

## 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25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890057

研究課題名（和文） 歯周病による大動脈瘤形成促進機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of aortic aneurysmal acceleration by periodontal disease

研究代表者

青山 典生 (AOYAMA NORIO)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30611024

研究成果の概要（和文）：本研究結果として、TLR-2ノックアウトマウスにおいて、*P. gingivalis* 感染後の大動脈瘤形成が抑制されることが示された。また、TLR-2ノックアウトマウスでは腹部大動脈におけるMMP-2およびMMP-9の産生が著しく減弱しており、これが大動脈瘤形成の抑制につながったと考えられた。以上のことからTLR-2による歯周病原細菌の認識が、全身の炎症を惹起することにより腹部大動脈におけるMMPの過剰発現を導き、最終的に腹部大動脈瘤に影響することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：From the results of this study, the development of aortic aneurysms after *P. gingivalis* infection was inhibited in TLR-2 deficient mice. MMP-2 and MMP-9 production in abdominal aorta extremely decreased in TLR-2 deficient mice, which was seemed to inhibit aneurysmal expansion. In conclusion, the recognition of periodontal bacteria by TLR-2 may induce systemic inflammation, overexpression of MMPs in aorta, and finally the development of abdominal aortic aneurysms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：自然科学、歯学、歯周病、細菌、循環器疾患

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は中・高齢者において特に罹患率の高い感染性疾患であり、歯周組織での慢性炎症を主な特徴とする。歯周病患者では局所の歯周病原細菌感染により全身的な炎症マーカーや、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)が上昇することが知られている。一方、腹部大動脈瘤は主に高齢者において発症し、破裂により致命的な結果を招く循環器疾

患である。その発症機序には様々な要因が考えられているが、その主要なメカニズムとして炎症の惹起が考えられている。ヒト腹部大動脈瘤病変においてMMPの上昇が認められ、また動物実験からも特定のMMPをノックアウトしたマウスでは実験的な大動脈瘤形成が生じないことから、MMPによる線維の破壊が大動脈瘤の促進に不可欠であると考えられている。

近年、世界的に歯周病と全身疾患とのかわりが指摘されるようになり、特に歯周病が循環器疾患のリスクとなることが報告されている。歯周病はしばしば菌血症の原因となり、大動脈の石灰化、血管内皮傷害やプラーク形成の誘因となることが示されている。しかし腹部大動脈瘤についてはその病変組織に歯周病原細菌が存在することが報告されている程度であり、その関連する機序についての詳細は不明である。

欧米諸国では2002年以降、歯周病と心血管病の関連が検討され始めている。一方、国内では健康日本21に謳われているように歯周病が心血管疾患に至る前段階であることは認知されてきたものの、歯周病と心血管病を関連づけた研究は始まったばかりである。このため、歯周病がどのようなメカニズムで循環器疾患の発症や進行に影響するのかについて検討することが急務となっている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、実験的モデルマウスを用い、歯周病原細菌が腹部大動脈瘤形成に与える影響とその機序を検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 概要

*P. gingivalis*により感染させる実験群と、感染させない対照群に対し実験的に腹部大動脈瘤を誘導し、大動脈瘤の形成状態を評価した。マウスは野生型マウスのほか、Toll様受容体 (TLR) -2ノックアウトマウス、TLR-4ノックアウトマウスを用い、それぞれのTLRが大動脈瘤形成の中で果たす役割を検討した。さらに大動脈瘤形成のメカニズムを検討するため、動脈組織において免疫組織学的にMMPの局在を調査した。

なお、本研究は東京医科歯科大学動物実験倫理審査委員会の承認を得たのちに行った。

### (2) *P. gingivalis*の培養とマウスの準備

*P. gingivalis* (菌株: A7A1-28) を嫌気培養し、実験に使用する濃度である $10^8$ CFU/mlに調整した。マウスは野生型マウス (C57BL/6) と、C57BL/6を背景とするTLR-2ノックアウトマウスおよびTLR-4ノックアウトマウスを使用した。

### (3) チャンバー埋入と死菌*P. gingivalis*の注入

8-10週令のマウスの背部皮下に、ステンレスワイヤーを用いて成型したチャンバー (直径5mm、長さ10mm) を埋め込み、創部の治癒を待った。以後、チャンバー内腔を細菌感染のスペースとして用いた。チャンバー内に加熱殺菌した*P. gingivalis*のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 懸濁液を注入した。この死菌注入

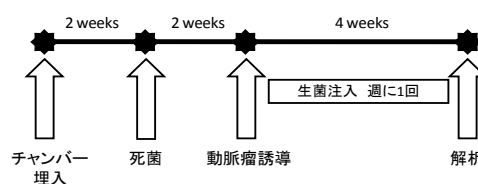
により、宿主であるマウスの免疫反応を賦活化した。

### (4) マウスへ腹部大動脈瘤の誘導

死菌*P. gingivalis*注入の2週後、実験的に腹部大動脈瘤を誘導した。マウスに全身麻酔をかけた後、開腹し、腹部大動脈の直径を計測した。なお、大動脈径の計測はコンピュータソフトを用いて行った。 $0.25\text{mol/l}$ の塩化カルシウム水溶液を塗布することにより実験的に大動脈瘤を形成した。同様にして生理食塩水を塗布したものを対照群として用いた。閉創し、麻酔からの回復を待つ間に、*P. gingivalis*生菌のPBS懸濁液 ( $10^8$ CFU/ml)  $0.1\text{ml}$ をチャンバー内に注入した。非感染群では同量のPBSのみを注入した。

### (5) 継続的な*P. gingivalis*感染

*P. gingivalis* 感染群では *P. gingivalis* の PBS 懸濁液 ( $10^8$ CFU/ml,  $0.1\text{ml}$ ) を週に1回の割合、すなわち開腹手術後7、14、21日目に注入した。非感染群では同じタイミングで同量のPBSのみ注入した。以下に、動物実験スケジュールの概要の模式図を添付する。



### (6) クラリスロマイシンの投与

抗菌薬の一種であるクラリスロマイシン (CAM) は、抗菌作用だけでなく、抗炎症作用やMMP抑制作用などの複数の作用を有していることが認められている。このことからCAM投与群を設定し、動脈瘤誘導後からCAM ( $100\text{mg/kg}$ ) を1日1回経口的に投与した。CAM投与は解析の前日まで連続的に行った。

### (7) サンプルの解析

開腹手術4週間後、再び開腹し、大動脈瘤誘導手術時と同様にして最大拡張部にて大動脈径を計測した。大動脈組織を病理切片とし、病理学的解析によりエラスチンにより構成される弾性板の破壊を観察した。免疫組織学的解析により、血管壁におけるMMP-2、MMP-9の局在を調べた。PCR法にて大動脈組織での*P. gingivalis*の存在を確認した。

またマウスの血漿サンプルより、ELISA法にてMMP-2、MMP-9とその選択的抑制物質であるTIMP-1、さらに炎症性サイトカインの濃度を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 本研究の結果

結果として、野生型マウスでは、*P. gingivalis*感染により大動脈瘤の形成促進が認められた。また、感染群では腹部大動脈におけるMMP-2の発現亢進が観察されたことから、MMP-2の過剰発現により動脈瘤の形成促進につながったと考えられた。

TLR-2ノックアウトマウスにおいて、*P. gingivalis*感染後の大動脈瘤形成が抑制されることが示された。病理学的解析から、TLR-2ノックアウトマウスでは野生型マウスと異なり、大動脈組織でのエラスチン層の破壊が認められなかった。また、TLR-2ノックアウトマウスでは腹部大動脈におけるMMP-2およびMMP-9の産生が著しく減弱しており、これが大動脈瘤形成の抑制につながったと考えられた。

一方、TLR-4ノックアウトマウスでは*P. gingivalis*感染後の大動脈瘤形成がわずかに抑制されたものの統計学的に有意差はなかった。なお、野生型マウス、TLR-2ノックアウトマウスおよびTLR-4ノックアウトマウスいずれにおいても、術後に大動脈組織から*P. gingivalis*は検出されなかった。

クラリスロマイシンによる影響に関し、術後の腹部大動脈拡張量は、CAM未投与群に比べ、CAM投与群で有意に抑制されていた。また、組織学的解析から、CAM未投与群では血管周囲の線維の破壊と平坦化を認めたが、CAM投与群では線維破壊が抑制されていることが観察された。血中のMMP-2濃度に関し、CAM投与群で有意に減少していることが認められたことから、CAMによる抗MMP効果が動脈瘤形成を抑制したと考えられた。

以上のことからTLR-2による歯周病原細菌の認識が、全身の炎症を惹起することにより腹部大動脈におけるMMPの過剰発現を導き、最終的に腹部大動脈瘤に影響することが示唆された。

## (2) 本研究結果から得られた成果

主要な歯周病原細菌である*P. gingivalis*の感染が、循環器疾患のひとつである大動脈瘤の形成を促進することが示された。歯周病と循環器疾患との関連が疫学的には多く認められてきたが、動物実験により因果関係が証明された報告は少なく、歯周病がMMPを介して循環器疾患に影響しうることを示したことは、本研究の成果と言える。

また、TLRによる認識やMMPの働きが重要であることが示唆された。このことから、それらを阻害することで歯周病による循環器疾患への影響を抑制できる可能性があることが明らかになった。歯周病治療や薬物による介入が循環器疾患の発症や進行を抑制できる可能性があると考えられ、本研究の結果が循環器疾患の新たな予防戦略の一助となるかもしれない。

## 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2件)

(1) Aoyama N, Suzuki J, Ogawa M, Watanabe R, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Sekinishi A, Izumi Y, Isobe M. Toll-like receptor-2 plays a fundamental role in periodontal bacteria-accelerated abdominal aortic aneurysms. *Circulation Journal*. 査読あり  
In press.

(2) Aoyama N, Suzuki J, Ogawa M, Watanabe R, Kobayashi N, Hanatani T, Yoshida A, Ashigaki N, Izumi Y, Isobe M. Clarithromycin suppresses the periodontal bacteria-accelerated abdominal aortic aneurysms in mice. *J Periodontal Res*. 査読あり  
47(4):463-469;2012  
DOI: 10.1111/j.1600-0765.2011.01454.x.

[学会発表] (計7件)

(1) Norio Aoyama  
*Porphyromonas gingivalis* promotes abdominal aortic aneurysm with increased systemic inflammation.  
2013 International Association for Dental Research (IADR) General Session  
2013年3月23日  
Seattle, USA

(2) Norio Aoyama  
Chronic infection of *Porphyromonas gingivalis* promotes the dilatation of abdominal aortic aneurysm.  
The 19<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese vascular biology and medicine organization.  
2011年12月9日  
東京

(3) 青山 典生  
Influence of periodontal pathogens on cardiovascular diseases (シンポジウム)  
第28回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会  
2011年12月2日  
東京

(4) Norio Aoyama  
A periodontal pathogen accelerates the progression of abdominal aortic aneurysm via toll-like receptor-2 signaling.  
American Heart Association Scientific Sessions 2011

2011年11月13日  
Orlando, USA

(5) 青山 典生

ドキシサイクリンによる歯周病原細菌感染  
を伴う腹部大動脈瘤拡張の抑制  
日本歯科保存学会 2011年度秋季学術大会  
2011年10月21日  
大阪

(6) Norio Aoyama

Toll-like receptor-2 plays a role in the  
periodontal bacteria-induced abdominal  
aortic aneurysms.

第75回日本循環器学会総会・学術集会  
2011年8月3日  
横浜  
(他1件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青山 典生 (AOYAMA NORIO)  
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：30611024