

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593074

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症の発症診断

研究課題名(英文) The onset diagnosis of the arteriosclerosis by periodontitis through the 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周病誘発性血清アミロイドA(SAA)に着目し、歯周病から動脈硬化症の発症機序を解明することを目的とした。IL-6を歯周組織に注入した歯周炎モデルマウスを検討した結果、血中SAA、および大動脈の脂質沈着が有意に増加した。次に、血管内皮細胞へのSAAの影響を検討した結果、単球の接着因子および遊走因子のmRNAが有意に上昇し、SAA受容体のTLR2の発現も有意に上昇した。さらに、上記マウスの初期病変部位においても、TLR2の発現上昇を組織学的に確認した。以上より、歯周病誘導性SAAはTLR2を介して動脈硬化を増悪させ、歯周病程度により動脈硬化症の発症診断ができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the onset mechanism of atherosclerosis through periodontal disease induced serum amyloid A (SAA). Both of the serum SAA protein level and the aortic lipid deposition were increased significantly in the periodontitis model mouse which injected IL-6 into periodontal tissue. And the mRNA expressions of monocyte adhesion, migration factors and the SAA-receptor TLR2 were up-regulated significantly with SAA treatment for the endothelial cells. Furthermore, the expression of TLR2 was observed at the initial disease area of the aorta immunohistochemically in the mouse model. Therefore, these results suggest that periodontal disease induced SAA could deteriorate the atherosclerosis through TLR2, and a possibility that the onset diagnosis of arteriosclerosis could be performed according to the severity of the periodontal disease.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯周病 血清アミロイドA 動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

心臓血管疾患 (cardiovascular disease: CVD)は、心臓血管系に影響を与える多くの疾患の総称である。すなわち、CVD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とも言え、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による死亡の80%以上が、超高齢社会に突入した我が国において増加している65歳以上の人々である。上述の通り、CVDには様々な疾患が含まれるが、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、硬化する動脈硬化症に起因している。この病態は血栓症を引き起こし、さらには遠隔部位の梗塞原因となる。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、内膜の肥厚をきたして、血管内腔の狭窄や閉塞をきたす。

一方、歯周病は50代以上の半数以上が罹患しており、高齢者の歯周疾患患者が増加している。また、歯周組織のみならず、他のさまざまな疾患の原因になりうるものが、近年の研究で明らかになっている。特に、1990年代に始まった歯周病とCVDとの関連に関する疫学研究結果の蓄積は、1999年以後に6編のシステマティックレビューとして報告されている。これらの結果は、6報告ともに歯周病とCVDの関係を支持している。さらに歯周病は、バイオフィーム感染症として認識されており、生体側は、細菌感染に対して免疫担当細胞 (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-) や他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、細菌刺激が慢性的、かつ持続的に存在し続けると、炎症、免疫応答の遷延化が起こり、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。実際、歯周病に罹患しており、心冠動脈バイパス手術を受けた患者の血管壁から歯周病原細菌が検出されたことが報告されている。このように歯周病関連細菌が動脈硬化症の形成に関わる報告はあるが、歯周病関連細菌が、どのようなメカニズムで発症に関与するのか未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

歯周疾患に関しては、他臓器疾患 (心臓血管疾患、糖尿病、骨粗鬆症、肺炎など) との多面的・双方向的関係を検討した疫学研究結果より、歯周病が他の疾病リスクを増すという疾病相関に基づく新たな治療法の創生が望まれている。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* (P.g) 菌を感染させると、肝臓において急性炎症マーカーである血清アミロイドA (SAA) のmRNA発現が上昇することをマイクロアレイにて検出した。次に、通常マウスの歯周組織に炎症性サイトカインであるIL-6を注入した場合、肝臓でのSAA mRNA発現上昇、血中SAAタンパクの増加を確認した (尾藤, 2006)。さらに、ApoE^(-/-)マウスの腹腔内にIL-6を注入すると、肝臓でのSAAのmRNA発現、血中SAAの産生上昇に伴い、動脈硬化病変が悪化することを明らかにした。これら一連の研究結果より、歯周組織で産生されたIL-6が血中に移行して肝臓 (肝細胞) を刺激し、SAAの産生上昇をきたし、動脈硬化症悪化動物モデルを確立した。しかし、SAAが、動脈硬化病変の発症に関与しているのか、既存の動脈硬化病変の悪化に関与しているのかは未だ不明のままである。今後、新たな治療法の創生のために、歯周病からSAAを介した動脈硬化症の発症機序をさらに詳細に解明し、SAAの診断マーカーとしての役割、治療薬創生の可能性を検討する必要があると考え、研究を開始した。

3. 研究の方法

動脈硬化易形成マウスであるApoEノックアウトマウスの歯周組織にIL-6を注入する動脈硬化発症歯周炎モデルを作成し、control群 (PBS注入ApoEノックアウトマウス) と動脈硬化病変の広がりをen-face、および大動脈部の凍結切片を用いたoil-red染色において比較した。

次に血清アミロイドA (SAA) による血管内皮細胞への影響を調べるために、ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) に対してSAAを添加することによる、動脈硬化初期病変にて血管内

皮細胞に発現する単球(将来, 泡沫細胞となる)の接着因子および遊走因子増強に関わる遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて発現を比較、検討した。また、SAAの受容体であり、動脈硬化症に対して影響を及ぼすとされている受容体(TLR2、TLR4、CD36、FPR2、AGER)遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて発現を比較、検討した。

さらに上記モデルマウスにおいて経時的に病変組織部位を摘出し、動脈硬化初期病変部に発現するHAEC実験にて発現上昇の見られたSAA受容体を免疫組織染色にて検出した。

4. 研究成果

歯周病原細菌により産生亢進が著明なIL-6を口腔内より投与する動脈硬化発症歯周炎モデルの実験系において、IL-6投与群において、大動脈弓における脂質沈着が有意に亢進した。次にHAECに対するSAAを添加による、動脈硬化に関連する接着因子および遊走因子の発現を比較、検討した。その結果、接着因子であるVCAM-1、ICAM-1や、単球走化因子であるMCP-1が有意に上昇した。また、SAA添加により発現上昇するSAAの受容体を解析したところ、SAA刺激によりTLR2の発現が有意に上昇した。さらにHAECの実験で発現上昇を示したTLR2の発現を上記モデルマウスにおいて確認したところ、初期動脈病変部位においてTLR2の発現上昇を確認した。

以上のことにより、歯周病誘導性のSAAはTLR2を介して動脈硬化を増悪させる可能性が示唆された。今後、さらに本研究を進めることにより、歯周病による動脈硬化症発症機序の解明のみならず、動脈硬化病変とSAAやその受容体であるTLR2の発現程度の相関を解析することにより、SAAを診断マーカーとした動脈硬化症発症に対する新規治療法にも応用できると考えられる。

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5件)

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N.

Osteoprotegrin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: Comparison with RANKL-overexpressing transgenic mice. *Endocrinology* 154: 773-782 2013 (査読有) doi: 10.1210/en.

Taguchi A, Miki M, Muto A, Kubokawa K, Migita K, Higashi Y, Yoshinari N. Association between oral health and the risk of lacunar infarction in Japanese adults. *Gerontology* 59: 499-506 2013 (査読有) doi: 10.1159/000353707.

Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunol* 188: 1772-1781 2012 (査読有) doi: 10.4049/jimmunol.1101174.

Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Miner Res* 26: 2978-2990 2011 (査読有) doi: 10.1002/jbmr.490.

Idei N, Soga J, Hata T, Fujii Y, Fujimura N, Mikami S, Maruhashi T, Nishioka K, Hidaka T, Kihara Y, Chowdhury M, Noma K, Taguchi A, Chayama K, Sueda T, Higashi Y. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia: a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease. *Circ Cardiovasc Interv.* 4:15-25 2011 (査読有) doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.110.955724.

[学会発表](計7件)

The effect of SAA on atherosclerogenesis in ApoE deficient mice: Muto A,

Takahashi K, Kaise K, Kubokawa K, Miki M, Taguchi A, Yoshinari N 10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Nara, 2013.9.7

動脈硬化易形成性マウスにおける加齢の影響特定:海瀬聖仁, 武藤昭紀, 窪川恵太, 三木 学, 岩井由紀子, 石岡康明, 吉成伸夫 第 139 回日本歯科保存学会(秋田) 2013.10.17

The effect of serum amyloid A (SAA) accelerates atherosclerosis in mice Yoshinari N, MUTO A, Kubokawa K, Kaise K, Takahashi K, Miki M, Taguchi A The 51st Annual Scientific Meeting of the Korean Academy of Periodontology, Seoul, Korea 2012.11.21

Serum amyloid A を介した歯周病から動脈硬化症への経路 窪川恵太, 武藤昭紀, 海瀬聖仁, 三木 学, 高橋弘太郎, 坂本浩, 吉成伸夫 第 22 回日本歯科医学学会総会(大阪) 2012.11.10

培養ヒト血管内皮細胞に対する歯周病由来 Serum Amyloid A の効果 海瀬聖仁, 武藤昭紀, 高橋弘太郎, 窪川恵太, 高橋美穂, 西田英作, 河谷和彦, 吉成伸夫 第 22 回日本歯科医学学会総会(大阪) 2012.11.10

歯周病由来動脈硬化病変部における接着関連因子の発現 高橋弘太郎, 窪川恵太, 武藤昭紀, 海瀬聖仁, 山田真一郎, 上条博之, 中野敬介, 川上敏行, 吉成伸夫 第 22 回日本歯科医学学会総会(大阪) 2012.11.10

Circulating lineage-committed osteoclast precursors settle down into bone in mice. :Muto A, Mizoguchi T, Udagawa T, Josef M. Penninger, Takahashi N, Yoshinari N 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology, Los Angeles, USA, 2012.9.30

[図書](計2件)

武藤昭紀, 吉成伸夫 臨床歯周病学 第

2版, 吉江弘正, 伊藤公一, 村上伸也, 申基喆編, 第2編ベーシック編-基礎知識-第19章, 歯周病のリスクファクター 198-205, 2013. 1.20 医歯薬出版株式会社

武藤昭紀, 西田英作, 吉成伸夫 新・口腔の生理からどうして?を解く 森本俊文監修 第25章「どうして歯石のような硬いものができるのだろうか?」 104-107, 第27章「どうしてカリエスリスクに遺伝性は認められず歯周病リスクにはみとめられるのだろうか?」 112-115, 2012.4.1 デンタルダイヤモンド社

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

田口 明 (TAGUCHI AKIRA)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70243582

西田 英作 (NISHIDA EISAKU)
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 10512519

武藤 昭紀 (MUTO AKINORI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 50549433