

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463168

研究課題名(和文) ヒト歯垢による動脈硬化誘発機序の実験的解明

研究課題名(英文) Experimental analysis of induction mechanism of atherosclerosis by human oral bacteria

研究代表者

長田 恵美 (Nagata, Emi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：00304816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト歯垢細菌による動脈硬化誘発機序を解明するために、ヒトの口腔から直接採取した口腔細菌の混合物でヒト動脈内皮細胞を刺激した時のヒト歯垢細菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能、ヒト動脈内皮細胞におけるヒト歯垢細菌を認識する受容体(パターン認識受容体)およびサイトカイン(IL-6、IL-8、MCP-1)の産生を検討した。

ヒト歯垢細菌は内皮細胞への侵入能力を持ち、菌が侵入した内皮細胞では菌を認識する受容体およびサイトカインの発現が増加した。以上より、ヒト歯垢細菌はヒト動脈内皮細胞に侵入して炎症反応を誘導することで動脈硬化発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We focused on oral bacteria as one of the candidates of risk factors for atherosclerosis. The capability of invasion of human aortic endothelial cells (HAEC) by oral bacteria derived from human and the subsequent expression of pattern-recognition receptors and production of cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1) by viable invaded HAEC were examined to understand the induction mechanism of atherosclerosis by oral bacteria.

Oral bacteria derived from human were capable of invading HAEC. The expression of pattern-recognition receptors and cytokines in HAEC invaded by oral bacteria increased markedly compared with those in non-invaded HAEC. These results suggested that inflammatory reactions in HAEC induced by invasive oral bacteria might be causative to induce atherosclerosis in human.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔細菌 動脈硬化 パターン認識受容体 サイトカイン 内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト歯垢は約 700 種の菌種から構成されるバイオフィームである。口腔バイオフィーム細菌が感染源となって心臓、血管、肺、肝臓、脳、腎臓にしばしば急性あるいは慢性の炎症疾患を引き起こす事が臨床的に報告されており、口腔衛生の重要性が注目されている。

動脈硬化は心筋梗塞、脳梗塞などの日本人の死亡原因の多くを占める疾病の原因となる血管の変化であり、ヒト動脈硬化病巣 (Lehtiniemi J *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest.*, 2005; Nakano *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 2006) や血栓 (Pessi T *et al.*, *Circulation.*, 2013) から口腔細菌が検出されている。我々は、まず動脈硬化の新たなリスクファクター候補として、ヒト歯垢の中で量的に多くを占める口腔レンサ球菌に着目し、口腔レンサ球菌が動脈硬化のリスクファクターとなりうるかを実験的に検証した (平成 20~22 年度科学研究費 基盤(C))。その結果、調べた口腔レンサ球菌 10 菌種は全てヒト動脈内皮細胞に侵入し、その内 4 菌種は侵入した内皮細胞からサイトカインの産生を誘導した。中でも、*Streptococcus mutans* はもっとも強いサイトカイン誘導能を示した。ヒト動脈内皮細胞に口腔レンサ球菌が侵入しサイトカイン産生を誘導するという報告は、世界で初めてである (Nagata *et al.*, *Mol. Oral Microbiol.*, 2011)。次に我々は *Streptococcus oralis* の coaggregation receptor polysaccharides はヒト動脈内皮細胞に炎症反応を誘導することを報告した (Toledo *et al.*, *Mol. Oral Microbiol.*, 2012)。さらに *Streptococcus mutans* がヒト動脈内皮細胞に付着および侵入すると、内皮細胞のパターン認識受容体である TLR2 および NOD2 の発現が増加し、サイトカイン産生が誘導されること、菌刺激による細胞質内のパターン認識受容体の増加から、菌の細胞内侵入がサイトカインの産生誘導に重要であることを明らかにした (Nagata *et al.*, *Mol. Oral Microbiol.*, 2017)。

今回我々が着目したのは、動脈硬化誘発の感染源と目した“ヒト歯垢”そのものの動脈硬化誘発能の実験的解明である。我々は深部臓器における病原性の検索において歯垢を用いた実績があり (Nagata *et al.*, *Eur. J. Oral Sci.*, 2005; Okayama *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 2005)、これまでの研究成果から得られた知見を生かして、歯垢そのものを感染源として動脈硬化誘発能を検証することは実現可能と判断した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト歯垢を用いて 1) 歯垢細菌のヒト動脈内皮細胞への侵入能力、2) ヒト動脈内皮細胞に歯垢細菌が付着・侵入した時の内皮細胞におけるパターン認識受容体の発現、3) 歯垢細菌の付着・侵入によってヒ

ト動脈内皮細胞に誘導される炎症関連物質の発現、の検討を行うことである。歯垢のヒト動脈内皮細胞における炎症反応誘発能を調べた報告は今まで皆無であり、生体試料を直接用いることが本研究の独創的な点である。本研究で得られる成果が、動脈硬化予防のために口腔衛生が重要であることを国民にアピールするための、さらなる実験的確認となること、また歯垢感染による動脈硬化発症、増悪の予防法の開発に役立つこと、を目標している。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯垢細菌のヒト動脈内皮細胞 (HAEC) への侵入能力

HAEC を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。ヒト歯垢細菌を HAEC 培養上清に加え、4 時間共培養後、培地および HAEC 表面に存在する菌を抗生剤で処理した。HAEC に侵入し抗生剤の影響を受けずに生き残った菌を回収、ヒツジ血液寒天培地にて嫌氣的に培養後、菌の侵入率を算出した。

(2) ヒト歯垢細菌刺激による HAEC におけるパターン認識レセプター発現

HAEC を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。ヒト歯垢細菌を HAEC 培養上清に加え、4 時間共培養後、培地および HAEC 表面に存在する菌を抗生剤で処理した。ヒト歯垢細菌が HAEC に侵入した状態でさらに 24 時間培養し、HAEC を回収後 total RNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR 法にて HAEC における TLR1、TLR2、TLR4、NOD1、NOD2 mRNA 発現を定量し、非感染 HAEC および *S. mutans* Xc が感染した HAEC の産生量と比較した。

(3) ヒト歯垢刺激による HAEC におけるサイトカイン産生

HAEC を 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。ヒト歯垢細菌を HAEC 培養上清に加え、4 時間共培養後、培地および HAEC 表面に存在する菌を抗生剤で処理した。ヒト歯垢細菌が HAEC に侵入した状態でさらに 24 時間培養後、培地を回収し、ELISA 法にて IL-6、IL-8、MCP-1 タンパク量を計り、非感染 HAEC および *S. mutans* Xc が感染した HAEC の産生量と比較した。

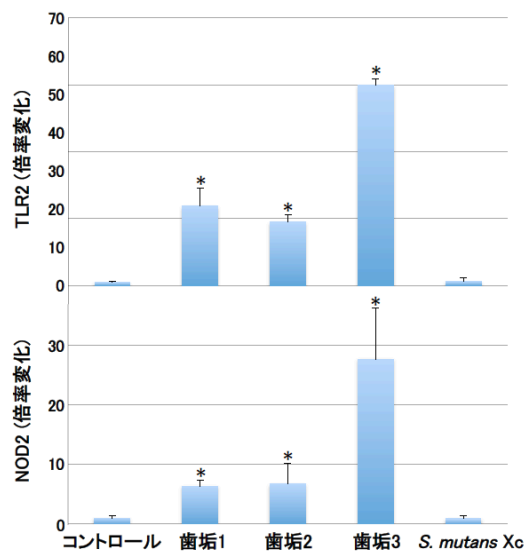
4. 研究成果

(1) ヒト歯垢細菌の HAEC への侵入能力

ヒト歯垢細菌と HAEC を 2、4、8、24 時間と共培養したところ、ヒト歯垢細菌は 8 時間以上の共培養で HAEC に対し傷害作用を示した。傷害しない条件下では、用いた歯垢細

菌は全て HAEC への侵入能力を示した。

(2) ヒト歯垢刺激による HAEC におけるパターン認識レセプター発現



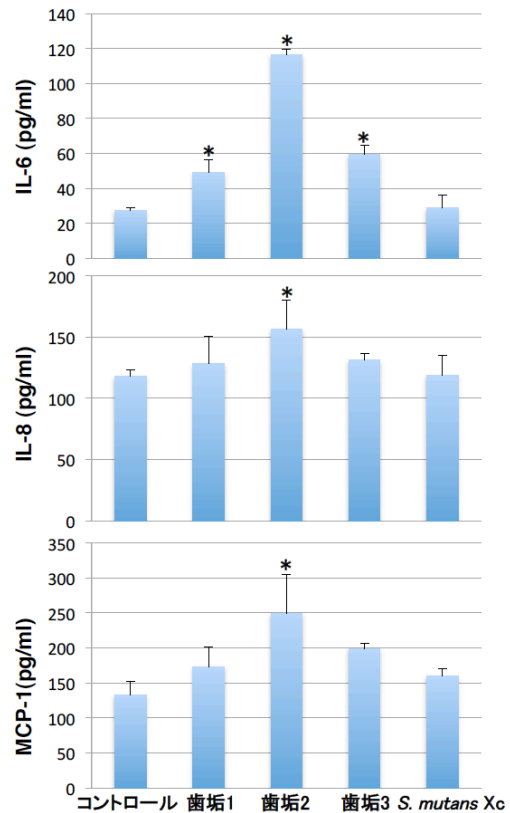
ヒト歯垢細菌と HAEC を 4 時間共培養して、HAEC に侵入していない菌を抗生剤で処理してさらに 24 時間培養したところ、非刺激 HAEC と較べて歯垢細菌で刺激した HAEC において有意に TLR2 および NOD2 mRNA 発現が増加していた (* $P < 0.05$)。この条件では *S. mutans Xc* は TLR2 および NOD2 mRNA 発現を誘導しなかった。

(3) ヒト歯垢刺激による HAEC におけるサイトカイン産生

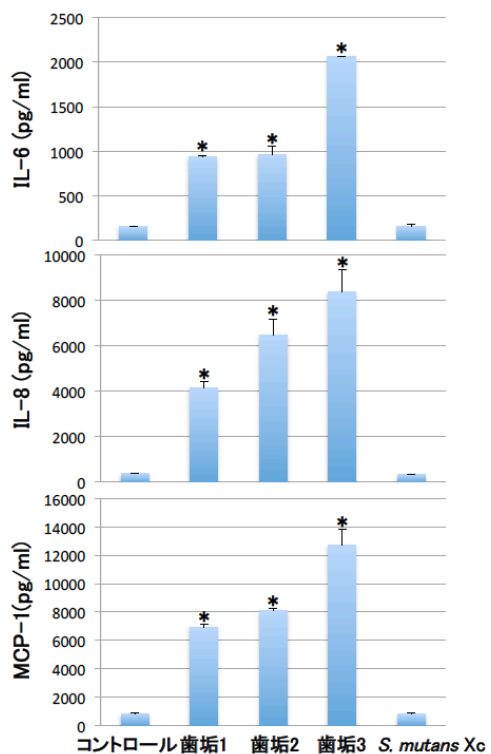
ヒト歯垢細菌と HAEC を 4 時間共培養、あるいは 4 時間共培養して、HAEC に侵入していない菌を抗生剤で処理してさらに 24 時間培養したところ、非刺激 HAEC と較べて前条件では一部の歯垢細菌が、また後条件では調べた歯垢細菌全てが、刺激した HAEC における IL-6、IL-8、MCP-1 産生を誘導した (* $P < 0.05$)。この条件では *S. mutans Xc* は HAEC におけるサイトカイン産生を誘導しなかった。

以上のことからヒト歯垢細菌は単独の口腔細菌よりも強い炎症反応誘導能を有しており、動脈硬化の発症、増悪に参与している可能性が示唆された。

ヒト歯垢と4時間共培養



4時間共培養して侵入した菌のみにして24時間培養



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1件)

① Nagata, E., and Oho, T.: Invasive *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokine production in human aortic endothelial cells via regulation of intracellular TLR2 and NOD2. 査読あり、Mol. Oral Microbiol. 32: 131-141, 2017. 10.1111/omi.12159

[学会発表] (計3件)

① 長田恵美、於保孝彦: ヒト歯垢のヒト動脈内皮細胞におけるサイトカイン産生誘導能の検討. 第66回日本口腔衛生学会・総会. 2017年6月1日, 山形テルサ(山形県山形市)

② Nagata E., and Oho T.: *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokines in HAECs via intracellular TLR2. 94th General Session and Exhibition of International Association for Dental Research. June 23, 2016. COEX Convention Center (大韓民国ソウル)

③ 長田恵美、於保孝彦: ヒト歯垢刺激によるヒト動脈内非細胞におけるパターン認識受容体の発現誘導. 第65回日本口腔衛生学会・総会. 2016年5月29日, 東京医科歯科大学(東京都文京区)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Preident/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 恵美 (NAGATA Emi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号: 00304816

(2) 研究分担者

於保 孝彦 (OHO Takahiko)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号: 50160940