

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10181

研究課題名(和文) 歯周炎惹起酸化ストレスに鉄代謝が及ぼす影響と体血管反応性改善のための臨床的戦略

研究課題名(英文) Effects of iron metabolism on periodontitis-induced oxidative stress and clinical strategies to improve systemic vascular reactivity

研究代表者

高石 和美 (TAKAISHI, Kazumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授

研究者番号：20325286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト冠動脈血管内皮細胞において、歯周病原菌由来リポポリサッカライド(LPS)刺激によって細胞内鉄イオン濃度は上昇した。プラバスタチンは、LPS刺激による細胞内鉄イオン濃度上昇とBIRC3発現上昇を低下させる傾向を示した。軽度歯周炎モデルラットにおける血管反応性低下のメカニズムの一つとして鉄代謝が影響し、プラバスタチンは、BIRC3発現上昇の低下を介して歯周炎惹起全身性炎症反応による血管反応性低下に対し保護的役割をもつ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎惹起全身血管機能の障害が生じる機序の詳細は明らかではない。本研究では、歯周炎によって惹起される全身性炎症反応と血管反応性低下に対する鉄代謝の影響について検討した。軽度歯周炎惹起血管反応性低下のメカニズムの一つとして鉄代謝が影響することが示唆された点に学術的意義があると考えられる。歯周病は大多数の成人が罹患する疾患で、全身の疾患や生活習慣病との関連に関する解明は社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：In human coronary artery endothelial cells, stimulation with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* (LPS-PG) increased the intracellular iron ion concentration. Pravastatin tended to suppress the increase in intracellular iron ion concentration and BIRC3 expression caused by LPS-PG stimulation. It was suggested that iron metabolism may play a role of the mechanisms of decreased vascular reactivity in mild periodontitis model rats, and that pravastatin protects against decreased vascular reactivity caused by periodontitis-induced systemic inflammatory response through decreasing the increase in BIRC3 expression.

研究分野：歯科麻酔科学

キーワード：歯周炎 全身疾患 血管反応性 冠動脈血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、虚血性心疾患、脳梗塞などの動脈硬化性疾患や糖尿病、高血圧などの成人病と関連が指摘され、歯周組織の慢性炎症が全身性の炎症反応を惹起することが報告されてきた (Suh JS et al, Int J Oral Sci, 2019; Miyajima S et al, Sci Rep, 2014)。しかし、歯周病と関連する全身疾患発症の機序について詳細は明らかではない。また、超高齢社会において、多剤服用中の患者が歯科を受診する機会が増えているが、全身疾患の治療薬が歯周組織炎症により惹起される血管反応性の低下に与える影響の多くは不明である。

高齢者の罹患率が高い心血管系疾患の多くは酸化ストレスが原因で発症し、研究代表者らもこれを明らかにしてきた (H Kinoshita et al, Hypertension, 2008)。さらに、歯周組織の炎症は全身的に酸化ストレスを増大させる結果、体血管反応性が悪化することも報告した (Y Yamamoto, H Kinoshita, et al, Int J Cardiol, 2016)。しかし、この歯周炎惹起全身血管機能の障害が生じる機序の詳細は明らかではない。

一方、慢性炎症が誘発する全身性の炎症について、糖尿病モデルマウスに鉄キレート剤デフェロキサミンを投与すると、酸化ストレス、マクロファージ浸潤、炎症性サイトカインの抑制により、肥満・糖尿病の病態が改善につながることを報告された (Tajima S et al, J Physiol Endocrinol, 2012)。生体内での酸化ストレス制御や炎症に関わる鉄イオンの重要性が認識されており、過剰に遊離された鉄イオンはフリーラジカルを産生し炎症や臓器障害を引き起こすことが知られている (図1)。研究代表者らは、鉄貯蔵タンパク、フェリチンからの鉄イオン遊離に NADPH cytochrome P450 reductase が還元物質として作用することを明らかにした (K Takaishi et al, J Med Invest, 2019)。しかし、歯周炎惹起全身炎症性変化と血管反応性低下に対する鉄代謝の影響は不明である。

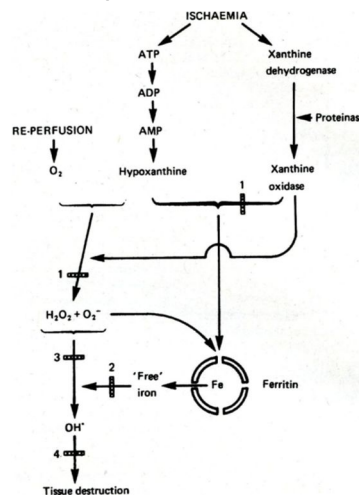


図1 Biochem. J (1986) 239,169-73より引用
心筋虚血時に、フェリチンから遊離した鉄イオンによりヒドロキシラジカルが産生され組織障害が生じる

2. 研究の目的

歯周炎によって惹起される全身性炎症反応と血管反応性低下に対して、鉄代謝の影響について検討することを目的とする。また、歯周病と関連のある全身疾患の治療薬が、全身性炎症反応と血管反応性低下に対して保護的に働くか否かを検討することを目的とする。

具体的には、モデル動物を使用した実験系において、全身性炎症反応が血管反応性低下を導くことを確認し、過剰な鉄イオン遊離やフェロトーシスに対する保護的効果を示す薬剤が、全身性炎症反応による血管反応性低下に及ぼす影響を検討することを目的とする。次に、培養ヒト冠動脈血管内皮細胞を用いた実験系で、歯周病原菌由来の炎症反応が細胞増殖と細胞内鉄イオン濃度に与える影響を検討する。さらに、ヒト冠動脈血管内皮細胞において、歯周病原菌由来炎症反応が RNA 発現に与える影響を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ラットの血管収縮反応測定法：生後 10 週の軽度歯周炎モデルラット [8 週齢から 1 週間に 1 度の間隔で、両側下顎第 1 大臼歯頰側および腹腔内に、大腸菌由来のリポポリサッカライド (Lipopolysaccharide: LPS; 1 回につき両側下顎に計 1500 μg, 腹腔内に 150 μg) を投与し作成] および対象群 (8 週齢から 1 週間に 1 度の間隔で、生理食塩水を両側下顎第 1 大臼歯頰側および腹腔内に投与) のラットに 3% イソフルランを吸入させた。十分な麻酔深度を得た後に大動脈を摘出し大動脈血管リングを作成した。血管リングを Krebs-Ringer 液 (37 °C, pH 7.4) の入ったチャンバー内にセットし、等尺性トランスデューサーに接続した。チャンバー内にセットされた大動脈血管リングにフェニレフリン (1 nM-10 μM) を作用させ、得られる血管収縮反応を記録した。

ラパマイシンがラット血管収縮反応に与える影響の検討：同様の実験系において、ラット大動脈血管リングをセットしたチャンバー内にラパマイシン (10 ng/ml) を作用させ、フェニレフリンによる血管収縮が反応を記録した。

(2) 歯周病原菌由来の炎症反応がヒト冠動脈血管内皮細胞に与える影響の検討：ヒト冠動脈血管内皮細胞 (Lifeline Cell Technology 社より購入) を培養し、P.gingivalis 由来 LPS (1, 10, 50 μg/ml) を培養液中に添加し、24, 48, 72 時間後の WST-8 試薬を使用し細胞増殖を比較した。同様の系に、プラバスタチン (1, 10, 100 μg/ml)、またはリドカイン (2, 20, 200 μg/ml) を添加し、細胞増殖に与える影響を比較検討した。

(3) ヒト冠動脈血管内皮細胞における歯周病原菌由来の炎症反応が細胞内鉄イオン濃度に与

える影響：ヒト冠動脈血管内皮細胞を *P.gingivalis* 由来 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) を含む培養液中で 48 時間培養し、細胞内鉄イオン濃度の増加を、鉄イオン検出蛍光試薬を用いて観察した。同様の系に、プラバスタチン(10 $\mu\text{g/ml}$)、またはリドカイン(20 $\mu\text{g/ml}$)を添加し、細胞内鉄イオン濃度の増加を比較検討した。

(4) 歯周病原菌由来の炎症反応がヒト冠動脈血管内皮細胞の RNA 発現に与える影響に関する解析：ヒト冠動脈血管内皮細胞を培養し、培養液中に 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS を添加し、4 時間または 12 時間刺激した細胞から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行った。同様の系で 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS および 10 $\mu\text{g/ml}$ プラバスタチンを添加し、4 時間または 12 時間刺激した細胞から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行った。LPS 群と比較して LPS + プラバスタチン群で遺伝子発現に差のみられた遺伝子を選択しリアルタイム PCR を行った。

4. 研究成果

(1) ラットの血管収縮反応測定法とラパマイシンがラット血管収縮反応に与える影響の検討：軽度歯周炎モデルラットでは、コントロールのラットと比較し、フェニレフリン(1 nM - 10 μM) による血管収縮反応が低下した。ラパマイシン(10 ng/ml)はコントロールラットのフェニレフリンによる血管収縮反応を軽度増加させる傾向を示した。

(2) 歯周病原菌由来の炎症反応がヒト冠動脈血管内皮細胞に与える影響の検討：ヒト冠動脈血管内皮細胞において、*P.gingivalis* 由来 LPS (1, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$) は、24, 48, 72 時間の細胞増殖に影響を与えなかった。同様に、プラバスタチン(1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$)、およびリドカイン(2, 20, 200 $\mu\text{g/ml}$)は、*P.gingivalis* 由来 LPS で刺激したヒト冠動脈血管内皮細胞において、24, 48, 72 時間の増殖に影響を与えなかった。

(3) ヒト冠動脈血管内皮細胞における歯周病原菌由来の炎症反応が細胞内鉄イオン濃度に与える影響：*P.gingivalis* 由来 LPS(10 $\mu\text{g/ml}$)で 48 時間刺激したヒト冠動脈血管内皮細胞では、LPS で刺激していないコントロールの細胞と比較して細胞内鉄イオン濃度は増加した。また、同様の系で、プラバスタチン(10 $\mu\text{g/ml}$)、およびリドカイン(20 $\mu\text{g/ml}$)は、LPS による細胞内鉄イオン濃度の増加を抑制する傾向を示した。

(4) 歯周病原菌由来の炎症反応がヒト冠動脈血管内皮細胞の RNA 発現に与える影響に関する解析：10 $\mu\text{g/ml}$ LPS で 4 時間刺激したヒト冠動脈血管内皮細胞では、炎症性反応に関連する複数の遺伝子発現が変化した。そのうち、LPS 群と比較し LPS + プラバスタチン群で発現が有意に上昇あるいは低下した遺伝子群から、TNF signaling pathway に関連する遺伝子リストを作成した。さらに、そのなかから BIRC3, CSF1, TRAF1, TRAF3 を選択し、リアルタイム PCR を行った。LPS 群と比較し最も大きな変化を認めた遺伝子は BIRC3 であった。プラバスタチンは、LPS 刺激による BIRC3 発現上昇を低下させる傾向を示した。一方、12 時間の LPS 刺激では遺伝子発現にほとんど変化がみられなかった。

以上から、ヒト冠動脈血管内皮細胞において、細胞の生死に影響を与えない程度の *P.gingivalis* 由来 LPS 刺激によって細胞内鉄イオン濃度の上昇に関連する炎症反応が惹起されたことから、軽度歯周炎モデルラットにおける血管反応性低下のメカニズムの一つとして、鉄代謝が影響する可能性が示唆された。プラバスタチンとリドカインは、LPS 刺激による細胞内鉄イオン濃度の上昇を抑制する可能性があった。さらに、プラバスタチンによる歯周炎惹起全身性炎症反応が血管反応性低下を引き起こすメカニズムとして、LPS 刺激による BIRC3 発現上昇の低下が関与することが示唆され、今後さらなる検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nishikawa M, Takaishi K, Takata M, Sasajima O, Fujiwara JL S, Eguchi S, Kawahito S	4. 巻 70
2. 論文標題 Pronounced QTc Prolongation During General Anesthesia in a Child with Left Ventricular Non-Compaction Cardiomyopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 137-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2344/anpr-70-02-12.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takaishi K, Takata M, Aoki R, Fujiwara S, Kawahito S, Kitahata H	4. 巻 15
2. 論文標題 Total Intravenous Anesthesia Using Remimazolam and Continuous Cardiac Output Monitoring for Dental Anesthesia in a Patient with Takayasu's Arteritis: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 A A Pract	6. 最初と最後の頁 e01599-e01599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1213/XAA.0000000000001599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takaishi K, Kinoshita H, Kawashima S, Kawahito S	4. 巻 10
2. 論文標題 Human Vascular Smooth Muscle Function and Oxidative Stress Induced by NADPH Oxidase with the Clinical Implications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1947-1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10081947.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takaishi K, Kudo Y, Kawahito S, Kitahata H	4. 巻 35
2. 論文標題 Clinically relevant concentration of propofol and benzodiazepines did not affect in vitro angiogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 870-878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-021-02993-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaishi K, Otsuka R, Fujiwara JL S, Eguchi S, Kawahito S, Kitahata H	4. 巻 68
2. 論文標題 A retrospective case series of anesthetic patients with epiglottic cysts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anesthesia Progress	6. 最初と最後の頁 168-177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2344/anpr-68-01-01.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takaishi K, Kawahito S, Kitahata H	4. 巻 68
2. 論文標題 Management of a Patient With Tracheal Stenosis After Previous Tracheotomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anesth Prog	6. 最初と最後の頁 224-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2344/anpr-68-03-08.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takaishi K, Kinoshita H, Feng GG, Azma T, Kawahito S, Kitahata H	4. 巻 144
2. 論文標題 Cytoskeleton-disrupting agent cytochalasin B reduces oxidative stress caused by high glucose in the human arterial smooth muscle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 197-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawahito S, Soga T, Yagi S, Mita N, Takaishi K, Kinoshita H, Kitagawa T, Kitahata H	4. 巻 67
2. 論文標題 Pathophysiology and complications during extracorporeal circulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Invest	6. 最初と最後の頁 229-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.67.229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kudoh K, Takaishi K, Kudoh T, Takamaru N, Kamada K, Miyamoto Y	4. 巻 32
2. 論文標題 Inferior alveolar nerve paresthesia caused by the extrusion of calcium hydroxide-based paste into the mandibular canal.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg Med Pathol	6. 最初と最後の頁 366-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高石和美	4. 発行年 2024年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 295
3. 書名 有病者歯科学 第3版 第2章 患者の診察 4 全身徴候 14) 貧血	

〔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
研究分担者	北畑 洋 (KITAHATA Hiroshi) (60161486)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学域)・教授 (16101)	
研究分担者	木下 浩之 (KINOSHITA Hiroyuki) (70291490)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医学域)・徳島大学専門 研究員 (16101)	
研究分担者	川人 伸次 (KAWAHITO Shinji) (60284296)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	工藤 保誠 (KUDO Yasusei) (50314753)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授 (16101)	

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