

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861821

研究課題名(和文) Aa による歯周病とアテローム性動脈硬化症の発症への関与について

研究課題名(英文) The association between atherosclerosis and Aa that is a periodontal pathogenic bacteria.

研究代表者

下田平 直大 (Shimotahira, Naohiro)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：20710007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病はアテローム性動脈硬化症への関連性が示唆されている。本研究の目的は、歯周病原性細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の血管内皮細胞との反応性を解析することである。A. *actinomycetemcomitans* を破碎した後の上清により血管内皮細胞の炎症性サイトカインや接着因子の発現上昇を認めた。また、A. *actinomycetemcomitans* 破碎後の上清により血管内皮細胞と単球の接着を促進することを示した。これらのことから、A. *actinomycetemcomitans* がアテローム性動脈硬化症の発症に関与している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease has been pointed out relevance to atherosclerosis. The purpose of this study is to analyze the reaction of periodontal pathogenic bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and vascular endothelial cells. We found that was increased expression of inflammatory cytokines and adhesion factor of vascular endothelial cells by the supernatant after fracturing A. *actinomycetemcomitans*. We also found that was promoted adhesion of vascular endothelial cells and monocytes by supernatant after fracturing A. *actinomycetemcomitans*. Therefore, we suggested that A. *actinomycetemcomitans* was involved in the pathogenesis of atherosclerosis.

研究分野：歯周病学

キーワード：Aa Omp100 アテローム性動脈硬化症

1. 研究開始当初の背景

Aggregatibacter actinomycetemcomitans は歯周病原性細菌の一つであり、早期発症型歯周炎や慢性歯周炎の発症に関与している。*A. actinomycetemcomitans* の病原性因子として、lipopolysaccharide (LPS) や leucotoxin、cytolethal distending toxin (CDT)、コラゲナーゼ、外膜タンパク等が報告されている。*A. actinomycetemcomitans* の主要な外膜タンパクは6つ同定されており、Omp100、Omp64、Omp39、Omp29、Omp18、Omp16である(Komatsuzawa H, et al. Gene 2002;288:195-201)。Omp100の病原性として、補体活性化抑制因子である Factor H の結合能や炎症性サイトカインの誘導が報告されている(Asakawa R, et al. Mol Microbiol 2003;50:1125-1139)。

歯周病は、アテローム性動脈硬化症や冠動脈疾患、脳卒中、糖尿病、妊娠合併症といった全身疾患との関与が示唆されているが、そのメカニズムは明らかにされていない。歯周病とアテローム性動脈硬化症はともに多細菌、多因子性の疾患であるが、その関連性については十分に明らかとはされていない。

Porphyromonas gingivalis や *A. actinomycetemcomitans* により誘導される炎症性サイトカインが酸化低密度リポタンパクと反応することで心血管疾患のリスクとなるとする報告がある(J.G. Tew, et al. J Dent Res 2012;91:8-16)。*P. gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia* による混合感染によりアポリポプロテイン欠損マウス (ApoE^{null} mice) のアテローム性動脈硬化症と関連することが報告された(Mercedes F. Rivera, et al. PLoS One 2013;8:e57178)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病原性細菌である

A. actinomycetemcomitans とアテローム性動脈硬化症との関連性を解明することである。アテローム性動脈硬化症は血管内皮を障害されることで血管壁にある LDL を貪食したマクロファージが泡沫細胞になり、動脈硬化の可能性を考慮することとなる。

A. actinomycetemcomitans の外膜タンパク Omp100 は、ヒト歯肉上皮細胞に対する接着能や血清成分である C3b の接着阻害因子である Factor H 結合能、炎症性サイトカインの発現誘導などの病原性が報告されている。*A. actinomycetemcomitans* が血管中に存在することで炎症反応が活性化し、単球の遊走を促進し泡沫細胞を誘導すると考え、Aa と血管内皮細胞との炎症に関する関係性と内皮細胞に対する単球の接着能を検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 本実験で使用した菌株と培養条件

A. actinomycetemcomitans 野生株は、TSB-YE 培地 { Trypticase soy broth 培地に酵母エキス(1%) }を用い、5%CO₂下 37℃で培養した。Omp 100 欠損株は、TSB-YE 培地に spectinomycin(50μg/ml)添加したものをを用い、5%CO₂下 37℃で培養した。

培養後、細菌溶液を超音波にて菌体を破砕し抽出したたんぱく質について、溶液のタンパク定量を行った。

(2) 血管内皮細胞(HUVEC)の培養とリアルタイム PCR 解析

血管内皮細胞(HUVEC)は内皮細胞増殖培地 (endothelial cell basal medium-2) { EGM-2 MV を添加したもの } を用い、5%CO₂下 37℃で培養を行った。

培養液に抽出タンパク溶液を培地に播種し、60分間反応させた。細胞から total RNA を分離した後、リアルタイム PCR にて定量を行った。

(3) 血管内皮細胞(HUVEC)に対する単球
接着試験

血管内皮細胞(HUVEC)5x10⁴個を内皮細胞増殖培地に播種し 24 時間インキュベート後に、*A. actinomycetemcomitans* 抽出タンパクを添加しさらに 24 時間インキュベートする。PBS にて洗浄した後に PKH にて蛍光標識された単球細胞(THP-1)2x10⁵ 個を播種し 1 時間インキュベートする。PBS にて洗浄した後に 4%パラホルムアルデヒドにて固定処理を行い蛍光顕微鏡下にて観察を行った。

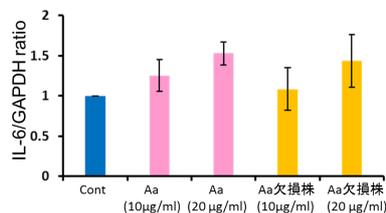
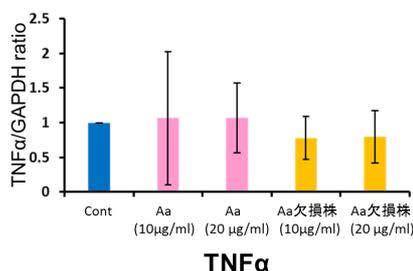
(4) 統計学的分析

統計学的分析には、one-way ANOVA と多重比較 (Tukey の検定) を用い、p<0.05 を有意差ありとした。

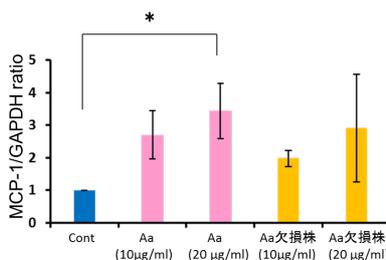
4 . 研究成果

(1) 血管内皮細胞(HUVEC)におけるリアルタイム PCR 解析

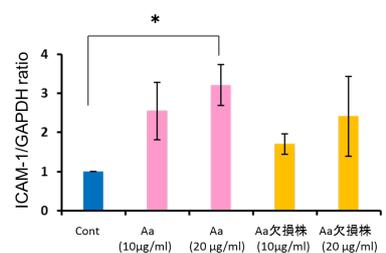
A. actinomycetemcomitans より抽出したタンパク質溶液は、血管内皮細胞より炎症性サイトカインである TNF α の発現誘導は認められなかったものの他の炎症性サイトカインである IL-6、MCP-1 の発現誘導ならびに免疫系の細胞間相互作用を司る接着分子である ICAM-1、VCAM-1 の発現誘導の傾向が認められた。また、Aa Omp100 欠損株において Aa 野生株と比較して炎症性サイトカイン発現に有意差は認められなかった (図 1)。



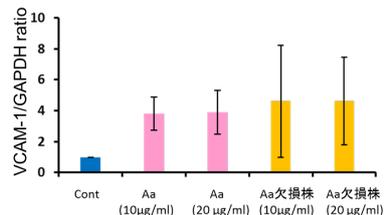
IL-6



MCP-1



ICAM-1



VCAM-1

Cont : コントロール
Aa : Aa野生株
Aa欠損株 : Aa Omp100欠損株

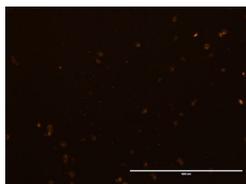
(図 1) 血管内皮細胞(HUVEC)における炎症性サイトカイン及び接着因子の mRNA レベルでの発現量

*p<0.05

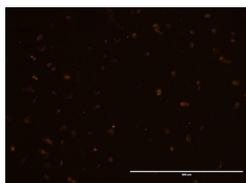
(2) 血管内皮細胞(HUVEC)に対する単球接着試験

血管内皮細胞(HUVEC)に接着した単球細胞 (THP-1) について、*A. actinomycetemcomitans* 野生株は *A. actinomycetemcomitans* Omp100 欠損株に対して接着した細胞数が多いことを確認した (図 2)。このことから、*A.*

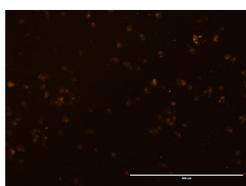
actinomycescomitans Omp100 は、血管内皮細胞に単球が接着する際に関与する可能性を示した。



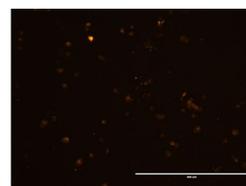
(a)
コントロール群



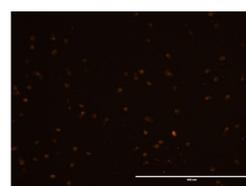
(b)
Aa 野生株
100 μg 添加群



(c)
Aa 野生株
200 μg 添加群



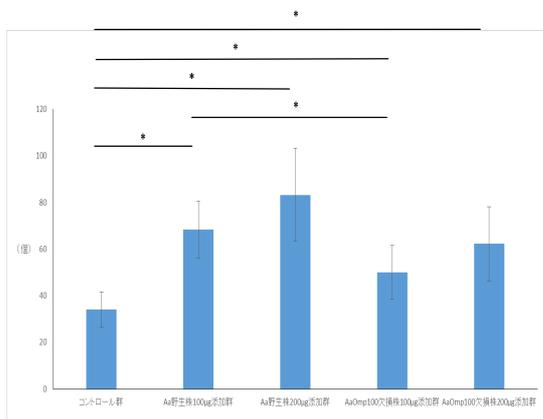
(d)
AaOmp100 欠損株
100 μg 添加群



(e)
AaOmp100 欠損株
200 μg 添加群

(f)血管内皮細胞に接着した単球細胞数

*p<0.05



(図2)血管内皮細胞に対する単球細胞接着試験

これらの結果より、歯周病原性細菌 *A. actinomycescomitans* がアテローム性動脈硬化症の発症に関与する血管内皮細胞と単球の接着を亢進する可能性を示唆した。このことは、歯周病と全身疾患の関連性に関するメカニズムの研究に貢献するものと考えられる。

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)

[学会発表](計 1件)

1. インプラント周囲炎原因菌 *Aggregatibacter actinomycescomitans* のアテローム性動脈硬化症への関与について

下田平直大，西 恭宏，西村正宏

平成 27 年度日本補綴歯科学会九州支部会
2015 年 8 月 23 日福岡県北九州市九州歯科大学講堂

6. 研究組織

(1)研究代表者

下田平 直大(SHIMOTAHIRA NAOHIRO)
鹿児島大学医歯学域歯学系・助教

研究者番号：20710007