

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25862065

研究課題名(和文) 歯周病由来SAAによる動脈硬化発症機序の分子生物学的アプローチ

研究課題名(英文) Molecular biological approach of the arteriosclerosis onset mechanism by SAA derived from periodontal disease

研究代表者

西田 英作(Nishida, Eisaku)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：10512519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病と動脈硬化性疾患のメカニズムを明らかにする基礎的研究として、急性炎症マーカーである血清アミロイドA(以下SAA)に着目し、ヒト大動脈血管内皮細胞(HAEC)を用いて、SAAがHAECにどのような影響をおよぼすかを解析した。その結果、SAAは血管内皮細胞のTLR2を介して炎症性因子の産生を誘導し、その後接着分子の発現を誘導した。また、TLR2下流のMyD88の発現は著変がなかったことから、SAAが作用したTLR2の下流にMyD88非依存経路が存在する可能性が示唆された。以上より、SAAをマーカー分子として用いることにより、歯周病と動脈硬化症発症の関係を明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To reveal the molecular mechanism for periodontitis-induced atherosclerosis, I focused Serum amyloid A (SAA), an acute-phase protein. I investigated how do SAA affect human aortic endothelial cells (HAECs). As a result, SAA induced inflammatory molecules via TLR2, and then SAA also induced adhesion molecules. In addition, only the expression of MYD88 was lower in SAA-stimulated HAECs compared with unstimulated HAECs, it suggested that MyD88-independent pathway via TLR2 could be exist in this cascade. My result suggests that TLR2 may have a critical role to induce adhesion molecules following TLR2 signaling and the leukocyte cascade in SAA-stimulated HAECs. And SAA might be a predictive risk marker for atherosclerosis onset in patients with periodontitis.

研究分野：歯周病学

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

歯周病が虚血性心疾患（アテローム性動脈硬化症による狭心症や心筋梗塞）のリスク因子になることは、1990年代よりペリオドンタルメディスンの分野で多くの報告がなされている。そして横断研究やコホート研究が行われ、それらがメタ分析され、多くのシステマティックレビューが報告されており、いずれも歯周病罹患患者では有意に虚血性心疾患発症リスクが高いとされている。しかしながら、歯周病と虚血性心疾患の関係は、疫学研究の分野以外では報告が少ない上に、分子生物学的にアプローチした報告は少ない。つまり、歯周病と動脈硬化症の結びつきは、マーカー分子も存在せず、現象論で語られているのが現状である。

歯周炎から動脈硬化性疾患発症のメカニズムとして、(1) 歯周病原菌は動脈血管に生じたプラークにおいて検出されることから、歯周病由来の細菌やその菌体物質がダイレクトに作用、(2) 歯周炎患者において病巣歯肉由来の炎症性サイトカインが血中で上昇することから、局所産生された炎症性サイトカインが作用、(3) 歯周炎患者においてCRP値は有意に上昇しているという報告から、肝臓で作られたC反応性タンパク(CRP)などの急性期タンパクが血行を介して到達する作用、という3つの作用経路が考えられる。そして到達したその場で単球や血管内皮細胞を活性化させ、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と考えられる。動脈硬化症の初期には、血管内皮細胞の活性化が起こり、活性化した血管内皮細胞上にはセレクチンやvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)といった接着分子が発現する。接着分子との相互作用により、単球は内皮下へ遊走し、マクロファージに分化する。マクロファージは、酸化LDLを取り込んで泡沫細胞化し、動脈硬化性プラークを形成する。以上の動態から、歯周病がアテローム性動脈硬化症発生初期において大きな影響を与えていることは決定的ではあるが、複雑な経路が絡み合うその分子生物学的な経路は不明である。

ここで申請者が注目したのは細胞接着分子・自然免疫に関与するToll-like receptor (TLR)である。このTLRは2001年以降、動脈硬化症と自然免疫系に関連を示唆する多くの報告がある。例えば、マウスやヒトのアテローム病変プラーク中のマクロファージや血管外膜線維芽細胞にTLR2とTLR4の顕著な発現が認められること、さらにTLR4の遺伝子多型と動脈硬化症の発症リスクに相関関係を認めることなどが報告されている。さらに近年、自然免疫系に作用するTLRのシグナル経路の動脈硬化発症への関与として、TLR4やTLRのアダプター分子である

MyD88のノックアウトマウスでは、アテローム病変形成が抑制される事が報告されており、TLR4やMyD88等のTLRシグナル経路が動脈硬化発症に関与する事が示唆されている。このTLR2とTLR4はSAAレセプターであり、このTLRのMyD88依存経路から続くNF- κ Bが核内から炎症性サイトカインを発現、細胞外に放出することによって血管内皮細胞表面(血管の内腔に向かって)単球接着分子を発現していることが報告されていることから、SAAが動脈硬化発症機序に関与する非常に重要な分子であることが示唆される。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、動脈硬化症易形成マウスである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を投与することで擬似的な歯周病を惹起させ、肝臓に炎症性サイトカインを与える研究を行った。その結果、ApoEノックアウトマウスの肝臓組織の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、動脈硬化症が増大することを見出した(未発表)。さらにはin vitroにおいて、このSAAのリコンビナントタンパクでヒト大動脈血管内皮細胞を刺激したところ、前述した単球接着分子のmRNA発現上昇を確認した(未発表)。現在まで、動脈硬化症発症機序、特に血管内皮細胞は多種多様な経路が報告されているため、本研究は、歯周病由来による肝臓より産生されたSAAが、どのように血管内皮細胞の単球接着分子に作用しているかにフォーカスを当てる、つまり歯周病由来SAAがトリガーとなる動脈硬化症発症機序を詳細に解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養とSAA刺激

ヒト大動脈内皮細胞(Lonza)以下human aortic endothelial cell: HAECとする)を、成長因子を添加した専用培地で6穴プレートに各 1.5×10^5 個の細胞で播種、培養した。継代数は全ての実験において6回に統一し、37度、5%CO₂存在下で培養を行った。コンフルエントに達した細胞を、human recombinant SAA (R&D)をそれぞれ1.5ug/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、0、1、3、6時間培養を行った。

(2) PCR array 解析

コンフルエントに達した細胞からNucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel)にてtotal RNAを抽出した。First-strand cDNAはRT2 First Strand Kit (Qiagen)を推奨方法に従い、合成した。Human Atherosclerosis RT2 Profiler2 PCR Array (PAHS-038Z) (Qiagen)を使用し、SAA刺激

した HAEC の遺伝子発現を ABI 7000 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で解析した。Human Atherosclerosis RT2 Profiler2 PCR Array は 84 の遺伝子を含み、responses to stress, apoptosis, blood coagulation, circulation, adhesion molecules, extracellular molecules, lipid transport and metabolism, cell growth and proliferation のようなカテゴリを動脈硬化に関わる遺伝子を解析することができる。また、この array には 5 つの housekeeping 遺伝子、genomic DNA のコンタミネーションコントロール、3 つの reverse transcription コントロール、3 つのポジティブ PCR コントロールが含まれる。データは web 上にて解析を行った。(http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php).

(3) qPCR 解析

cDNA は 1ug の total RNA から Revetra Ace qPCR Master Mix (Toyobo) を使用して合成した。qPCR はスクリーニングには THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) 使用し、その後の解析には TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystem) を使用した。ABI 7000 Real-Time PCR System で PCR 反応を行った。SYBR Green プライマー (SELS, ABCA1, ABCA7, SCARB1, CD36, TLR2, TLR4, CST3, FPR2, AGER, GAPDH) は Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を使用して合成した。ハウスキーピング遺伝子として SYBR Green 反応では GAPDH を使用した。TaqMan プライマー (TLR2, Hs01872448 s1; MYD88, Hs01573837 g1; NFkB1m Hs00765730 m1; tumor necrosis factor- α (TNF- α), Hs01113624 g1; E-selectin (SELE), Hs00950401 m1) は Life Technology より購入した。Taqman 反応ではハウスキーピング遺伝子として 18S rRNA (4319413E, Applied Biosystems) を使用した。mRNA 発現レベルは以下のように決定した: $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{18S \text{ rRNA}})_{\text{treated group}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{18S \text{ rRNA}})_{\text{control group}}$ (Ct, cycle threshold)。

(4) ノックダウン実験

TLR2 Silencer Select Pre-Designed Small Interfering RNA (siRNA, ASO0ZS41; Life Technology) を Lipofectamine 2000 transfection reagent (Life Technology) の使用指示書に従い HAEC に遺伝子導入した。HAEC は遺伝子導入 24 時間前に 6 穴プレートに 1.5×10^5 cells/well の濃度で播種、siRNA against TLR2 は最終濃度 10 nM で作用させた。siRNA は EBM-2 メディウム内で 24 時間作用させた。新しいメディウムに交

換後、48 時間インキュベートした。HAEC を回収する前に SAA で刺激し、TLR2 ノックダウン効率を qPCR で解析した。Control siRNA は Life Technology から購入し、使用した。

(5) ウェスタンブロッティング

HAEC は氷水下 30 分間、lysis buffer (Bio-Rad)、1ug/mL の protease inhibitors で溶解した。未溶解の細胞は遠心分離 ($14,000 \times g$, 4, 15 分) で除去した。上清は使用するまで -80°C で保存した。サンプルは 30ug ずつ、5 分間熱変性させ、Tris/glycine/SDS buffer (25mM Tris, 250mM glycine, and 0.1% SDS) 中で 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide ゲルに電気泳動した。その後、transfer membranes (Bio-Rad, Richmond, CA) に転写した (100 V, 1.5 h, 4 $^\circ\text{C}$)。5% ミルクを含む TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 中で、ブロッッキングを 2 時間行った。メンブレンは TBST で 3 回洗浄し、TBS 中で anti-TLR2 monoclonal antibody TL2.1 (最終濃度: 1ug/mL; Abcam) と anti- β actin monoclonal antibody (1:1000 希釈; Cell Signaling Technology) 18 時間、4 $^\circ\text{C}$ で反応させた。TBST で 3 回洗浄した後、horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:2000 希釈; Cell Signaling) を二次抗体として用いた。TBST にて 5 回洗浄した後、ECL reagents (GE Healthcare) にてタンパクを確認した。

(6) 統計解析

SPSS software v. 15.0 J for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) を使用し、統計解析を行った。

4. 研究成果

(1) SAA は HAEC において接着関連分子の発現を誘導する

SAA 刺激後の HAEC について、動脈硬化関連遺伝子の発現を Atherosclerosis RT2 Profiler PCR Array を使用して解析した。SAA 刺激前と、刺激後 6 時間の HAEC の遺伝子発現を解析したところ、以下に示す 13 の遺伝子 BIRC3 (baculoviral IAP repeat containing 3), CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2), CCL5 [chemokine (C-C motif) ligand 5], CCR2 [chemokine (C-C motif) receptor 2], CSF2 [colony-stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)], FGA (fibrinogen alpha chain), ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1), IL1A (interleukin 1, alpha), LIF [leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)], NFkB1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1), SELE (E-selectin),

TNFAIP3 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3), VCAM1 (vascular cell adhesion molecule-1) が5倍以上の発現を示した。これらの遺伝子の中で、SAA 刺激下の炎症状態で、ICAM1, VCAM1, SELE が顕著に発現上昇し、中でも SELE は232 倍の発現を示した。

(2) SAA は TLR2 とその下流の単球接着カスケード遺伝子発現を誘導する

SAA 刺激後、0、1、3、6 時間の HAEC の mRNA 発現を確認したところ、TLR2 の mRNA の発現が時間依存的に上昇した。さらには NFKB1、TNF-a、SELE の mRNA は3 時間で顕著に発現上昇していた。SAA 刺激無しの HAEC と比較してもこれらの遺伝子は発現上昇していた。しかしながら、SAA 刺激後と比較して、刺激前の方が MYD88 のみ発現が大きかった。この結果は、SAA は TLR シグナルを介し、その下流の単球接着因子の遺伝子発現を上昇させることが明らかになった。

(3) TLR2 ノックダウンは、単球接着カスケードを介した SELE の発現を抑制する

SAA レセプターである TLR2 の発現を減少させることで、SELE にどのような影響を与えるか検証する為に、HAEC の TLR2 を siRNA を使用してノックダウンを行った。ノックダウンの効率は qPCR とウエスタンブロッティングで確認した。TLR2 をノックダウンしても細胞形態の変化はなかった。TLR2 をノックダウンした HAEC は、コントロール siRNA と比較して劇的に SELE の発現を低下させた。NFKB1 と TNF-a も同様に発現低下した。

(4) まとめ

SAA は血管内皮細胞の TLR2 を介して炎症性因子の産生を誘導し、その後血管内皮表面の接着分子発現を誘導することで単球/マクロファージを集積させる可能性が示唆された。SAA は歯周病と動脈硬化発症の関係を明らかにする有用なマーカー分子になりうる。

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1件)

Serum Amyloid A Promotes E-Selectin Expression via Toll-Like Receptor 2 in Human Aortic Endothelial Cells. Eisaku Nishida, Makoto Aino, Shu-ichiro Kobayashi, Kosuke Okada, Tasuku Ohno, Takeshi Kikuchi, Jun-ichiro Hayashi, Genta Yamamoto, Yoshiaki Hasegawa, Akio Mitani. Mediators of Inflammation 査

読有り Volume 2016 (2016), Article ID 7150509, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7150509>

〔学会発表〕(計1件)

SAA は血管内皮細胞における接着分子の発現を上昇させる 西田 英作、相野 誠、岩村 侑樹、佐々木 康行、林 潤一郎、三谷 章雄 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 2015 年 11 月 16 日、文京シビックホール(東京都文京区)

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・助教

研究者番号：10512519