

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792491

研究課題名(和文)動脈硬化発症時の血清アミロイドAの役割

研究課題名(英文)A role of serum amyloid A in atherosclerosis onset.

研究代表者

西田 英作(Nishida, Eisaku)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10512519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化は、炎症反応に起因した血管内皮障害により、単球の遊走因子、接着因子を発現することから始まる。その後、単球、Tリンパ球、好中球などの炎症性細胞が血管壁へ浸潤し、動脈硬化発症の初期段階となる。マウスの歯周組織に歯周病により産生するサイトカインであるIL-6を注入、局所の炎症を惹起させたところ、血中のSAA蛋白上昇を確認した。そこで、ヒト正常血管内皮細胞にSAAタンパクを添加したところ、単球接着因子、遊走因子の遺伝子発現が著明に上昇した。歯周炎が原因で、血中に高濃度SAA存在下の状態が継続することにより、アテローム動脈硬化症が発症する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is a local inflammatory disease, and it has been reported that this disease might affect the onset of atherosclerosis. Recently, it has been reported that the injection of IL-6 to the periodontal tissue increased mRNA level in the liver and the protein level in the peripheral blood of serum amyloid A (SAA) in C57BL/6J mice before. SAA is an acute phase protein that affects for the systemic inflammation. Therefore, we tried to examine whether SAA could be a marker of atherosclerogenesis in vitro (human aortic endothelial cells: HAEC) or not. After the induction of SAA protein in HAEC, adhesion molecules were expressed significantly. So, a state of the high concentration SAA presence to continue in peripheral blood was suggested the possibility of developing atherosclerosis.

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 動脈硬化症 血管内皮細胞 単球遊走因子 単球接着因子

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は、高血圧、高脂血症、糖尿病などの危険因子の存在下で生じた血管内皮障害を契機として、マクロファージを主体とした炎症性反応により、アテロームが形成される。放置すると、血管内腔の狭窄や閉塞をきたし、死に至る疾患である。障害を受けた血管内皮は、単球の走化因子である MCP-1 や、IL-6 などのサイトカイン、ICAM-1、VCAM-1 等の接着因子を発現するようになる。これにより白血球の血管壁への接着が起こり、単球や T リンパ球、好中球などの炎症性細胞が血管壁へ浸潤する。この形成過程は、歯周病の発症、進行と類似していることから、歯周病と動脈硬化症の関連性が注目されている。現在までに歯周病と動脈硬化性疾患の関係に関して多様な相互メカニズムが示唆されており、これらの感染やその後続く炎症・免疫応答による動脈硬化性疾患および心臓血管疾患の発症または増悪が推察されている。

動脈硬化性疾患は、マクロファージを主体とした炎症、免疫応答により動脈硬化病変が形成され、血管内腔の狭窄や閉塞をきたす疾患である。この病変形成過程は、歯周ポケット内で歯周病菌と白血球、マクロファージの間で炎症、免疫応答が惹起され、多くのサイトカインが活性化されることにより歯槽骨吸収を引き起こす歯周病の病因と類似している。このため、病因が炎症、免疫応答である歯周病と動脈硬化症の関係は注目を浴びてきた。

歯周病と動脈硬化の関係は、疫学研究の分野では 1990 年代より報告されている。しかしながら、その発症メカニズムに対する分子生物学的なアプローチによる報告はほとんど無い。さらには、歯周病と動脈硬化を結び付ける因子、その発症に関わる決定的なマーカー分子は見つかっていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

歯周病と動脈硬化性疾患発症の共通メカニズムとして、1) 歯周病菌、あるいは細菌産生物による上皮、内皮細胞に対する直接的障害作用、2) 細菌あるいは細菌産生物による IL-6、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカイン刺激による間接的障害作用、3) LPS あるいは、IL-6、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインの刺激によって肝臓から産生される C 反応タンパクや血清アミロイド A (SAA) タンパク等の急性期タンパクによる間接的障害作用の 3 つの経路が可能性として挙げられる。実際に、歯周病の患者で心冠動脈のバイパス手術を受けた人の血管壁から歯周病原細菌が検出されることが報告されており、別の報告では、動脈硬化易形成マウスである ApoE ノックアウトマウスに歯周病原細菌である

*Porphyromonas gingivalis* を経口感染させることによって、動脈硬化形成促進が確認されている。このように歯周病菌が動脈硬化の形成に関わる報告はあるが、病原細菌が動脈硬化部位に直接作用するだけでなく、それによって生産される炎症性サイトカインの刺激によって動脈硬化発症のメカニズムを解明、マーカー分子を見つけることを目的とする。

これまでに、ApoE ノックアウトマウスの腹腔内に歯周病罹患時に上昇する炎症性サイトカインである IL-6 を投与し、歯周病菌が産生する炎症性サイトカイン刺激を肝臓に与え、擬似的な歯周病を惹起させる研究を行ったところ、肝臓 mRNA、および末梢血タンパクにおいて急性炎症マーカーである血清アミロイド A (以下 SAA) が上昇し、動脈硬化部位が増大することを見出した (未発表)。そのため歯周病における局所の炎症性サイトカインの刺激によって、肝臓より産生される急性炎症マーカーの SAA が間接的にアテロームを形成する経路の存在に注目している。

アテローム性動脈硬化は、血管内皮細胞機能障害に起因する。血管内皮細胞において細胞内 cAMP は、NO、プロスタサイクリン、AT-III、TFPI、TM、tPA を産生し、抗血栓作用を、VCAM-1、E-セレクトリンの発現を抑制し抗白血球接着作用を、HGF の発現を促進し血管保護作用を示す。よって、前述の分子群の制御が機能障害により不能になったとき、アテローム性動脈硬化が発症する。

そこで、本研究は、in vitro における血管内皮細胞において、血管内皮細胞の機能を制御する分子群のどの作用が中心に、歯周病から惹起された炎症性サイトカインの刺激により産生された SAA の刺激によりアテローム性動脈硬化が誘発されるのかを明らかにすることで、SAA が動脈硬化に対していかなる機能的役割を持っているかを予測し、SAA が歯周病と動脈硬化を関連付けるマーカー分子になりうるか否か、検討する。

## 3. 研究の方法

ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) に SAA リコンビナントタンパクを添加し、動脈硬化初期病変にて血管内皮細胞に起こる、単球の接着因子および遊走因子増強に関わる遺伝子発現を確認した。

### ヒト大動脈内皮細胞の培養

ヒト大動脈内皮細胞 (タカラバイオ株式会社) (以下 HAEC とする) を、成長因子を添加した専用培地で 12 穴プレートに各  $5 \times 10^5$  個の細胞で播種、培養した。細胞数はプレ実験を行い、最適な播種濃度を探索した上で、上記の数を決定した。継代数は全ての実験において 7 回に統一し、37 度、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養を行った。コンフルエントになるまで

は中 3 日を要した。

HAEC へ SAA ヒトリコンピナントタンパクの添加

コンフルエントに達した 1 の細胞を、血清無しの専用培地に交換し、human recombinant SAA (R&D 社) をそれぞれ 2.5ug/ml の濃度で添加し実験群とした。また、PBS 添加群をコントロール群とし、24 時間培養を行った。

HAEC における単球接着因子の発現と遊走因子発現確認

2 の細胞から AIIIPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) にて RNA を抽出した。前述したキットは RNA とタンパクを同時に抽出することができるため、本研究において非常に有用であったが、RNA のみを使用した。抽出した RNA は逆転写を行い、cDNA に変換し、リアルタイム PCR 法にて ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 の発現を、SAA 添加群とコントロール群について比較した。

HAEC における SAA receptor の発現確認

の実験系を利用し、過去に報告された 12 種類の SAA receptor に関して発現確認を行い、SAA が血管内皮細胞表面のいかなるレセプターを経路として、単球接着因子、単球遊走因子が発現するか確認した。まずは自身で設計したカスタムプライマーを用いて RT-PCR にてスクリーニングを行い、その後候補のレセプターを、リアルタイム PCR にて再確認した。

#### 4 . 研究成果

コントロールと比較して、HAEC に SAA を添加することにより単球の走化因子である MCP-1、接着因子である ICAM-1、VCAM-1 mRNA は、24 時間以内で約 100 ~ 800 倍の発現上昇を認めた。また、SAA 刺激により、HAEC には炎症性サイトカインである IL-6 mRNA の発現上昇もみられた。加えて、HAEC には SAA mRNA は発現しない、もしくは、ごく短時間で発現がなくなることが予想された。よって、今後はタンパクレベルでの研究が必須であると思われる。

今回の研究ではヒトリコンピナント SAA の濃度を 25ug/ml に設定した。ヒトの SAA 基準範囲は 8ug/ml であるので、基準値をやや越えた状態を継続させる、すなわち慢性炎症状態を再現するためである。SAA は主に肝臓で産生されており、また末梢血単球や血管内皮細胞から産生されているという報告もあるが、今回は HAEC において SAA mRNA の発現は確認できなかった。本研究結果において、HAEC における単球遊走・接着因子は、SAA を添加することによって 100 倍以上の発現量を示したことから、本実験系は生体内基準値の 3 倍強の濃度でも十分に HAEC を

炎症状態、つまり、血管内皮細胞における動脈硬化症の初期状態を in vitro で再現できたことが予想できる。また、この条件で様々な確認、追加実験を行うことも可能であると思われる。

また、HAEC における SAA 刺激下では TLR2 の発現が上昇することが明らかになった。この結果は SAA receptor である TLR2 を介して MyD88 (細胞質内、TLR の下流) NF- $\kappa$ B (核内 TLR の下流) TNF- $\alpha$  (核内から細胞質、細胞外へ放出) E-selectin (細胞外) の経路をたどり、E-selectin の発現増強に関わっていることが示唆される。

以上の結果より、ヒトの HAEC に SAA を添加することによって単球の走化、および接着因子の上昇が確認されたことにより、局所の炎症性疾患である慢性歯周炎が原因となり、血中に高濃度 SAA 存在下状態の継続により、アテローム動脈硬化症が発症す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)

[学会発表](計 4 件)

培養ヒト血管内皮細胞に対する血清アミロイド A (SAA) の効果: 西田英作, 窪川恵太, 高橋弘太郎, 海瀬聖仁, 武藤昭紀, 高橋美穂, 吉成伸夫 日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会(第 6 回), 岐阜, 2011 年 11 月

急性反応性タンパク血清アミロイド A を介した歯周病による動脈硬化症発症の検討各種メラニン色素除去法の比較: 窪川恵太, 西田英作, 武藤昭紀, 海瀬聖仁, 高橋弘太郎, 吉成伸夫 日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会(第 6 回), 岐阜, 2011 年 11 月

血清アミロイド A による動脈硬化症発症の検討: 窪川恵太, 海瀬聖仁, 西田英作, 武藤昭紀, 田口 明, 吉成伸夫 秋季日本歯科保存学会 (第 135 回), 大阪, 2011 年 10 月

Effect of atherosclerogenesis by SAA in ApoE deficient mice: Kubokawa K, Nishida E, Kamijyou H, Taguchi A, Yoshinari N. American academy of periodontology in collaboration with the Japanese society of periodontology. Hawaii, Honolulu. 2010 10 31

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

西田 英作 (Nishida Eisaku)  
愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10512519