

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 21 年度～平成 22 年度

課題番号：21792127

研究課題名（和文） 歯周病細菌が産生する血栓形成因子検出システムの開発

研究課題名（英文） Development of a sensing system for thrombus formation factors produced by periodontopathic bacterium.

研究代表者

笠井 宏記 (KASAI HIRONORI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60398469

研究成果の概要（和文）：歯周病と心筋梗塞との関連性を調べるため、我々は血管をモデル化した微小流路装置を開発し、歯周病細菌が血栓を形成するメカニズムの解析を行ってきた。その結果、微小流路での流通細胞の観察方法が確立できた。さらにプラック化率はマクロファージを LPS にて活性化させると増加し、歯周病細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* で感染させると減少することが定量的に評価できた。また、LDL 存在下ではプラック化に関与するマクロファージの泡沫化の亢進が生じた。

研究成果の概要（英文）：To investigate the relation between periodontitis and myocardial infarction, we have developed a sensing system for thrombus formation factors produced by periodontopathic bacterium. As a result, we observed increased plaque formation by macrophages in the presence of LPS. In addition, the plaque formation was decreased after infection with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. We showed that foam cell formation in macrophages was significantly enhanced by stimulation of LDL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1700000	510000	2210000
平成 22 年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	930000	4030000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、血栓形成、微小流路

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病と様々な全身疾患の関連が報告されている。なかでも、歯周病と心筋梗塞の関連については大規模疫学調査の結果が示されると共に、生活習慣病という視点からも注目されている。また、歯周病細菌が産生するプロテアーゼや内毒素が血管内で血栓の形成を助長し、さらに泡沫化細胞を増加させて梗塞を促進していることが明らかとなってきた。しかし、臨床検査レベルで歯周病細菌が血栓を形成することを実証する技術の

開発は遅れている。そこで、本研究では血管をモデル化するために流通チップ内に微小流路を作製し、それを用いて *in vitro* で細胞附着を観察するシステムを構築し、将来的に臨床診断に耐えうる機器の開発を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、まず微小流路内で細胞附着と梗塞化を顕微鏡下でリアルタイムに観察できるシステムを構築する。その過程で、我々の

研究グループが発表してきた血栓形成の分子メカニズムを軸にシステムの有効性を検証する。開発予定の検出機器の有効性を科学的に実証していくなかで、実用化に向けて応用開発を進め、社会に役立つ機器として活用されることを目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 微小流路のデザインの決定（流路幅およびピラーの設置位置の決定）

これまでは一種類の細胞で流路の観察を行ってきたが、本研究ではマウスおよびヒトに加え、泡沫化した細胞などの付着率の変化を調べる。また、流路幅や障害物となるマイクロピラーの大きさ、位置等について比較検討する。

(2) 細胞付着率の解析方法の決定

本研究では、培養細胞（マウスマクロファージとヒト単球系細胞）を用いて、*in vitro*の流路系で一定時間 5%CO₂ 存在下で培養できる実験観察系を構築する。

(3) 微小流路中にヒト血清を添加した際の変化を顕微鏡で観察

培養液中に LDL や酸化 LDL を添加し、細胞の付着率の変化を定量化するシステムを構築する。あわせてヒト血清を用いて含有 LDL と細胞付着率の相関を調べ、今後の調査研究機器としての可能性を探る。

4. 研究成果

(1) 微小流路における流路幅や障害物となるマイクロピラーの大きさ、位置等について比較検討した。また培養細胞（マウスマクロファージとヒト単球系細胞）を用いて、*in vitro* の流路系で一定時間 5%CO₂ 存在下で培養できる実験観察系を構築した。その結果、微小流路での流通細胞の観察方法が確立できた。そして流路中にマイクロピラー（障害物）を設けることで、細胞がピラーに付着していく様相が観察できた。さらにブラック化の度合いはマクロファージを LPS にて活性化させると増加し、歯周病細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* で感染させると減少することが定量的に評価できた。*A. actinomycetemcomitans* に感染したマウスマクロファージが G1 期において細胞周期停止を起こすことが確認され、*Oral Diseases* において報告を行った。

(2) LDL (Low Density Lipoprotein) や HDL (High Density Lipoprotein) 添加による高脂質環境下における細胞付着率を観察することにより、より生理的環境に近い状態で血栓形成のメカニズムを解明することに着手した。その結果、LDL 添加によりマクロフ

ージ細胞株の泡沫化の亢進が生じたが、HDL では起こらなかった。このことより、HDL ではなく LDL がマクロファージを泡沫細胞へと変化させ、プラーク形成に関与している可能性が示唆された。

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 村岡 宏祐、中島 啓介、笠井 宏記、角町正勝、石田 吉廣、道津 剛佑、横田 誠、歯科医療従事者における歯の喪失に関連する因子、日本歯周病学会雑誌、査読有、第 52 巻、2010 年、381-390
- ② Hironori Kasai, Keisuke Nakashima, Makoto Yokota, Tatsuji Nishihara, The G1 cell cycle arrest of macrophages infected with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Oral Diseases*, 査読有、Vol. 16, 2010, 305-309

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 笠井 宏記、中島 啓介、横田 誠、西原 達次：歯周病細菌感染マクロファージの泡沫化におけるアディポネクチンの果たす役割：2009 年 5 月 30、31 日：北九州市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 宏記 (KASAI HIRONORI)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60398469

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：