

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592627

研究課題名（和文）：歯周病による動脈硬化促進メカニズムの解明  
—炎症性歯槽骨吸収が及ぼす影響—研究課題名（英文）：Analysis an accelerative mechanism of atherosclerosis by  
periodontitis -effect of inflammatory alveolar bone resorption-

研究代表者

鵜飼 孝 (UKAI TAKASHI)

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：20295091

研究成果の概要（和文）：

歯周病患とアテローム性の動脈硬化の関連メカニズムを明らかにするために、炎症性骨吸収が動脈硬化に与える影響を検討した。その結果、動脈硬化を起こしやすいマウスに歯槽骨吸収を惹起すると動脈硬化が促進した。動脈硬化組織には破骨細胞形成に必須の破骨細胞分化因子（RANKL）の存在が免疫組織学的に明らかとなった。また動脈硬化の主体をなす泡沫化細胞の形成を *in vitro* で RANKL が促進することが確認できた。

研究成果の概要（英文）：

We studied an effect of inflammatory bone loss in atherosclerosis to clarify the mechanism of relationship between periodontal diseases and atherosclerosis. As the results, we revealed atherosclerosis accelerated when mice were induced inflammatory bone loss. In the tissues of atherosclerosis, RANKL positive cells were observed by immunohistochemistry. Furthermore, foam cell formation was accelerated by RANKL stimulation *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・歯周治療系歯学

キーワード：骨吸収、歯周病、アテローム性動脈硬化、破骨細胞、RANKL、泡沫化細胞

## 1. 研究開始当初の背景

多くの研究結果が歯周病とアテローム性の動脈硬化病変の進行に関連があることを示している。ヒト頸動脈アテローム性プラークより歯周病原性細菌が検出されたり

(Kozarov EV 2005)、マウス動脈硬化モデルにおいて歯周病原性細菌である *Porphyromonas ginivalis* 感染が動脈硬化を促進すること (Gibson FC 2003) などから、歯周病による動脈硬化の促進には主に歯周

病原性細菌の感染が重要であると考えられてきている。研究代表者も動脈硬化促進マウスを用いて *P. gingivalis* の口腔感染が動脈硬化を促進することを確認している (Gibson FC, Ukai T et al. 2008)。しかし、このモデルにおいて動脈硬化促進時には歯槽骨の吸収が起こることも確認している。また、歯槽骨吸収の程度と動脈硬化病変の進行の相関を調べた研究では、歯槽骨吸収が進行している患者では、そうでない患者と比較して血中の脂質の増加や (Rufail ML 2007)、アテローム性動脈硬化の進行が認められると報告されており (Engebretson SP 2005)、歯槽骨吸収と動脈硬化の関連が推測されるが、そのメカニズムは明らかになっていない。

歯周病の進行している患者の歯周組織では骨吸収に中心的役割を果たす RANKL の産生が多く (Crotti T 2003)、その産生細胞の主体は T 細胞であるといわれている (Vernal R 2006, Kawai T)。研究代表者は 10 年以上前より炎症性骨吸収における T 細胞ならびに RANKL の重要性を示してきている (Ukai T et al 1996, Hara H, Ukai T et al 1998, Moriyama H, Ukai T et al 2002, Kozuka Y, Ozaki Y, Ukai T et al 2006, Yamaguchi M, Ukai T et al 2008)。最近、動脈硬化患者においてアテローム病変局所においても RANKL の存在が確認された (Sandberg WJ 2006)。また、RANKL の decoy receptor である OPG は実験的動脈硬化を抑制することも示されている (Bennett BJ 2006)。また非感染性の慢性的炎症性骨破壊疾患で、歯周病と同様に RANKL や T 細胞が重要な働きをするといわれている関節リウマチ患者でも動脈硬化が進行されることが報告されている (Dhawan SS 2008)。これらより、歯周病による RANKL の上昇は骨代謝ばかりでなく動脈硬化促進にも関与している可能性が考え

られる。

血中の LDL 濃度が上昇して血管内膜などに沈着し、そこで酸化された LDL (oxLDL) はマクロファージなどが発現している SR-A や CD36 といったスカベンジャーレセプターを介して取り込まれる。血中の脂質濃度が上昇した状態では血管内膜に oxLDL が沈着して oxLDL を多く取り込んだマクロファージが蓄積し、アテローム性の動脈硬化が起こると考えられている。そのため病変の進行にはマクロファージにおける oxLDL の取り込みの促進が重要であると考えられる。研究代表者は現在マクロファージによる oxLDL の取り込みに与える RANKL の影響を検討している (政策課題対応経費、H20 年度)。今までのところ、oxLDL を過剰に取り込むことで形成される泡沫細胞形成は RANKL 刺激によって若干の増加傾向を示すものの、直接的な影響は明確にできていない。多くの免疫反応において細胞接触の重要性が示されていることより、今後は RANKL 存在下でその産生細胞である T 細胞とマクロファージが共存する状態での泡沫細胞形成への影響を見ていく必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

今回、「歯周病による歯槽骨吸収はアテローム性動脈硬化を促進する。これには歯周病により歯周組織で刺激を受けた RANKL 産生 T 細胞が、アテローム病変局所でマクロファージに作用して oxLDL の取り込みを増加させることが関与している」という仮説を立てた。

本研究の目的は上記仮説を証明することである。*in vivo*において ApoE KO マウスに、我々がこれまで確立してきた炎症性骨吸収モデルを応用して、歯槽骨の吸収を惹起させ、歯槽骨吸収が動脈におけるアテローム性プラークの形成に及ぼす影響を検討する。組織

学的に動脈硬化病変組織におけるマクロファージやT細胞の存在、RANKLなどのサイトカインの発現を検討する。さらに歯周組織に存在するT細胞が全身に移行するかどうかを確認する。また *In vitro* でマクロファージによる泡沫細胞形成へのT細胞ならびにRANKLの影響を検討する。以上により上記仮説を証明する予定である。

### 3. 研究の方法

炎症性骨吸収メカニズムの解明と炎症性骨吸収と動脈硬化との関連に分けて研究を行った。

#### (1) 炎症性骨吸収の解明

- ① マウス組織に *E. coli* LPS 注入と一緒に IFNg あるいは CD40L を注入した場合に見られる骨吸収を組織学的に検討した。
- ② マウス組織にペプチドグリカン単独あるいは *E. coli* LPS と同時に注入した場合の骨吸収を組織学的に検討した。
- ③ *In vitro* で骨髄マクロファージに RANKL を添加して破骨細胞形成させる系において LPS と一緒に IFNg, CD40L あるいはペプチドグリカンを添加して破骨細胞形成への影響を検討した。

#### (2) 炎症性骨吸収と動脈硬化の関連

- ① ApoE KO マウス歯周組織に *E. coli* LPS を注入し骨吸収を惹起した場合のアテローム性動脈硬化の形成状態を組織学的に検討した。
- ② 上記アテローム組織における RANKL の存在を免疫組織学的に検討した。
- ③ ApoE KO マウス歯周組織に *E. coli* LPS を注入し骨吸収を惹起した場合の脾細胞がマクロファージからの泡沫化細胞形成に与える影響を検討した。
- ④ マクロファージからの泡沫化細胞形成

に IFNg ならびに RANKL が与える影響を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 炎症性骨吸収の解明

- ① IFNg ならびに CD40L は *in vivo* で LPS 誘導性の骨吸収を促進した。
- ② ペプチドグリカンは単独で骨吸収を惹起するばかりでなく、*in vivo* で LPS 誘導性の骨吸収を促進した。
- ③ *In vitro* において IFNg, CD40L ならびにペプチドグリカンは RANKL と LPS による破骨細胞形成を促進した。

#### (2) 炎症性骨吸収と動脈硬化の関連

- ① Apo KO マウスに LPS 注入して骨吸収を誘導することで誘導していないマウスと比較して大動脈弁周囲のアテローム形成が組織学的に確認された。
- ② 上記の促進されたアテローム組織では免疫組織学的に RANKL の存在が確認できた。
- ③ 上記のように骨吸収を誘導したマウスの脾細胞とマクロファージを共培養した場合、誘導していないマウス脾細胞と共培養した場合と比較してマクロファージにおける oxLDL の取り込みが促進された。
- ④ マウスマクロファージからの泡沫化細胞形成を IFNg は抑制したが、RANKL が存在するとその抑制はみられなくなった。

これらの結果より炎症性骨吸収がアテローム性動脈硬化を促進することが強く示唆された。

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6件)

1)

Peptidoglycan and lipopolysaccharide synergistically enhance bone resorption and osteoclastogenesis. Kishimoto T, Kaneko T, Ukai T, Yokoyama M, Ayon Haro R, Yoshinaga Y, Yoshimura A, Hara Y. J Periodontal Res. 2012 Jan 29 doi:10.1111/j.1600-0765.2011. 01452.x. [Epub ahead of print]

2)

Membrane-bound CD40 Ligand on T cells from mice injected with lipopolysaccharide (LPS) accelerates LPS-induced osteoclastogenesis, M Yokoyama, T Ukai, E.R. Ayon Haro, T Kishimoto, Y Yoshinaga, Y Hara, Journal of Periodontal Research, 46, 464-474, 2011 (corresponding author)

3)

Locally administered interferon- $\gamma$  accelerates lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis independent of immunohistological RANKL upregulation E.R. Ayon Haro, T Ukai, M Yokoyama, T Kishimoto, Y Yoshinaga, Y Hara. Journal of Periodontal Research, 46, 361-373, 2011 (corresponding author)

[学会発表] (計14件)

1)

岸本隆明、金子高士、鶴飼 孝、横山美穂、吉永泰周、佐藤佳昌、長野史子、山下泰徳、吉村篤利、原 宜興。骨吸収に対するペプチドグリカンとリポ多糖の協調作用に関する研究、日本歯科保存学会、プログラムおよび講

演抄録集、2011年度秋季学術大会 (第135回) ,p192 (大阪国際交流センター) 10月20、21日、2011

2)

岸本隆明、金子高士、鶴飼 孝、横山美穂、長野史子、佐藤佳昌、吉永泰周、吉村篤利、原 宜興。ペプチドグリカンはリポ多糖と協調して歯槽骨吸収と破骨細胞形成を促進する、第54回春季日本歯周病学会学術大会 (福岡) 平成23年5月27日、日歯周誌、53, 107, 2011

3)

E.R. Ayon Haro, T. Ukai, M. Yokoyama, T. Kishimoto, Y. Yoshinaga, Y. Hara. Locally administered interferon-gamma accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis in the presence of lipopolysaccharide. The 96<sup>th</sup> annual meeting of the American Academy of Periodontology, Honolulu, Hawaii October30-November 2, 2010

4)

横山美穂、鶴飼 孝、Ayon Haro Esperanza Raquel、岸本隆明、藏本明子、白石千秋、吉永美穂、原 宜興。LPS存在下でCD40Lはin vivoにおける破骨細胞形成を促進する。第53回秋季日本歯周病学会学術大会 (高松) 平成22年9月19日日本歯周病学会会誌、第53巻、秋季特別号、2010

5)

鶴飼 孝、岸本隆明、横山美穂、原 宜興。LPS注入マウス脾細胞によるfoam cell形成の促進 第53回秋季日本歯周病学会学術大会 (高松) 平成22年9月19日日本歯周病学会会誌、第53巻、秋季特別号、83, 2010

6)

Yokoyama M, Ukai T, Kishimoto T, Ayon Haro ER, Kuramoto A, Yoshinaga Y, Takamori Y, Hara Y. CD40L accelerates

osteoclastogenesis induced by RANKL and LPS. 88<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the IADR, July 14-17, Barcelona, Spain, 2010. Program Book p239, 2010

なし

7)

鵜飼 孝. 歯周組織の免疫応答から考える全身への影響. 歯周病と動脈硬化—歯槽骨吸収とアテローム性動脈硬化の関連—. 第52回日本歯周病学会、秋季学術大会（宮崎観光ホテル）平成21年10月11日. 日本歯周病学会会誌、第51巻、秋季特別号、69、2009

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鵜飼 孝 (UKAI TAKASHI)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：20295091

### (2) 研究分担者

原 宜興 (HARA YOSHITAKA)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：60159100

### (3) 連携研究者