

平成22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008 ～ 2009  
 課題番号：20791618  
 研究課題名（和文）：レニンアンギオテンシン系を軸とした歯周病とメタボリック症候群の分子生物学的解析  
 研究課題名（英文）：Molecular biological analysis of periodontitis and metabolic syndrome based on renin-angiotensin system  
 研究代表者  
 中村 利明（NAKAMURA TOSHIAKI）  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
 研究者番号：60381183

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、メタボリックシンドロームの全段階における関与が示唆されているレニン-アンギオテンシン系(RAS)と、歯周組織および歯周病病態との関わりを検討した。その結果、ヒト歯肉組織においてRAS構成因子の遺伝子発現を確認し、ヒト線維芽細胞培養系においてRASの主要な受容体であるアンギオテンシンI型受容体(AT1R)がIL-1 $\beta$ 誘導IL-6の産生に関与する可能性が示唆された。これらからヒト歯周組織においてRASが存在し、歯周病の病態形成に関与している可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study was to investigate the expression of renin-angiotensin system (RAS) components, which has been considered to be concerned with several steps of metabolic syndrome, in human gingival tissues and the effects of RAS on inflammatory reactions in cultured human gingival fibroblasts (HGF). This study demonstrated that tissue RAS exists in HGT and IL-6 induced by IL-1 $\beta$  may be partially regulated through AT1R in HGF. These facts suggest that RAS may be involved in the regulation of inflammatory responses in periodontal disease.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯周治療系歯学

科研費の分科・細目：歯周免疫機能学

キーワード：①歯周病 ②歯肉 ③メタボリックシンドローム ④アンジオテンシン ⑤RAS

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームとは、内臓脂肪の蓄積とインスリン抵抗性を基盤として、耐糖能異常(糖尿病)、脂質代謝異常(高中性脂肪血症、低 HDL コレステロール血症)、高血圧などの動脈硬化の危険因子が、一個人に集積している状態である。近年、この病態を理解していく上で、時間軸での流れと連鎖反応を重視したメタボリックドミノという概念が提唱されている。この発生機序として、アディポサイトカインや、メタボリックドミノの全段階における組織レニン-アンギオテンシン系(RAS)の関与が注目されており、今回このRASを基盤とした、メタボリックシンドロームと歯周病との関係に着目した。RASはアンギオテンシノーゲンを基質とし、その変換酵素および受容体(AT1R, AT2R)からなるホルモンシステムである。RAS系の産生物であるアンギオテンシンII(Ang II)は様々な生理活性を持つが、アテローム性動脈硬化との関連などの報告から、RASは炎症反応を担う主要因子の一つと考えられており、種々の組織におけるAng IIの作用に注目が集まっている。そこで今回、歯周組織におけるAng IIの作用に関して興味を得た。我々のグループでは血圧・血管疾患、脳血管疾患、糖尿病等の既往を持つ患者では歯周組織状態に悪化が認められることを報告してきた。これらの疾患はメタボリックドミノでは下流にあたり、既に様々な組織RASが活性化している状態と考えられる。これらのことから、RAS活性化により産生されるAng IIが歯周組織に作用することにより、歯周病の病態形成・進行に相互に関与しているのではないかとこの着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究では、*in vivo*におけるRAS構成要素およびそのレセプター群の歯周組織局所での発現解析、および歯肉線維芽細胞等の歯周組織由来細胞を用いた*in vitro*におけるRASの構成要素の発現解析とAng IIの作用解析を中心に実施する。それらの結果から、ヒト歯周組織、および歯周病におけるRASの関与を明らかにし、ひいてはメタボリックドミノの一連の流れの中で歯周疾患がどのように関与するか、基礎的情報を得ることにより、ペリオドンタルメディスンに新しい知見を提供し、歯周疾患にとどまらず、全身の健康の治療・予防への新しいアプローチとして発展させることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1)ヒト歯肉組織におけるRAS構成要素の遺伝子発現解析

歯周外科もしくは抜歯時に健常歯肉および炎症歯肉を採取し、RNAを抽出後、RASを構成する主な因子[AT1R、angiotensinogen (AGT) angiotensin-converting enzyme (ACE)、renin]についてRT-PCR法にて遺伝子発現を検討した。

(2)ヒト歯肉組織におけるAT1Rの発現

健常歯肉、炎症歯肉より通法に従い凍結切片を作成し、免疫組織化学染色にてAT1Rの発現を検討した。

(3)HGFにおけるIL-1 $\beta$ 刺激後のRAS構成要素の遺伝子発現変化

ヒト健常歯肉より分離培養した、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を用いてIL-1 $\beta$ 刺激後のRAS関連因子の変化をRT-PCR法またはReal-time PCR法を用いて検討した。

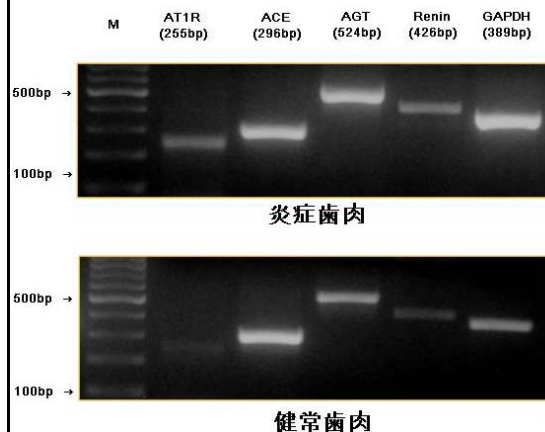
(4)IL-1 $\beta$ 刺激下のHGFにおけるAT1Rの機能解析

small interfering RNA (siRNA)を用い、AT1Rの発現抑制を抑制したHGFの培養系を作成し、IL-1 $\beta$ 刺激下で産生促進されるIL-6に対するAT1Rの機能をReal-time PCR法およびELISAを用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1)ヒト歯肉組織におけるRAS構成要素の遺伝子発現

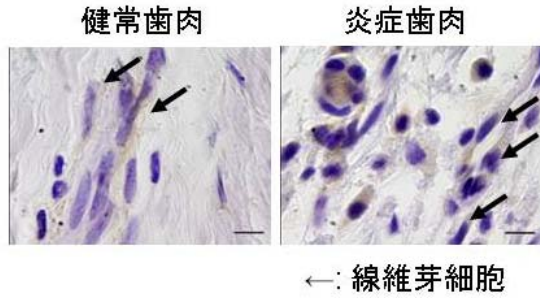
図1. 健常歯肉および炎症歯肉におけるRAS遺伝子の発現



ヒトの炎症および健常歯肉において RAS 構成因子の AT1R, ACE, AGT および Renin の遺伝子発現を確認した(図 1)。

(2) ヒト歯肉組織における AT1R の発現

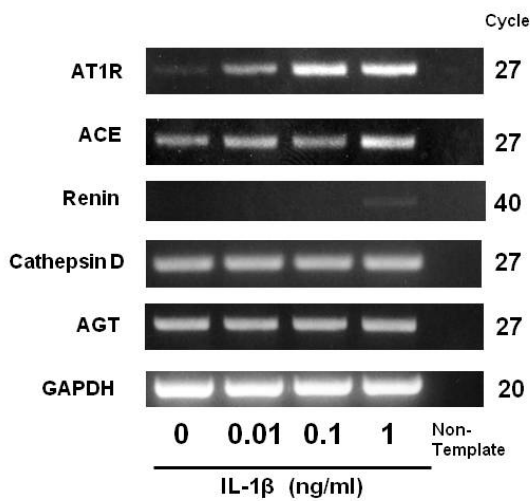
図 2. 炎症歯肉、健常歯肉における AT1R の発現



炎症歯肉において、炎症性細胞と線維芽細胞(矢印)に AT1R の発現を多く認めた。それと比較して健常歯肉では線維芽細胞に AT1R 弱陽性をわずかに認めるのみであった。

(3) HGF における IL-1 $\beta$  刺激後の RAS 構成要素の遺伝子発現変化

図 3. HGF における RAS 遺伝子の変化(RT-PCR)

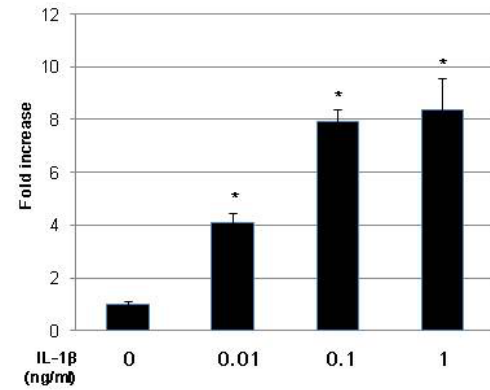


HGF において AT1R, ACE, AGT, カテプシン D の遺伝子発現を認めたが、Renin はわずかにその発現を認めるのみであった。また IL-1 $\beta$  刺激濃度依存的に AT1R, ACE の遺伝子発現の増強を認めた。次に AT1R の発現量を Real-time PCR にて定量した結果を示す。

② AT1R ③ ACE の遺伝発現変化 (Real-time PCR)

図 4 AT1R の遺伝発現変化

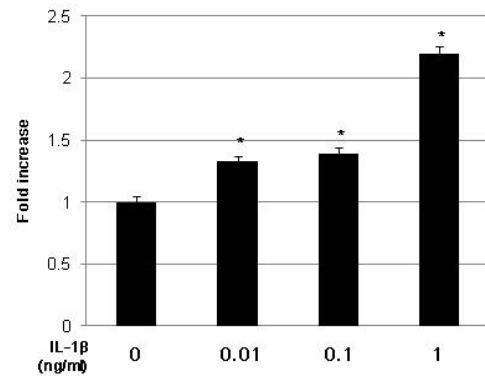
\*: vs IL-1 $\beta$  無刺激,  $p < 0.05$ .



IL-1 $\beta$  濃度依存的に無刺激時と比較して約 4~8 倍の遺伝子発現の増加を認めた。

図 5 ACE の遺伝発現変化

\*: vs IL-1 $\beta$  無刺激,  $p < 0.05$ .

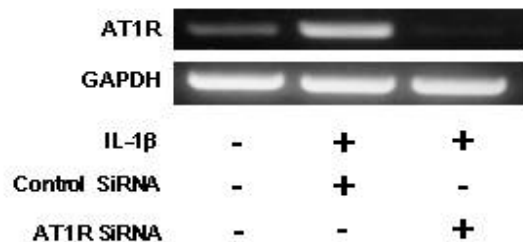


IL-1 $\beta$  濃度依存的に無刺激時と比較して約 1.5~2 倍の遺伝子発現の増加を認めた。

(4) IL-1 $\beta$  刺激下の HGF における AT1R の機能解析

① HGF における AT1R 遺伝子発現抑制系の作成

図 6 AT1R siRNA を用いた遺伝子発現抑制



HGF に AT1R 遺伝子の発現を抑制する AT1R

siRNA と Control として Control siRNA を導入、IL-1 $\beta$  刺激(0.1ng/ml)を行った結果を図6に示す。

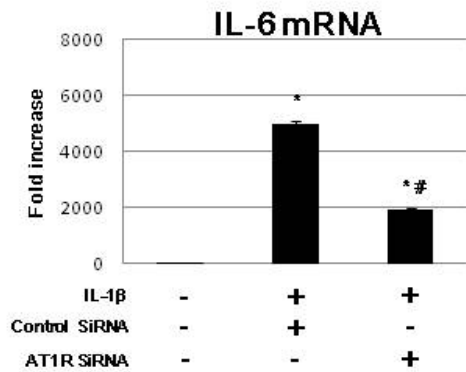
IL-1 $\beta$  刺激により発現が増強した AT1R 遺伝子は、AT1R siRNA 導入によりその発現が抑制されている。また housekeeping gene である GAPDH は、Control および AT1R siRNA 導入群においてその差は認められない。

このことから、HGF における AT1R 遺伝子発現抑制系の確立がなされたことを確認し、次に IL-1 $\beta$  刺激により発現が促進される因子のうち、IL-6 に関してその遺伝子発現、上清中のタンパク発現の解析を行った。

#### ②HGF の AT1R 遺伝子発現抑制系における IL-1 $\beta$ 刺激下の IL-6 の変動

(4)-①で作成した HGF の AT1R 遺伝子発現抑制系において IL-1 $\beta$  刺激下(0.1ng/ml)での IL-6 の遺伝子発現を図7に、上清中のタンパク濃度を図8に示す。

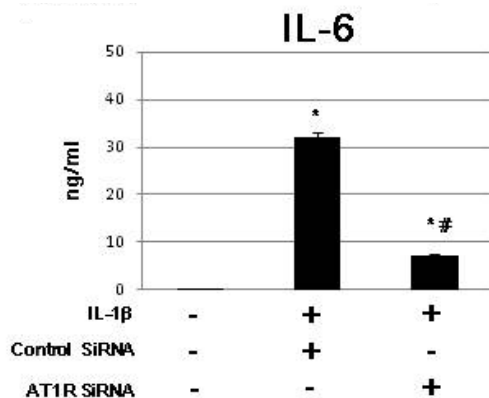
図7 HGF における AT1R 遺伝子発現抑制下での IL-6 遺伝子発現



\*: vs IL-1 $\beta$  無刺激, p< 0.05.

#: vs Control siRNA 導入 HGF, p<0.05

図8 HGF における AT1R 遺伝子発現抑制下での培養上清中の IL-6 タンパク濃度



\*: vs IL-1 $\beta$  無刺激, p< 0.05.

#: vs Control siRNA 導入 HGF, p<0.05

AT1R の遺伝子発現を抑制した結果、IL-1 $\beta$  で誘導される IL-6 の遺伝子、上清中のタンパク濃度ともに有意に減少した。

#### (5)結論・考察

本研究より、ヒト歯肉組織において、RAS を構成する AT1R, ACE, AGT, Renin の遺伝子発現を認め、また炎症歯肉において炎症性細胞と線維芽細胞に AT1R の発現を多く認めた。ラット歯肉組織では、同様に RAS 遺伝子の発現と、歯肉組織の Angiotensin peptides の産生能力がすでに報告されている<sup>1)</sup>。また、ヒト単球/マクロファージ系の細胞において、LPS 刺激により誘導される TLRs や炎症性サイトカインが、AT1R blocker により抑制されることも報告されている<sup>2)</sup>。本研究においては、*in vitro* の系において HGF の RAS 系遺伝子(AT1R, ACE AGT, カテプシン D)の発現と、IL-1 $\beta$  刺激による AT1R, ACE の遺伝子発現の上昇、および IL-1 $\beta$  誘導 IL-6 の産生に AT1R の関与が示唆された。これらから、歯肉組織 RAS 系の存在と、歯周病における Angiotensin-AT1R 系を介した関与が示唆された。炎症の病態において、RAS 系は重要な役割を担っている。血管壁を構成する細胞群では AngII 刺激により炎症性サイトカイン、ケモカイン、接着因子の発現を亢進する。歯肉には様々な細胞種が存在するが HGF 以外の詳しい RAS 系の機能は未だ不明である。また近年、メタボリックシンドロームにおいてはアディポサイトカインの関与が注目されており、AGT はアディポサイトカインの一つである。AGT 自身と、それを変換し AngII を産生する酵素群の遺伝子発現を歯肉組織でも認めることから、メタボリックシンドロームの病態で産生される AGT が血流を介して歯肉組織に作用する、または歯周病の病態の中で、局所で AGT または AngII の産生が上昇している可能性が推察される。しかしながらヒト歯肉組織局所での AngII の産生を直接示す報告は未だ存在せず、今後の研究課題である。また、血圧低下によらない臓器保護作用に注目が集まっている AT1R Blocker に関しても、歯周病に対する作用は疫学的報告等、皆無であり、積極的に解明しなければならない。AT1R や ACE はその遺伝子多型と歯周病との関連が報告されており<sup>3)</sup>、RAS 系と歯周病の病態は一部関連していることが推察される。今後、様々な歯周組織構成細胞における RAS 系の機能解析や、AT1R Blocker を服用患者における歯周病の状態などの疫学的研究など、さらなる検討が必要である。

(参考文献)

- 1) Santos CF, Akashi AE, Dionisio TJ, Sipert CR, Didier DN, Greene AS *et al.* (2009). Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol* 80(1) :130-139.
- 2) Dasu MR, Riosvelasco AC, Jialal I (2009). Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 202(1) :76-83.
- 3) Gurkan A, Emingil G, Saygan BH, Atilla G, Kose T, Baylas H *et al.* (2009). Renin-angiotensin gene polymorphisms in relation to severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 36(3) :204-211.

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 利明 (NAKAMURA TOSHIAKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号 : 60381183