

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4月26日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592338

研究課題名（和文） 歯周病と血管内皮機能障害の相互作用における Rho キナーゼの役割と阻害剤の効果

研究課題名（英文） Role of Rho kinase and effects of its inhibitors on interaction between periodontitis and vascular endothelial dysfunction

研究代表者

林田 秀明（HAYASHIDA HIDEAKI）

長崎大学・大学病院・講師

研究者番号：20238140

研究成果の概要（和文）：

In vitro で歯周病原細菌およびその構成成分である LPS で培養ヒト血管内皮細胞を刺激した。定量的 PCR および Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) またはウェスタン法によりタンパク質発現量を解析した結果、*Porphyromonas gingivalis* LPS は Rho キナーゼ関連遺伝子の発現に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Human arterial vascular cells were stimulated by periodontal pathogens or their LPSs. The results of real time PCR analysis, ELISA, and western blot analysis suggested that *P. gingivalis* LPS were associated with the expression of Rho kinase related genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯周病原細菌、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

心血管疾患やその発症のリスクとなる糖尿病、高血圧、脂質異常、肥満などのメタボリックシンドロームと口腔の関係について様々な基礎的、臨床的および疫学的知見が得られている。また、歯周局所の細菌感染および炎症がこれらの全身疾患の発症、進行に関与することが示唆されている (Iacopino and Cutler, J Periodontol, 71, 1375-1384, 2000)。 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) など数種類の歯周病原細菌がヒトの動脈

硬化病変から検出されている (Kozarov et al., Microbes Infect, 8, 687-693, 2006)。 Aa を用いたマウスでの研究では動脈硬化病変の形成の関与することが示されている (Tuomainen et al., Microb Pathog, 44, 111-117, 2008)。我々の研究グループでも、糖尿病、血糖コントロールおよび肥満といった全身状態と歯周病についての疫学研究および基礎的研究を行っており、関連を裏付ける結果が示された。血管内皮は血管の内張りとしてだけでなく様々な機能を有することが注目されている。

血管内皮の総面積はテニスコート6面、重量は肝臓と匹敵する内分泌器官である。血管内皮細胞の機能として、物質の選択的透過作用、血圧・血管緊張性調節作用、抗血栓・抗凝固作用、白血球との相互作用、血管新生能などがある。血管内皮機能障害は、心血管疾患と関連し、動脈硬化の初期段階で起こる。血管内皮機能は、単に循環器領域にとどまらず、炎症、創傷治癒、インスリン抵抗性、肥満、脂質異常においても重要であるといわれている。

血管内皮機能障害には酸化ストレスが重要な役割を果たす。糖尿病などによって酸化ストレスが増加すると、血管内皮細胞が障害され、一酸化窒素(NO)の産生が低下し、血管の収縮、炎症の活性化、血栓形成の促進を起こす。NOは生理状態では内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)により産生され、病的状態では誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)により産生される。

1990年代に同定された細胞内セリンスレオニンリン酸化酵素であるRhoキナーゼは、分子量約160kDaで、ROCK I/IIの2種類のアイソフォームがあるが、冠動脈攣縮、動脈硬化、高血圧、肺高血圧、虚血障害などの心血管疾患に深く関与することが示唆されている。Rhoキナーゼの活性化は、IL-6や単球走化性因子(MCP-1)、インターフェロン- γ などのサイトカインや血栓形成に関わるプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1(PAI-1)や組織因子、線維化に関与する形質転換増殖因子- β (TGF- β)や抗アポトーシス分子Bcl-2を促進的に制御する。一方、血管内皮機能維持に重要なeNOSを抑制的に制御し、メタボリックシンドローム患者ではRhoキナーゼ活性の上昇が認められている(Liu et al., *J Am Coll Cardiol*, 49, 1619-1624)。また、ラットに内毒素症を惹起させた結果、小腸間膜動脈の血管緊張、iNOSおよびRhoキナーゼの活性化と阻害薬による改善が報告されている(da Silva-Santos et al., *Crit Care Med*, 37, 1716-1723, 2009)。このように近年注目を集めているRhoキナーゼは、メタボリックシンドロームおよび心血管疾患において治療のターゲットとして阻害薬の開発が進められている(Higashi et al., *Circ J*, 73, 411-418, 2009)。

2. 研究の目的

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において歯周病原細菌の病原因子のひとつであるPgのLPSがiNOSを誘導し、産生されたNOが内皮細胞層の連続性を低下させることが報告されている(Hama et al., *Clin Exp Immunol*, 154, 384-390, 2008)。また、臨床研究では、心血管障害の患者において歯周病がNOの生

理活性の低下による血管内皮機能障害のリスクファクターであることが報告されている(Higashi et al. *Atherosclerosis*, 206, 604-609, 2009)。

本研究では、血管内皮機能制御の中でこれまでに歯周病との関連が明らかでないRhoキナーゼをメディエーターとした歯周病と血管内皮機能障害の相互作用とRhoキナーゼ阻害薬の改善効果への影響を明らかにすることを目的とした。

- 歯周病原細菌由来のLPSおよび菌体の暴露が、血管内皮細胞でRhoキナーゼ活性の変化、Rhoキナーゼアイソフォーム間の活性の差異に影響するかを明らかにする。
- Rhoキナーゼ阻害剤やRhoキナーゼアイソフォームに対する遺伝子の発現を抑制したときの下流遺伝子発現や形態変化の影響を検討する。
- 高グルコース存在下および酸化LDL存在下といった非生理的状態の血管内皮細胞におけるRhoキナーゼ経路および阻害剤の効果についての歯周病原細菌の影響を検討する。

これらの3点を明らかにすることを具体的な目的とした。

3. 研究の方法

I. 菌体及び試料の調整

- PgおよびAaの保存菌株を37°Cで嫌気培養し、菌体を生理食塩水に懸濁し、実験に使用した。
- PgおよびAaの精製LPSを超純水に溶解し実験に使用した。
- 臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)および大動脈内皮細胞(HAEC)を5% CO₂, 37°Cで継代培養し3~8世代を実験に使用した。

II. LPSおよび菌体による血管内皮細胞(EC)における各分子の発現に対する影響

- LPSおよび菌体を培養した血管内皮細胞の培養液に添加し、一定時間培養した。
- 培養上清に分泌されるiNOSなどのタンパク質をEnzyme linked immunosorbant assay (ELISA)で測定した。
- 細胞内にとどまるeNOS、ROCK I、ROCK IIについてはウエスタンブロットにて対照群と比較した。
- 細胞からmRNAを抽出し、cDNAを合成したのち、それぞれのプライマーを用いて、GAPDHなどのハウスキーピング遺伝子を基準とした定量的PCRで発現量を測定した。

III. PgLPS による EC の形態変化

- ① 細胞骨格の変化を観察するために、F-actin を免疫染色し、細胞間ギャップ形成や膜ラッフル形成状態を観察した。
- ② Calcein AM 染色し、蛍光顕微鏡を用いて細胞接合と管状形成を経時的に観察した。
- ③ 3 次元培養の一つであるスフェロイド培養の系を用いて形成されたスフェロイドを蛍光顕微鏡にて観察し、スフェロイド径の計測、細胞増殖能を評価した。

IV. ROCK1/II に特異的な short interfering RNA (siRNA) をトランスフェクションした EC における PgLPS による刺激に対する各分子の発現レベルの解析

- ① EC に ROCK I または ROCK II に特異的な siRNA をトランスフェクションし培養し、PgLPS でトランスフェクションした EC を刺激した。
- ② Rho キナーゼの抑制と関連分子の発現を解析した。

V. Rho キナーゼ阻害剤に対する PgLPS の影響

- ① EC を Rho キナーゼ阻害剤で処理した。
- ② PgLPS でトランスフェクションした EC を刺激した。
- ③ Rho キナーゼの抑制と関連分子の発現を評価した。

VI. 高グルコース、酸化 LDL、または高レジスチン存在下の EC における Rho キナーゼに対する歯周病原細菌および LPS の影響

- ① 通常培養した EC を高グルコース、酸化 LDL、レジスチン添加の培地に交換後、菌体および LPS を添加した。
- ② 培養上清に分泌される iNOS などのタンパク質を ELISA で測定した。
- ③ 細胞内にとどまる eNOS、ROCK I、ROCK II についてはウエスタンブロットにて対照群と比較した。
- ④ 定量的 PCR で発現量を測定した。

4. 研究成果

表 1. PgLPS による血管内皮細胞における発現量の変化

	HUVEC		HAEC	
	mRNA	タンパク質	mRNA	タンパク質
eNOS	+	+	+	+
iNOS	+	+	+	+
ROCK I	+	+	+	+
ROCK II	+	+	+	+

+ : 促進

表 1 に示すように歯周病原細菌 Pg 由来 LPS 刺激で HUVEC および大動脈内皮細胞 (HAEC)

では無刺激の内皮細胞と比較して eNOS の転写レベルおよび翻訳レベルで促進される傾向がみられた(表 1)。同様に iNOS、ROCKI、ROCKII の発現も促進される傾向がみられた。菌体および他の口腔細菌由来の LPS において調べたところ、PgLPS 刺激による発現が最も安定していたので以下の研究は PgLPS を用いて行った。

表 2. PgLPS による血管内皮細胞における形態変化

	HUVEC	HAEC
細胞間ギャップ形成	+	+
スフェロイド径変化	±	±
スフェロイド増殖能	±	±

+ : 促進

± : 変化なし

表 2 に示すように細胞間ギャップ形成を観察したところ、PgLPS 刺激で形成促進される傾向が観察された。スフェロイド径やスフェロイド増殖能については PgLPS で明確な変化は認められなかった。

表 3. ROCK 遺伝子のノックダウンの影響

	HUVEC		HAEC	
	mRNA	タンパク質	mRNA	タンパク質
eNOS	±	±	±	±
iNOS	±	±	±	±
ROCK I	-	-	-	-
ROCK II	-	-	-	-

± : 変化なし

- : 抑制

表 3 に ROCK 遺伝子のノックダウンの影響を示した。ROCK 遺伝子の抑制状態では PgLPS の刺激があっても eNOS および iNOS の発現には大きな変化がみられなかった。

表 4. ROCK インヒビターの影響

	HUVEC		HAEC	
	mRNA	タンパク質	mRNA	タンパク質
eNOS	±	±	±	±
iNOS	±	±	±	±
ROCK I	-	-	-	-
ROCK II	-	-	-	-

表 4 に ROCK インヒビターの影響を示した。ROCK 遺伝子の抑制状態では PgLPS の刺激があっても eNOS および iNOS の発現には大きな変化がみられなかった

表 5. メタボリック状態の血管内皮細胞における PgLPS の影響

	高グルコース		酸化 LDL		レジスチン	
	HUVEC	HAEC	HUVEC	HAEC	HUVEC	HAEC
eNOS	±	±	±	±	±	±
iNOS	±	±	±	±	±	±
ROCK	±	±	±	±	±	±
I						
ROCK	±	±	±	±	±	±
II						

表 5 にメタボリック状態の血管内皮細胞における PgLPS の影響を示した。高グルコース、酸化 LDL、あるいはレジスチン存在下での血管内皮細胞に対して PgLPS は ROCK の発現および NOS の発現に対して影響が認められなかった。

【結論】

歯周病関連細菌およびその LPS は血管内皮細胞に対して Rho キナーゼに関連する遺伝子の発現を誘導する可能性が示唆されたものの、歯周病関連細菌および LPS 単独での作用は非常に弱く、再現性もあまり高くなかった。今後、他の因子との協調作用や血管内皮細胞中の他の遺伝子の発現への影響について詳細に解析していく必要がある。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 齋藤俊行、林田秀明、古堅麗子、歯周病が関連する疾患 1 肥満、医学出版、査読無、2 巻、2010、61-69
- ② Furugen R, Hayashida H, Kitamura M, Saito T, Relationship between adipokines and periodontitis. Japanese Dental Science Review, 査読無, 46, 2010, 159-164
- ③ Furugen R, Hayashida H, Yoshii Y, Saito T, Neutrophil-derived resistin releases induced by *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, FEMS Microbiol Lett, 査読有, 321, 2011, 175-181
- ④ Furugen R, Hayashida H, Saito T, *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide causes resistin release from neutrophils, Oral Dis, 査読有, 2012, doi: 10.1111/odi.12027

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hayashida H, Furugen R, Saito T, Release of neutrophil-derived resistin by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010
- ② 古堅麗子、林田秀明、齋藤俊行、歯周病原細菌由来因子によるレジスチン産生機序、第 60 回日本口腔衛生学会総会、松戸、2011
- ③ Furugen R, Hayashida H, Saito T, Resistin release by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis* via NK and MAP kinase pathways, 1st International Congress on Porphyromonasu gingivalis and rerated bacterial speicies, Nagasaki, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林田 秀明 (HAYASHIDA HIDEAKI)
長崎大学・大学病院・講師
研究者番号：20238140

(2) 研究分担者

齋藤 俊行 (SAITO TOSHIYUKI)
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：10170515

古堅 麗子 (FURUGEN REIKO)
長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：90253674