclerosis were increased. Therefore, we suggest that SAA increased by IL-6 stimulation made due to periodontitis could cause the onset to an atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度			
2012 年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎、心臓血管疾患、疾患モデル、血清アミロイド A、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

心臓血管疾患(cardiovascular disease: CVD)とは、心臓血管系に影響を与える多くの疾患の総称であり、高血圧症、冠

状動脈疾患、脳血管性疾患、末梢血管疾患、心不全、リウマチ性心疾患、先天性心疾患および心筋症等が含まれる。すなわち、心臓血管疾患は、日本人の死

因順位第2位の心臓病と第3位の脳血管疾患を合わせた疾患群であり、両者を合計すると、第1位の悪性新生物に匹敵する死亡数となる。

また、CVDによる死亡者の80%以上が、65歳以上の人々である。日本では、1965(昭和40)年以降の急速な中高年死亡率の改善により、世界一の長寿国が達成され、超高齢社会を迎えつつある。そんな中で、この疾患は急死することがあり、また急死が避けられても生活の制限を要する場合が多く、Quality of Lifeは低下する。65歳未満と65歳以上のそれぞれ上位5傷病の構成割合をみると、65歳未満では「呼吸器系の疾患」、「循環器系の疾患」、「新生物」の3傷病で35.3%であるのに対し、65歳以上では「循環器系の疾患」のみで32.2%を占めている。循環器系の疾患が、そのまま心臓血管疾患には当てはまらないが、多くの割合を占めていると推察される。

さらに、「循環器系の疾患」の治療や療養に要する医療費は高額となり、患者、国家財政にも大きな支出となっている。すなわち、平成17年度の一般診療医療費は3兆1,289億円であり、一般診療医療費を主傷病による傷病分類別にみると、「循環器系の疾患」5兆3,792億円(21.6%)が最も多く、2位の「新生物」3兆535億円(12.2%)を大きく引き離している。よって CVDの予防、治療は、今後の日本の医療において大きな課題である。

前述の通り、CVDには様々な疾患が含まれる。しかし、大部分の心臓血管疾患の原因は、動脈壁が肥厚し、弾性が低下して硬化する動脈硬化症を起こすことにある。この病態は血栓症を引き起こし、さらには遠隔部位の脈管の梗塞原因となり、生命

に関わる結果に結びつく。現在、動脈硬化症は慢性炎症性疾患とも考えられており(Ross R., 1999)、血管の内腔を被覆している血管内皮細胞の傷害と、それに続く血管壁中の脂質沈着、線維性結合組織の増生、内膜の肥厚などをきたして、血管内腔の狭窄や閉塞をきたす。

1990年代より、歯周病とCVDとの疫学的関連性が横断的研究やケースコントロール研究により提示され、その後の縦断的研究で、従来のリスクファクターが補正、再分析されている。しかし、口腔の健康や歯周病の存在が心臓血管疾患のリスク因子になるとする報告(Beck JD, et al., 1996)と、両疾患の関連性を支持しない報告(Khader YS, et al., 2004)が存在し、見解の一致をみていない。

歯周病は、主に嫌気性あるいは通性嫌気性のグラム陰性桿菌、スピロヘータなどの口腔内の常在細菌による日和見感染、あるいは、特異性細菌による感染症である。さらに最近では、バイオフィーム感染症としても認識されるようになった。この細菌感染に対して宿主側は、歯肉の物理的防御機構、好中球による異物の貪食、殺菌作用にて対応するが、さらに免疫担当細胞(マクロファージ、リンパ球)が産生するサイトカイン(主にIL-1, IL-6, TNF- α)やプロスタグランジンなどの炎症性メディエーターにより、免疫防御機構を働かせる。しかし、細菌性プラークの除去ができないと歯周ポケット内に存在する細菌を完全に排除するには至らず、細菌刺激が慢性的、かつ持続的に存在し続けることになる。これにより、炎症、免疫応答の遷延化が起こり、歯周組織は破壊される。さらに、歯周組織に多量に存在する細菌や過剰に産生されたサイトカインが血中に流入し全身

を循環することになる。

これらの歯周組織由来の細菌やサイトカインは、血液を介して動脈硬化部に到達し、さらなるサイトカインや炎症性メディエーターを産生することにより、血管内皮細胞や活性化マクロファージを刺激し、動脈硬化病変を悪化させる結果が動物実験で証明されている(Li L, et al., 2002). すなわち、口腔という局所性炎症疾患である歯周病が、全身性の動脈硬化症に影響を与える機序が明らかになりつつある。

2. 研究の目的

我々は、現在まで動脈硬化症易形成性であるApoEノックアウトマウスに*Porphyromonas gingivalis*を感染させたモデル動物を作製し、肝臓での血清アミロイドA (Serum Amyloid A: SAA)のmRNA発現上昇をマイクロアレイにて検出した。さらに、マウスの歯周組織にIL-6を注入した場合、肝臓でのSAAのmRNA発現、血中SAAの上昇を確認した(尾藤, 2006)。これらの結果は、歯周組織中の細菌、細菌産生物、あるいは歯周組織で産生されたサイトカインが血中に移行して肝臓に到達し、肝細胞を刺激してSAAの産生上昇をきたしたことを示している。しかし、現在、SAAの産生上昇による動脈硬化症の発症、悪化は確認されていない。そこで今回、SAAが、心臓血管疾患の原因となる動脈硬化症の発症、増大に関与しているか否かを検討し、歯周病と動脈硬化症の関連に関するSAAの関与を検索するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)実験動物:ApoEノックアウトマウスは、The Jackson Laboratoryより、オリエンタル酵母工業株式会社バイオ事業本部を通じて雄雌のペアを購入し、当施設で繁殖させ、実験に供した。

(2)実験的歯周炎モデルの作成:生後8週齢の雄性ApoEノックアウトマウス60匹を実験に供した。動物を30匹ずつPBS注入群, IL-6注入群の2群に分け, PBS注入群には0.1% bovine serum albumin(BSA)含有PBSを, IL-6注入群には, この溶液で希釈したrecombinant mouse 500ngIL-6 (406-ML, R&D Systems, Minneapolis, MN), 50 μ lを腹腔内に注入した。すべての注入, 投与は連続して3日間行った。なお, 普通食と飲料水に関しては両群とも自由摂取させた。

(3)試料の保存(図1):各群のマウスは投与終了後, 1日, 1, 4, 8, 12週で眼窩静脈叢から血液を採取し, その後, 各群6匹ずつを安楽死させ, そのうち2匹は肝臓の外側左葉部を摘出, 約30mgの小片に分け, 液体窒素にて瞬間凍結後, -80 $^{\circ}$ Cフリーザーにて保存, mRNA検索用試料とし, 残り4匹は心臓から鼠径部までの大動脈を摘出, 組織染色用試料とした。また, 採取した血液は, 4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した後, 血清を4 $^{\circ}$ C, 20分, 2,000Gで遠心分離機により分離, -80 $^{\circ}$ Cで保存した。

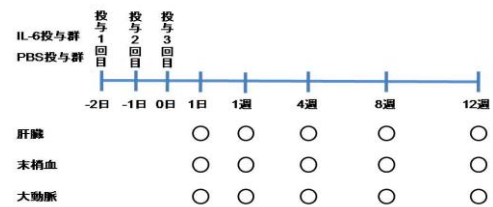


図1. 研究方法

(4)real-time PCR法:採取した肝臓の重量を測定し, 約30mgに調整した後, NucreoSpint® RNAII (740.955.05, タカラバイオ株式会社, 東京)にてtotal RNAを抽出, そのうち1 μ gをPrimescript® RT-PCT Kit (RR014A タカラバイオ株式会社, 東京)にて逆転写, cDNAを合成した。このcDNAを鋳型としSAA mRNAの検出, 定量化をreal-time PCR法にて行った。なおPCRはサイバーグリーン法を選択し, POWER SYBR® GREEN PCR MASTER MIX(436759,

Applied Biosystem, USA)を使用した。検出は Applied Biosystem 7500(Applied Biosystem, USA)にて行った。

(5)動脈硬化症の発症，進行程度の検索：取り出した大動脈を4%パラホルムアルデヒド(和光純薬，大阪)にて灌流固定および、後固定した後、大動脈の内面を開いた。PBSにて洗浄後， Sudan IV 染色液(0.5%SudanIV(sigma),35%エタノール,50%アセトン)にて6分間染色したのち,80%エタノールに5分間脱染色を行った.Sudan IVにて染色された大動脈は，実体顕微鏡(LEICAS8APO, Leica Microsystems,Germany)にて撮影し，Image J(National Institutes of Health, Bethesda, Maryland)を使用して形態計測画像処理が行った。動脈内壁の脂質沈着(プラーク)程度は，血管内腔表面積全体に対するプラークの割合(プラーク面積/大動脈内腔面積)にて求めた。

(6)血中SAA蛋白量の測定：ELISA法にて採取した血清中のSAA量を測定した。PlateはMouse SAA Immunoassay Kit(KMA0011, Invitrogen, USA)を使用し，測定はPowerscanHT(DSファーマ,大阪)にて行った。

(7)結果の判定:SAAが肝臓由来のであることをreal-time PCR法の結果で判定し，ELISA法により血中SAA量を測定する。病理組織結果からは動脈硬化病変の悪化を確認し，動脈硬化症の進行度合が血中SAA量に依存していることを組織所見とELISA所見から判定，SAAの産生上昇による動脈硬化症の発症，悪化について検討した。統計学的検定は，一元配置分散分析(ANOVA)のBonferroni法にて有意差検定を行い，危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1)肝臓でのSAAmRNAの発現(図2): IL-6投与群では1日後にSAAmRNAが著明に上昇し，その

後の1週，4週，8週経過時にはほとんど発現は見られなかった。PBS投与群では全期間を通して発現は認められなかった。

(2)血中SAA濃度(図3): IL-6投与群では1日経過後にSAAタンパク量が著明に上昇し，その後，1週，4週，8週，12週経過時にはほとんど見られなかった。PBS投与群では全期間を通してSAAタンパク量の上昇は認められなかった。

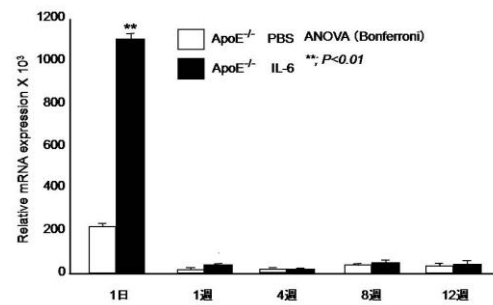


図2. 肝臓でのSAAmRNA発現量

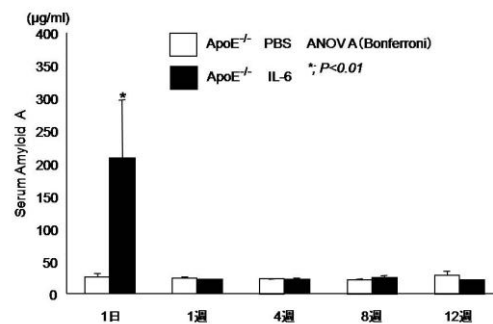


図3. 血中SAA濃度

(3)病理組織所見：大動脈弓から鼠径部までの大動脈縦断内膜にSudanIV染色したところ，IL-6投与群では，経時的に脂肪沈着部位が増加していた(図4，5)。画像上にて脂肪沈着面積率

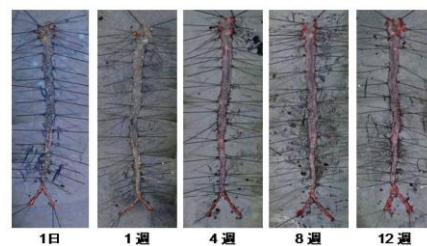


図4. IL-6投与群 大動脈縦断切片(Sudan IV染色)

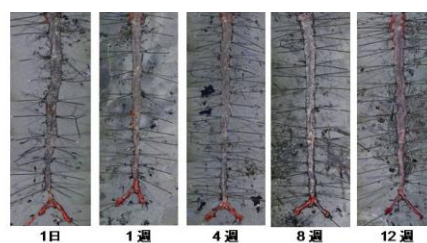
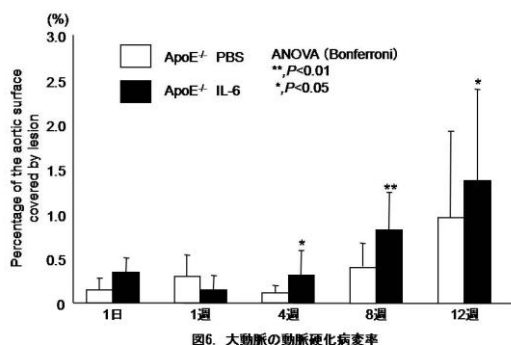


図5. PBS投与群 大動脈縦断切片(Sudan IV染色)

を算出すると、図6に示すように、IL-6投与群ではPBS投与群と比較して、4週経過以後で脂肪沈着率が有意に増加し、動脈硬化病変部が増大していることが認められた。



以上の結果より、IL-6を投与することで、ApoEノックアウトマウスのSAAは、mRNA、タンパク量ともに1日後に著明に増加した、さらに血管内膜への脂肪沈着量も増加した。すなわち、局所の炎症性疾患である歯周炎部位で産生されるIL-6は、肝臓を刺激して、SAAが産生され動脈硬化症を誘導していることが確認された。今後、大動脈および心臓の組織にてSAAおよびSAAレセプターを免疫染色することにより、動脈硬化症に対する作用機序を解明していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

①A Taguchi, N Sugino, M Miki, Y Kozai, N Mochizuki, H Osanai, S Yamada, H Kuroiwa, T Fujiki, K Uchida, N Yoshinari, and I Kasai, Detecting young Japanese adults with undetected low skeletal bone density using panoramic radiographs, Dentomaxillofacial Radiology, 査読有, 109巻, 2011, 154-159

②山口正人, 足立忠文, 大石めぐみ, 中塚久美子, 横井磯子, 吉成伸夫, 黒岩昭弘, 増田裕次, 健常高齢者における多方位口唇閉鎖力その特性と体格・握力・残存歯との関連, 日

本顎口腔機能学会雑誌, 査読有, 17巻, 2011, 125-134

③内田啓一, 三木学, 吉成伸夫, 田口明, 角化嚢胞性菌原性腫瘍の1例のMagnetic resonance (MR)画像-MR imaging (MRI)の信号強度について-, 松本歯学, 査読有, 36巻, 2010, 214-219

④西窪結香, 中島靖子, 窪川恵太, 吉成伸夫, ライフワークとしての歯科衛生士像を考える—セルフケアが困難でありながらSupportive Periodontal Therapy (SPT)により歯周組織の改善が得られた症例を通して—, 日本顎咬合学会誌, 査読無, 30巻, 2010, 236-244

⑤Hishikawa T, Izumi M, Naitoh M, Furukawa M, Yoshinari N, Kawase H, Matsuoka M, Noguchi T, Ariji E, The effect of horizontal X-ray beam angulation on the detection of furcation defects of mandibular first molars in intraoral radiography, Dentomaxillofac. Radiol., 査読有, 39巻, 2010, 85-90

⑥Yoshiko Ariji, Akira Taguchi, Shigemitsu Sakuma, Manabu Miki, Takayuki Asawa, Keiichi Uchida, Nobuo Yoshinari, Yuichiro Hiraiwa, Yoshitaka Kise, Masahiro Izumi, Munetaka Naitoh, Akitoshi Katsumata, Eiichiro Ariji, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 査読有, 109巻, 2010, 908-916

⑦西田英作, 横井隆政, 窪川恵太, 阪中孝一郎, 匹田雅久, 吉成伸夫, 歯科用レーザーが植え込み型除細動器へ与える電磁障害について, 日本レーザー歯学会誌, 査読有, 20巻, 2009, 54-61

⑧三木学, 内田啓一, 浅輪貴行, 上原大輔, 深澤常克, 吉成伸夫, 田口明, MR sialographyの有用性, 松本歯学, 査読有, 35巻, 2009,

⑨ Catherine Champagne, Nobuo Yoshinari, Joyce Oetjen, Estelle Riché, James Beck, Steven Offenbacher, Gender Differences in Systemic Inflammation and Atheroma Formation Following Porphyromonas gingivalis Infection in Heterozygous Apolipoprotein E-Deficient Mice, J. Periodont. Res., 査読有, 44巻, 2009, 569-577

⑩ 吉成伸夫, 横井隆政, 歯周病と動脈硬化性疾患との関連性, 松本歯学, 査読無, 34巻, 2008, 255-277

[学会発表](計5件)

① Akira Taguchi, Manabu Miki, Keisuke Migita, Yukihiro Higashi, Nobuo Yoshinari, Association of tooth loss with silent lacunar infarction. IADR/AADR/CADR 89th General Session & Exhibition, 2011年3月18日, (San Diego, USA)

② Manabu Miki, Akira Taguchi, Yukihiro Higashi, Nobuo Yoshinari, Comparison of content of water in the muscles of mastication. IADR/AADR/CADR 89th General Session & Exhibition, 2011年3月18日, (San Diego, USA)

③ Keita Kubokawa, Eisaku Nishida, Hiroyuki Kamiyama, Akira Taguchi, Nobuo Yoshinari, Effect of atherosclerogenesis by SAA in ApoE deficient mice. The 96th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology held in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, 2010年10月31日, (Honolulu, USA)

④ 三木学, 佐藤徳志, 窪川恵太, 西田英作, 横井隆政, 吉成伸夫, 内田啓一, 田口明, 松本歯科大学病院受診患者における実態調査-歯周病科受診患者のデンタルエックス線写真による検討-第52回春季日本歯周病学会学

術大会, 2010年5月11日, (岡山)

⑤ 吉成伸夫, 前島信也, 歯周治療と全身疾患との関わりについて. 平成21年度長野県歯科医師会第2回学術大会(東海信越地区歯科医学大会分科会併催), 2010年1月31日, (塩尻)

[図書](計2件)

① 横井磯子, 吉成伸夫, Dd デンタルダイヤモンド社(東京), こんな事故が起ったらポケットブックトラブル vs リカバリー, 2010, 106-107, 108-109, 110-111

② 稲垣幸司, 三谷章雄, 山本弦太, 伊藤正満, 菊池毅, 石原裕一, 野口俊英, 石原磯子, 上條博之, 坂本浩, 河谷和彦, 吉成伸夫, 株式会社第一歯科出版(東京), 最新の歯周外科手術をマスターしよう-基本から高度症例の応用まで-, 株式会社第一歯科出版(東京), 2010, 72-85, 96-97, 124-130

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉成伸夫(YOSHINARI NOBUO)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号:20231699

(2)研究分担者

土田 祥央(TSUCHIDA SACHIO)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号:90410422

横井隆政(YOKOI TAKAMASA)

松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号:40469010

(3)連携研究者

研究者番号: