

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792066
 研究課題名(和文) *P. gingivalis*感染による血管内皮肥厚におけるメカニズムの解析
 研究課題名(英文) Analysis of mechanism of endothelial hyperplasia caused by *P. gingivalis* infection
 研究代表者
 根本 浩利 (NEMOTO HIROTOSHI)
 大阪大学・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：80527226

研究成果の概要（和文）：大動脈瘤に罹患した患者において、手術の際に摘出された検体を PCR 法で分析すると、その約 10% において歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* の細菌 DNA が検出された。また、免疫組織学的分析からは、口腔内に *P. gingivalis* を保有している対象者の検体では、有意に高い S100A9 分子の発現が生じているとともに、著明な増殖型の平滑筋の存在を認めることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Analysis of human aortic aneurysm specimens by PCR showed that the detection frequency of *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontopathic bacterial species, was approximately 10%. Furthermore, histochemical analysis revealed that the intensity of S100A9 expression was significantly higher in patients harboring oral *P. gingivalis* than in those who did not. In addition, the proliferative type of smooth muscle cells was prominently identified in patients harboring oral *P. gingivalis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：口腔細菌，歯周病，*P. gingivalis*，血管内皮，肥厚，S100 ファミリータンパク，平滑筋

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病と全身疾患との関連が取りざたされている。とりわけ、歯周病と循環器疾患との関連が検討されてきているが、その詳細は明らかではない。

これまでに、開胸手術によって摘出され

た少数の大動脈瘤検体から細菌 DNA を抽出し、分子生物学的手法を用いて解析したところ、約 1 割の検体において *Porphyromonas gingivalis* が検出された。そこで、動物モデルにおける検討を行ったところ、血管内皮を損傷した後に、*P. gingivalis* を頸静

脈より感染させることによって、血管内皮に著明な病変の形成を認めた。さらに、その病変部からサンプルを抽出し、遺伝子チップを用いた網羅的な解析を行ったところ、細胞の増殖や分化の制御を行うカルシウム結合タンパクである S100 ファミリータンパク関連の遺伝子の病変形成への関与が示唆された。また、培養細胞を用いた検討では、*P. gingivalis* と血漿成分の混合物を用いて、収縮型の平滑筋細胞を増殖型に形質転換させることができた。これらの結果から、*P. gingivalis* が関与すると考えられる「コレステロール非依存性の血管内皮肥厚のメカニズムに対する仮説」が構築できた。

2. 研究の目的

(1) 大動脈瘤検体中およびデンタルプラーク中の *P. gingivalis* 細菌 DNA 存在の検討

大動脈瘤検体中の *P. gingivalis* 陽性検体の頻度を考えていく上で、これまでに分析を行った検体総数では、不十分であると考えた。そこで、さらに多くの検体の提供を受け、*P. gingivalis* の細菌 DNA の存在の有無を検討する。また、同患者のうちデンタルプラークを提供いただける対象者を募り、大動脈瘤摘出術を受ける患者のデンタルプラーク中に存在する *P. gingivalis* の頻度の検討も行う。さらに、*P. gingivalis* 陽性検体に対しては、線毛遺伝子 (*fimA*) 型を決定する。

(2) 「*P. gingivalis* 感染によって生じるコレステロール非依存性の血管肥厚のメカニズム」に対する仮説の検証

これまでの様々な研究結果から、*P. gingivalis* と血漿成分の混合物が、損傷した血管内皮に接触し、S100A9 レベルを上昇させることで、収縮型平滑筋を増殖型に形質転換させ、血管内皮の肥厚を生じさせるという仮説を組み立てた。本研究では、実際のヒト検体における S100A9 分子の発現レベルと増殖型平滑筋の存在に関して検証する。

(3) *P. gingivalis* 感染によって生じる平

滑筋肥厚抑制法の追究

これまでに示された *P. gingivalis* 感染による血管内皮肥厚に対して、抑制的に働く化学物質を、培養細胞系を用いて網羅的に解析する。

3. 研究の方法

(1) ヒト検体における *P. gingivalis* DNA の存在の検討

大動脈瘤検体から細菌 DNA を抽出し、*P. gingivalis* 特異プライマーを用いた PCR 法にて検討した。また、*P. gingivalis* 陽性検体に対しては、*fimA* 型特異プライマーを用いた PCR 法にて *fimA* 型を決定した。デンタルプラークからも同様の作業を行った。

(2) ヒト検体における S100A9 分子の発現と平滑筋増殖との関連の分析

デンタルプラーク中の *P. gingivalis* の存在の有無から、*P. gingivalis* 陽性対象と陰性対象に分類し、それぞれの検体における S100A9 分子の発現を免疫組織学的手法を用いて検討した。また、増殖型平滑筋に対する特異抗体を用いて *P. gingivalis* 陽性検体と陰性検体における差異を検討した。

(3) *P. gingivalis* 感染によって生じる平滑筋肥厚抑制法の追究

既に確立している *P. gingivalis* と血漿成分の混合物を用いた平滑筋細胞を増殖させる系を用いて、保有している多くの化合物の中で、平滑筋細胞の増殖を抑制するものがないかを検討した。

4. 研究成果

(1) 大動脈瘤検体中の *P. gingivalis* の細菌 DNA 存在の検討

P. gingivalis 陽性検体は、76 検体中 8 検体 (10.5%) であった。また、陽性検体からは、歯周病原性の高いと考えられている *fimA* 遺伝子型のみが検出された。一方、デンタルプラーク検体では、*P. gingivalis* 陽性検体と陰性検体の割合がおよそ半分ずつであった。

(2) 「*P. gingivalis* 感染によって生じるコレステロール非依存性の血管肥厚のメカニズム」に対する仮説の検証

デンタルプラーク中の *P. gingivalis* 細菌 DNA の存在に基づいて, *P. gingivalis* 陽性者(17人)と陰性者(14人)に分類した. その後, この31人から採取した大動脈瘤31検体を免疫組織学的に分析した. すると, *P. gingivalis* 陽性者の検体の S100A9 分子の発現は, 陰性者の検体よりも有意に強いことが明らかになった. また, 陽性者の検体では, 増殖型の平滑菌が著明であったが, 陰性者の検体ではその度合いは有意に低いことが分かった.

(3) *P. gingivalis* 感染によって生じる平滑筋肥厚抑制法の追究

主にポリフェノール化合物に焦点をあてて検討したが, 平滑筋増殖を明確に抑制できる物質を特定することはできなかった. 対象を, 他の系統の化合物に広げて, さらに検討していきたいと考えている.

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6件)

- ① Nakano K, Wada K, Nomura R, Nemoto H, Inaba H, Kojima A, Naka S, Hokamura K, Mukai T, Hata H, Toda K, Nakajima A, Umemura K, Kamisaki Y, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Characterization of aortic aneurysm of cardiovascular diseases patients with *P. gingivalis* occurrence. *Oral Dis* 17, 371-378, 2011. (査読有)
- ② Naka S, Yamana A, Nakano K, Okawa R, Fujita K, Kojima A, Nemoto H, Nomura R, Matsumoto M, Ooshima T. Distribution of periodontopathic bacterial species in Japanese children with developmental disabilities. *BMC Oral Health* 9, 24, 2009. (査読有)

- ③ Lapidattanakul J, Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Kojima A, Senawongse P, Srisatjaluk R, Ooshima T. Detection of serotype k *Streptococcus mutans* in Thai subjects. *Oral Microbiol Immunol* 24, 431-433, 2009. (査読有)

- ④ Nomura R, Nakano K, Taniguchi N, Lapidattanakul J, Nemoto H, Grönroos L, Alaluusua S, Ooshima T. Molecular and clinical analyses of the gene encoding collagen-binding adhesin of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol* 58, 469-475, 2009. (査読有)

- ⑤ Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol* 24, 64-68, 2009. (査読有)

- ⑥ Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Mukai T, Hata H, Toda K, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Molecular analyses of bacterial DNA in extirpated heart valves from infective endocarditis patients. *Oral Microbiol Immunol* 24, 43-49, 2009. (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① Nemoto H, Nakano K, Masuda K, Nomura R, Ooshima T. Prevalence of amoxicillin-resistant Streptococci in dental plaque of young Japanese. 89th IADR meeting, 2011. 3. 16, San Diego, USA.
- ② 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆
小児デンタルプラーク中に存在するアモキシシリン耐性口腔細菌種の特定 平成22年度日本小児歯科学会秋季大会,

2010. 12. 2, 郡山.

③ Nemoto H, Nakano K, Nomura R, Wada K, Ooshima T. Detection of amoxicillin-resistant streptococcal species in dental plaque specimens. 88th IADR meeting, 2010. 7. 14, Barcelona, Spain.

④ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 松本道代, 大嶋 隆 小児プラーク中に存在するアモキシシリン耐性菌の分布に関する検討 第28回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2009. 10. 18, 大阪.

⑤ 根本浩利, 仲野和彦, 野村良太, 大嶋 隆 心臓血管系疾患患者の病変部およびデンタルプラーク検体における口腔細菌種の検出 第47回日本小児歯科学会大会, 2009. 5. 14, 吹田.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 浩利 (NEMOTO HIROTOSHI)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 80527226