

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09326

研究課題名（和文）歯周病巣のexosomeによる脳動脈瘤破裂への影響

研究課題名（英文）Effects of exosomes of periodontal lesions on ruptured cerebral aneurysms

研究代表者

島田 健司（SHIMADA, Kenji）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：60624351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳疾患のうち脳梗塞や脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血（SAH）などの脳卒中は、国内死因の上位を占めており、寝たきりの原因の第一位であるため有効な予防や治療の方策が求められている。これまでに、これらの疾患と歯周病との関連性を解析し、破裂脳動脈例では重症歯周病例が多いことを報告しているが（Neurosurgery Open, 2023）、脳動脈瘤破裂に至る歯周病菌の特定や歯周病菌による破裂のメカニズムの解析も行われていないことから、脳動脈瘤破裂における特定歯周病菌の影響を明らかにするとともに、病巣から遊離されるexosomeの役割に着目し、検討を行い、解析法を確立し、継続して検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳動脈瘤の破裂により発症するくも膜下出血は、国内の死因の第2位となっており、患者の約3割以上に脳血管の攣縮を認め、致死に至る確立が高く、また麻痺や言語障害などの重度な後遺症を残すことから、くも膜下出血の予防法や破裂後の治療法を確立することは、極めて重要と思われる。また脳動脈破裂予後の治療法を確立することも重要である。脳動脈破裂モデルや歯周上皮細胞を用いて脳血管の病態に關与する分子機序を解明し、治療標的の同定および脳動脈瘤破裂予防に向けての方策を探求することで、有効な予防方策を確立し、寝たきりの症例を減少させ、患者および家族の負担を軽減するためにも、本研究は社会的意義が大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：The pathophysiology of subarachnoid hemorrhages (SAHs) due to ruptured intracranial aneurysms (IAs) remains unclear. Since a relationship between SAHs and periodontal disease (PD) has been suggested, we examined these relationships in the previous study and demonstrated that the incidence of SAHs was significantly increased in the patients with severe PD. However, the detail mechanisms of these relationships remains unknown. To elucidate the mechanisms and the specific pathogen, we need to perform the further clinical and pre-clinical studies. Using periodontal bacteria, we confirmed the enhanced inflammatory changes in the cerebral vascular wall prone to rupture. We underway further studies to clarify which periodontal bacteria is essential to induce aneurysmal rupture and how exosome from periodontal disease affect the rupture of intracranial aneurysms.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：SAH intracranial aneurysms periodontal disease periodontal bacteria exosome

1. 研究開始当初の背景

脳動脈瘤形成・増大・破裂には脳血管の炎症反応が関わっていることをこれまでにモデル動物を用いて実証している。炎症反応にはダメージ関連分子 (DMPs) や病原体関連分子 (PAMPs) およびその認識機構である inflammasome が重要な役割を果たすと考えられており、自己免疫疾患、糖尿病、動脈硬化性疾患などで報告されているおり、研究代表者らも脳動脈瘤形成・増大・破裂と inflammasome の関係性について検討している、

また、フィンランドから脳動脈瘤破裂症例の血管壁の 58% に歯周病菌の DNA が存在することが報告され、破裂脳動脈瘤壁の定量 PCR による DNA 解析では *Streptococcus mitis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Fusobacterium Nucleatum*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* (Pg) などの歯周病関連細菌 DNA が検出されている (J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013)。研究代表者らも歯周病重症度と脳動脈瘤破裂との関係性を自験例で確認している。

一方、脳動脈瘤壁ではリコシルホスファチジルイノシトール結合型 単鎖膜糖タンパクである CD14 と toll like receptor 2 の複合体の高い発現が認められており、CD14 はリポ多糖類 (LPS) と LPS 結合タンパク (LBP) の複合体の高親和性レセプタとして機能することが示されている。研究代表者らも脳動脈瘤破裂ラットモデルにヒトでの発現率の高い歯周病菌 Pg 由来 LPS を予備検討的に腹腔内投与することにより、脳動脈瘤の破裂頻度が増加することを確認している。

一方、歯周疾患は脳血管障害や動脈硬化性疾患や糖尿病の病態、血管内皮障害にも関与していると考えられているため、歯周の局所炎症が全身性に影響する可能性があると考え、歯周の炎症によって放出されると考えられる exosome に着目して脳動脈瘤破裂との関連性を明らかにしていく必要があると思われた。そこで、臨床例においても脳動脈瘤破裂のメカニズムとして歯周病巣からの exosome を介した影響を受けて破裂に至るかどうかなを確認することとした。

2. 研究の目的

歯周病菌の存在と関連して、さまざまな疾患に関与する機序としては、歯周病菌が炎症細胞を刺激し、酸化ストレスの増強、Heat Shock Protein (HSP)60 を介した免疫応答、免疫機構の破綻などに関与していることが示唆されている。しかし、脳動脈瘤破裂への歯周病菌の関与についての詳細は不明であるため、本研究では

- (1) ヒト脳動脈瘤破裂における歯周病重症度との関係を明らかにする。
- (2) 脳動脈瘤破裂に影響する歯周病菌を同定する。
- (3) ラット脳動脈破裂モデルやヒト歯周上皮細胞を用いて病態に関与する分子機序を解明するために、exosome 中に含まれる炎症関連分子との関連性を検討する。
- (4) 治療標的分子の同定および脳動脈瘤破裂予防方策について検討する。

3. 研究の方法

低酸素下に暴露されたがん細胞で顕著に増加する miRNA が exosome を介して血管内皮細胞に取り込まれることが証明されている。一方、歯周病菌に感染した歯周局所の炎症反応により、重症化した病巣から放出された exosome が脳動脈瘤破裂に関連することを証明する研究は世界的にも行われていないので、検討に時間を要したが、現在、確実に抽出し、解析可能となったことから以下の検討を進めている。

- (1) 脳動脈症例および同年令の健常者を対象に未破裂と破裂例で歯周病の重症度を歯周病専門医が分類し、歯周病重症度と脳動脈瘤破裂との関係性を解析する。
- (2) 健常者、未破裂および破裂脳動脈例の歯周ポケットおよび血中の測定可能な歯周病菌を解析する。

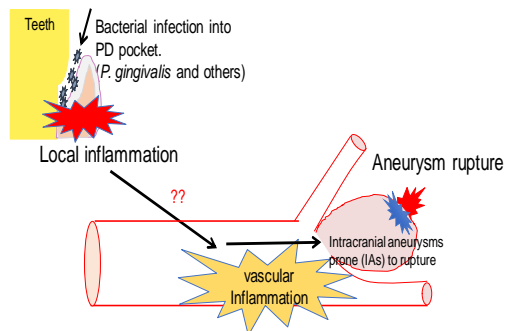


図1 歯周病菌による脳動脈瘤破裂への影響

- (3) 歯周病菌と破裂脳動脈例との関連性を明らかにするため、plasma 中の matrix metalloproteinase (MMP)-9 や Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) 2 レベルの解析を行い、exosome 解析をデータとの関連性を調べ、健常者と比較解析する。

- (4) 脳動脈瘤モデル動物においては、破裂脳動脈瘤壁の MMP-9 や TIMP2 の発現レベルを mRNA レベルで解析しており、これらの不均衡が破裂脳動脈瘤と関係することをこれまでに報告している (JCBFM, 2017、JNS, 2018) (図1)。

(5) 臨床例で脳動脈瘤破裂に有意な影響を示すことが歯周病菌で同定された場合、(図2)その歯周病菌 LPS を脳動脈瘤モデル動物に投与し、脳動脈瘤壁における発現分子への影響を解析する。

(6) さらに破裂に関係すると思われる exosome の解析を行い、破裂に関係する分子を同定する。

4. 研究成果

(1) 脳動脈症例および同年令の健常者を対象に未破裂と破裂例で歯周病の重症度を判定し、歯周病専門医が分類しているが、現在、症例数が少ないことから、継続して症例数を集めている。

(2) 脳動脈瘤破裂に関係した歯周病菌としての特定はできていないが、検出できた歯周病菌で候補となる歯周病菌について LPS を作製し、脳動脈瘤モデル動物に投与し、破裂率が增加するか、またそのメカニズムとして exosome を介した分子との関連性を解析する準備を進めている。

(3) 歯周病重症度と関連した歯周病菌と脳動脈瘤破裂症例との関係を調べるための対象疾患の症例数が少ないことから、症例数を引き続き集めている。一方、exosome 解析法を確立する検討に時間を要したが、市販の抽出 kit を用いて exosome 抽出から mRNA 解析までの方法を確率できたことから、今後も継続して検討を行い、exosome および 破裂関連分子の解析を行い、脳動脈瘤破裂と特定歯周病菌の関係性を明らかにする予定である。

(4) 抽出した exosome 中の炎症関連分子や細胞増殖分子の mRNA level の解析を行い、脳動脈瘤破裂の病態への影響を明らかにする予定である。これまでに血中レベルでの解析を行っており、以下のデータを得ている(図3、図4)。これらが歯周病病巣からの exosome と関連するかに明らかにする予定である。

図2
Periodontal bacteria (% of plasma IgG)

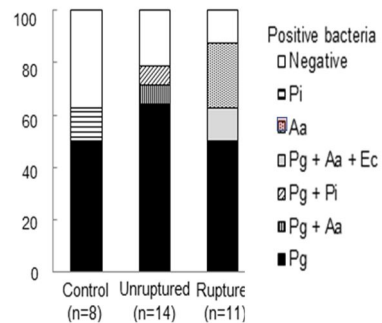


図3

歯周病重症度(BOP)に応じて血中MMP-9は増加し、TIMP-2の発現は低下し、不均衡を示す

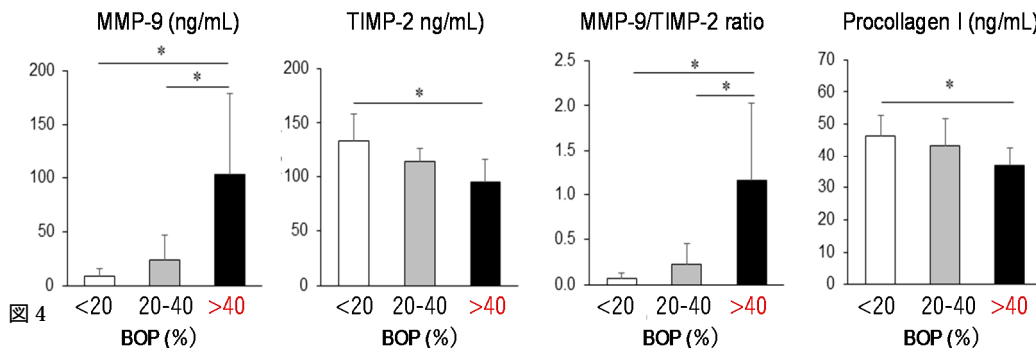
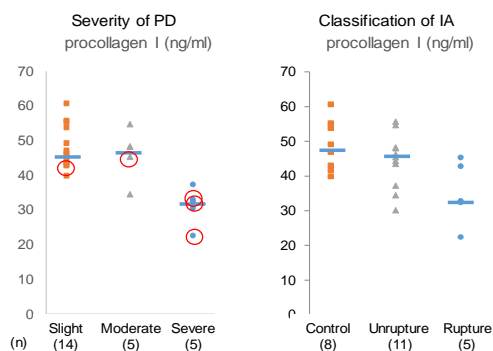


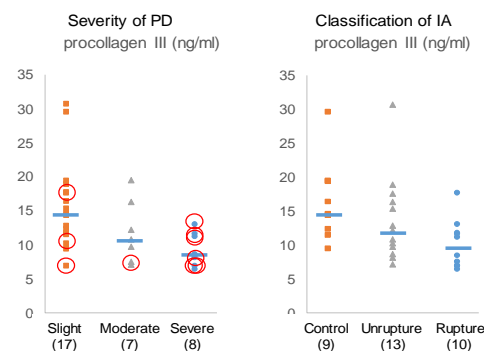
図4

血中collagen Iレベルは重症歯周病の脳動脈瘤破裂例でも低下する

A plasma level of procollagen I



B plasma level of procollagen III



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Takagi Yasushi, Kanematsu Yasuhisa, Mizobuchi Yoshifumi, Mure Hideo, Shimada Kenji, Tada Yoshiteru, Morigaki Ryoma, Sogabe Shu, Fujihara Toshitaka, Miyamoto Takeshi, Miyake Kazuhisa | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Basic research and surgical techniques for brain arteriovenous malformations | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation | 6. 最初と最後の頁 222 ~ 228 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.67.222 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamamoto Nobuaki, Izumi Yuishin, Yamamoto Yuki, Kuroda Kazutaka, Yamaguchi Izumi, Sogabe Shu, Miyamoto Takeshi, Shimada Kenji, Kanematsu Yasuhisa, Morigaki Ryoma, Takagi Yasushi | 4. 巻 199 |
| 2. 論文標題 Factors associated with DWI-ASPECTS score in patients with acute ischemic stroke due to cerebral large vessel occlusion | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Neurology and Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 106316 ~ 106316 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clineuro.2020.106316 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Shimada Kenji, Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Sogabe Shu, Korai Masaaki, Okazaki Toshiyuki, Kanematsu Yasuhisa, Satomi Junichiro, Nagahiro Shinji, Takagi Yasushi | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Efficacy of intraarterial superselective indocyanine green videoangiography in cerebral arteriovenous malformation surgery in a hybrid operating room | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 9 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2020.3.JNS20319 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yoshioka Shotaro, Miyamoto Takeshi, Satomi Junichiro, Tada Yoshiteru, Yagi Kenji, Shimada Kenji, Naruishi Koji, Shikata Eiji, Yamaguchi Izumi, Yamaguchi Tadashi, Korai Masaaki, Okayama Yoshihiro, Harada Masafumi, Kitazato Keiko T, Kanematsu Yasuhisa, Nagahiro Shinji, Takagi Yasushi | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Disequilibrium of Plasma Protease/Anti-Protease Due to Severe Periodontal Disease Contributes to Human Subarachnoid Hemorrhage | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neurosurgery Open | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuopn/okaa007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Shikata Eiji, Miyamoto Takeshi, Yamaguchi Tadashi, Yamaguchi Izumi, Kagusa Hiroshi, Gotoh Daiki, Shimada Kenji, Tada Yoshiteru, Yagi Kenji, Kitazato Keiko T., Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 An imbalance between RAGE/MR/HMGB1 and ATP1 3 is associated with inflammatory changes in rat brain harboring cerebral aneurysms prone to rupture | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-022-02526-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Shimada Kenji, Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Sogabe Shu, Korai Masaaki, Okazaki Toshiyuki, Kanematsu Yasuhisa, Satomi Junichiro, Nagahiro Shinji, Takagi Yasushi | 4. 巻 134 |
| 2. 論文標題 Efficacy of intraarterial superselective indocyanine green videoangiography in cerebral arteriovenous malformation surgery in a hybrid operating room | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 1544 ~ 1552 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2020.3.JNS20319 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Shimada Kenji, Yamaguchi Izumi, Miyamoto Takeshi, Sogabe Shu, Miyake Kazuhisa, Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Efficacy of intraarterial indocyanine green videoangiography in surgery for arteriovenous fistula at the craniocervical junction in a hybrid operating room: illustrative cases | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/CASE22100 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Shimada Kenji, Miyake Kazuhisa, Yamaguchi Izumi, Sogabe Shu, Korai Masaaki, Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi | 4. 巻 169 |
| 2. 論文標題 Efficacy of Utilizing Both 3-Dimensional Multimodal Fusion Image and Intra-Arterial Indocyanine Green Videoangiography in Cerebral Arteriovenous Malformation Surgery | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 World Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 e260 ~ e269 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2022.10.121 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Shikata Eiji, Yamaguchi Izumi, Shimada Kenji, Yagi Kenji, Tada Yoshiteru, Korai Masaaki, Kitazato Keiko T., Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi | 4. 巻 138 |
| 2. 論文標題 Activation of the NLRP3/IL-1 /MMP-9 pathway and intracranial aneurysm rupture associated with the depletion of ER and Sirt1 in oophorectomized rats | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 191 ~ 198 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2022.4.JNS212945 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Tadashi, Miyamoto Takeshi, Kitazato Keiko T., Shikata Eiji, Yamaguchi Izumi, Korai Masaaki, Shimada Kenji, Yagi Kenji, Tada Yoshiteru, Matsuzaki Yoshihito, Kanematsu Yasuhisa, Takagi Yasushi | 4. 巻 133 |
| 2. 論文標題 Time-dependent and site-dependent morphological changes in rupture-prone arteries: ovariectomized rat intracranial aneurysm model | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery | 6. 最初と最後の頁 1486 ~ 1494 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2019.6.JNS19777 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Yamaguchi Izumi, Kanematsu Yasuhisa, Shimada Kenji, Yamamoto Nobuaki, Miyake Kazuhisa, Miyamoto Takeshi, Sogabe Shu, Shikata Eiji, Ishihara Manabu, Yamamoto Yuki, Kuroda Kazutaka, Takagi Yasushi | 4. 巻 3 |
| 2. 論文標題 Single-session hematoma removal and transcortical venous approach for coil embolization of an isolated transverse-sigmoid sinus dural arteriovenous fistula in a hybrid operating room: illustrative case | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Case Lessons | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/CASE2267 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kurashiki Yoshitaka, Kagusa Hiroshi, Yagi Kenji, Kinouchi Tomoya, Sumiyoshi Manabu, Miyamoto Takeshi, Shimada Kenji, Kitazato Keiko T, Uto Yoshihiro, Takagi Yasushi | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Role of post-ischemic phase-dependent modulation of anti-inflammatory M2-type macrophages against rat brain damage | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism | 6. 最初と最後の頁 531 ~ 541 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X221147090 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 島田健司, 三宅一央, 山口泉, 宮本健志, 曾我部周, 兼松康久, 高木康志 |
| 2. 発表標題 AVM摘出術における3D multimodal fusion imageとICG動注による術中videoangiography併用の有用性 |
| 3. 学会等名 第51回日本脳卒中の外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 島田健司, 山口泉, 四方英二, 宮本健志, 曾我部周, 三宅一央, 牟礼英生, 兼松康久, 高木康志 |
| 2. 発表標題 くも膜下出血で発症した頭蓋頸椎移行部動静脈瘻の2例 |
| 3. 学会等名 第37回日本脳神経血管内治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 島田健司, 三宅一央, 山口泉, 宮本健志, 曾我部周, 兼松康久, 高木康志 |
| 2. 発表標題 AVM摘出術における3D multimodal fusion imageとICG動注による術中videoangiography併用の有用性 |
| 3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 島田健司, 山本陽子, 山口泉, 宮本健志, 曾我部周, 兼松康久, 高木康志 |
| 2. 発表標題 AVM摘出術におけるHybrid手術室でのインドシアニン・グリーン動注による術中videoangiographyの有用性 |
| 3. 学会等名 第44回日本脳神経C1学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口真司、宮本健志、四方英二、島田健司、多田恵曜、高麗雅章、北里慶子、兼松康久、高木康志 |
| 2. 発表標題 ER およびSirt1の減少を介したNLRP3の活性が卵巣摘出ラットの脳動脈瘤破裂に影響する |
| 3. 学会等名 日本脳神経外科学会第81回学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山口真司、高麗雅章、島田健司、多田恵曜、北里慶子、兼松康久、高木康志 |
| 2. 発表標題 卵巣摘出ラットにおけるER およびSirt1の減少を介したNLRP3の活性と脳動脈瘤破裂の関連 |
| 3. 学会等名 第65回日本脳循環代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 高木 康志 (TAKAGI Yasushi) (40312227) | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101) | |
| 研究分担者 | 兼松 康久 (KANEMATSU Yasuhisa) (90363142) | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授 (16101) | |
| 研究分担者 | 八木 謙次 (YAGI Kenji) (80551837) | 川崎医科大学・医学部・講師 (35303) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 多田 恵曜 (TADA Yoshiteru) (30547964) | 徳島大学・病院・特任講師 (16101) | |
| 研究分担者 | 高麗 雅章 (KORAI Masaaki) (60794013) | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教 (16101) | |
| 研究分担者 | 宮本 健志 (MIYAMOTO Takeshi) (80585000) | 徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門 研究員 (16101) | |
| 研究分担者 | 四方 英二 (SHIKATA Eiji) (30813315) | 川崎医科大学・医学部・講師 (35303) | |
| 研究分担者 | 山口 泉 (YAMAGUCHI Idumi) (70780005) | 徳島大学・病院・特任助教 (16101) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |