

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20624

研究課題名(和文) AIMが歯周炎及び全身に与える影響の解析

研究課題名(英文) The effect of AIM for periodontitis and body

研究代表者

守下 昌輝(Morishita, Masaki)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60710522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化巣でマクロファージが産生する新規タンパク質AIMが、歯周炎の臨床マーカーとなる可能性や、歯周炎の歯周組織が産生するAIMが動脈硬化性疾患の増悪因子となる可能性を解明するために実施した。
炎症反応が血管内皮細胞の細胞間接着を障害し、血中の単球が血管内膜に侵入し泡沫化して発症する過程で、Th17細胞が分泌するIL-17Aが細胞接着因子の発現に關与する可能性が示唆されたことからこれに着目した。その結果、IL-17Aは血管内皮細胞と単球の両者に作用し、細胞接着因子の発現上昇を誘導し、動脈硬化の発症・進行に關与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Macrophage made an apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) in the atherosclerotic plaque. AIM that was produced from periodontal tissue in periodontitis has the possible of potential clinical maker detecting periodontitis and inducing factor for atherosclerosis. The purpose of this research is to determine a role for AIM in periodontitis. Inflammation inhibited a cell adhesion in HUVEC. It induced that monocytes in blood recruited into an intima of a blood vessel. In addition, it made a foam cell formation in intima. Recent studies revealed that IL-17A was secreted from Th17 cells in this process related an expression of cell adhesion factors. We focused on a role of IL-17A in this research. The result indicated that IL-17A induced increasing an expression of cell adhesion factors in HUVEC and monocytes, and induced developing atherosclerosis.

研究分野：歯周病学

キーワード：AIM 慢性歯周炎 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

Apoptosis Inhibitor of Macrophage (以下、AIM)は、酸化低比重リポタンパク質を取込んで泡沫化したマクロファージから産生され、動脈硬化巣でマクロファージ自身のアポトーシスを抑制する新規タンパク質として報告された¹⁾。また、肥大化した脂肪細胞中の脂質分解を促進することから肥満の進行を抑制する効果²⁾も報告されており、抗肥満薬の創薬ターゲットとも考えられている。

メタボリックシンドロームは内臓脂肪型肥満に高血糖・高血圧・脂質異常症の3つの内2つ以上を合併した状態と定義されている。高血糖・高血圧・脂質異常症は単独でもリスクファクターであり、合併すると動脈硬化疾患の進行を促進することが知られている。また、メタボリックシンドロームにおいては全身の慢性炎症が指摘されている³⁾。肥満者の脂肪組織において慢性炎症を誘起する分子機構については詳細不明であるが、Pal Dらは遊離脂肪酸による Toll-like Receptor-4 を介した慢性炎症の誘導に関係する可能性がある分子について示している⁴⁾。また、AIMは肥満の状況下で血中濃度が増加し、脂肪組織に直接作用して脂質を分解し、遊離脂肪酸の放出を促進し、マクロファージの浸潤を誘導することで慢性炎症を惹起することが報告されている⁵⁾。従って、その分子機構にAIMが何らかの関与をしている事は明らかである。すなわち、AIMの機能を阻害することで肥満から慢性炎症に至るプロセスを抑制する可能性が考えられる。

歯周炎が糖尿病や肺炎、動脈硬化といった全身疾患の進展に関与していることが示されてきた。すでに肥満と歯周炎が関連することは明らかにされている⁶⁾。しかし肥満と歯周炎の間に存在する分子機構は不明である。歯周炎も肥満と同様に慢性炎症性疾患であり、歯周組織における炎症にAIMが何らかの影響を与えている可能性がある。

歯周炎では、細菌由来のリポ多糖やその他破壊酵素による上皮性付着の破壊や結合組織性付着の破壊が見られる。この組織破壊の病態像は動脈内膜下で基板や結合組織の破壊を伴う動脈硬化と類似している。

AIMはまさに動脈硬化巣において産生されているものであり、歯周炎に罹患した歯周組織中においても歯周病原細菌由来リポ多糖などによって活性化されたマクロファージからAIMが産生されている可能性がある。

歯周炎に罹患した歯周組織に対しては、肥満により全身的に産生されたAIMが作用するのか、または歯周炎に罹患した歯周組織そのもので産生されたAIMが自己に作用するのかは不明である。そのため、AIMの機能を阻害することで慢性炎症である歯周炎を抑制する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

歯周炎と動脈硬化における病態の相似性に着目し、動脈硬化巣でマクロファージから産生される新規タンパク質 Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM)が、歯周炎における臨床マーカーとなる可能性、さらに歯周炎に罹患した歯周組織から産生されるAIMが動脈硬化性疾患の増悪因子となる可能性を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

・対象患者

九州歯科大学附属病院歯周病科を受診した広汎型慢性歯周炎患者及び九州歯科大学附属病院に勤務する教職員・大学院生

・本研究はヒトを対象に行う実験を含むことから、九州歯科大学研究倫理委員会から承認を受けている(承認番号 14-10)。

・臨床研究において患者サンプル(歯肉溝滲出液・血液・唾液)を採取し、AIM濃度をELISAにて測定した。同意を得た患者には、歯周ボ

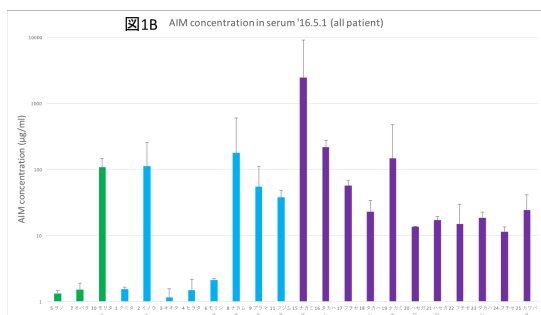
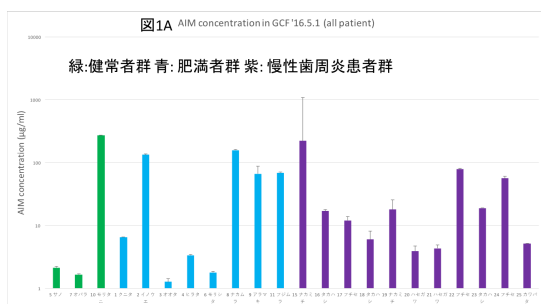
キット診査を実施した。初診、SC 後、SRP 後の歯周基本治療の各フェーズで GCF、唾液、血液採取を実施した。次に、ペーパーストリップスを歯肉溝内へ挿入し 30 秒後に直ちにペリオトロンを用いて、定量化した。全てのペーパーストリップスは計測後、直ちにチューブに入れて、-30 で保管唾液は安静時唾液を 30 秒間計測してチューブに保管し、直ちに-30 で保管。血液は臨床検査技師が採血を行い、直ちに遠心分離して、血清部分のみ抽出し、-30 で保管した。

・ *in vitro* 研究において、ヒト由来マクロファージでの歯周病原細菌 LPS による AIM 産生、及びヒト由来マクロファージと歯周病原細菌生菌の共培養での AIM 産生について ELISA にて検討した。

・ *in vitro* 研究では、ヒト単球細胞 (U937 細胞株) および血管内皮細胞 (HUVEC 細胞株) を用い、接着因子の遺伝子およびタンパク発現について解析した。

4. 研究成果

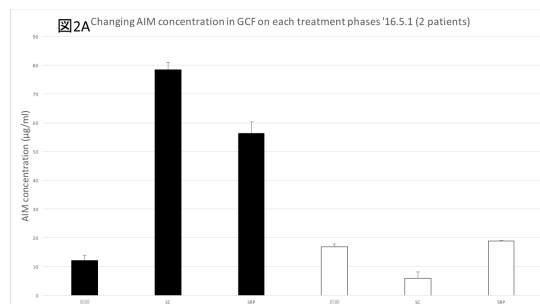
サンプル採取は、歯周基本治療のステージ毎(初診時・スケーリング後、スケーリング・ルートプレーニング後)での AIM 濃度を ELISA にて測定した。その結果、全ての被験者の唾



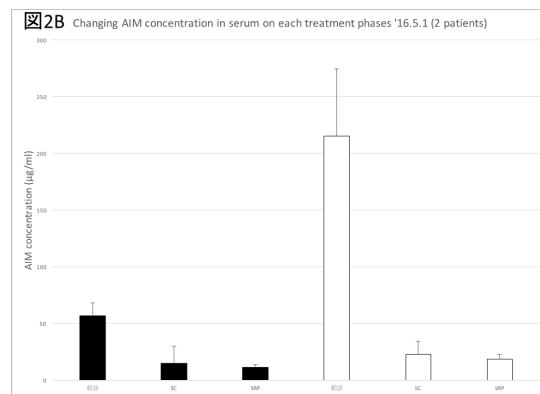
液では AIM が検出できなかった。歯肉溝滲出

液 (図 1A) および血液 (図 1B) 及びでは、AIM を検出することができた。血清中の AIM 濃度は、歯周病患者、肥満者で高値であった。一部の健常者でも高値を認めた。GCF 中の AIM 濃度は、血清と同様に歯周病患者、肥満者で高値であり、一部の健常者でも高値を認めた。肥満を有する広汎型慢性歯周炎患者は 1 名のみで、同様に高値であった。

次に、歯周基本治療のステージ毎の AIM 濃度変化について、計測することにした。歯肉溝滲出液では減少傾向を認めなかった (図 2A) が、血清では治療ステージが進みにつれて、減少傾向を示した (図 2B)。歯肉溝滲出液は、ステージが進むにつれ、液量が減少す



ることが、AIM 濃度が減少傾向を示さない



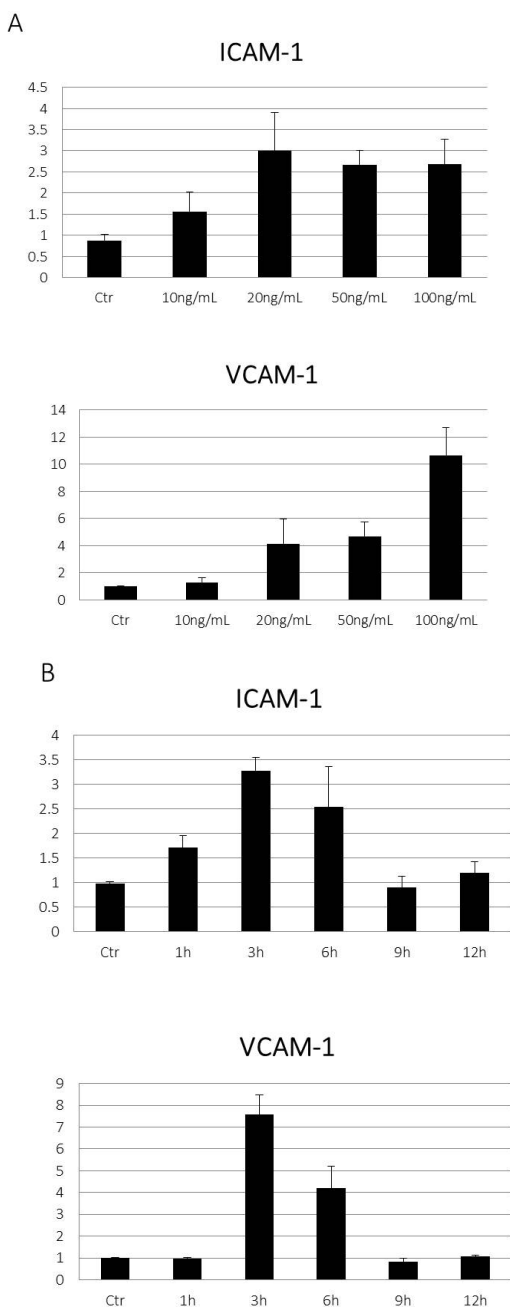
因である可能性が考えられた。

さらに、*Escherichia coli* 由来リポ多糖及び歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来リポ多糖を用いた、ヒト由来マクロファージ THP-1(ヒト単球マクロファージ細胞株) への刺激による AIM 産生について、ELISA キットを用いて検討を行った。マクロファージ細胞株の種類、LPS の濃度(1-100 ng/ml)や刺激時間(0-48 時間)について様々な条件下で、

AIM 産生について解析を繰り返し実施したが、AIM 産生の検出を認めなかった。

さらに、*in vitro*の実験系で、ヒト臍帯静脈内皮細胞株である HUVEC を播種し、IL-17A で刺激を行い、接着因子である ICAM-1、VCAM-1、P-selectin、E-selectin の遺伝子発現およびタンパク発現を RT-PCR 法にて解析した。また、接着因子に結合する単球の接着因子の同定のため、ヒト単球様細胞株である

図 3: IL-17Aによる血管内皮細胞における細胞接着因子の遺伝子発現

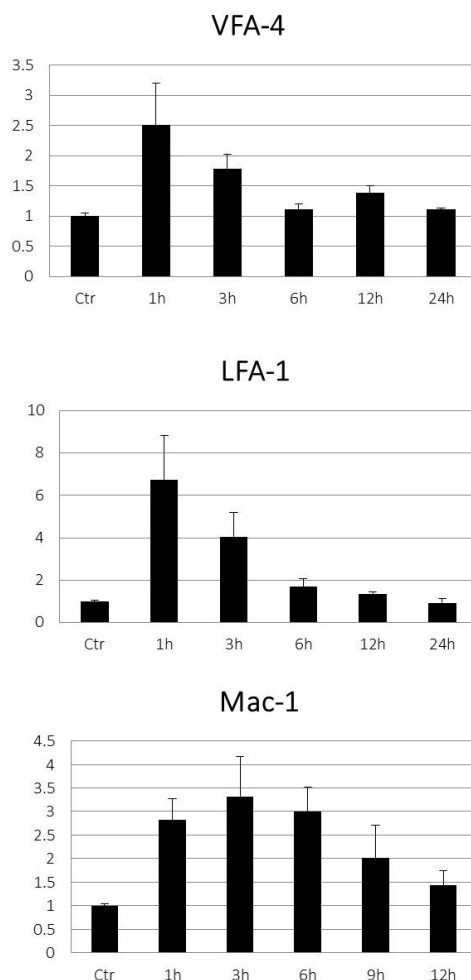


U937 を播種し、IL-17A にて刺激を行い、VLA-4、

LFA-1、Mac-1、についても同様に解析した。HUVEC において ICAM-1、VCAM-1 で IL-17A 刺激による濃度依存的な (図 2A) および経時的な (図 3B) 遺伝子発現の上昇を確認した。

また、U937 においても、IL-17A の添加により VLA-4、LFA-1、Mac-1 の遺伝子発現が亢進することが確認できた (図 4)。なお、PMA 処理を行いマクロファージへの分化誘導を行った U937 に対しても同様に検討したが、接着因子の明らかな発現の上昇は認められなかった。

図 4: IL-17Aによる単球細胞における細胞接着因子の遺伝子発現



ICAM-1、VCAM-1 およびこれに対応する LFA-1、VLA-1 は動脈硬化症の病態形成のうち、特に単球と血管内皮細胞の強固な接着に中心的な役割を果たすことが報告されている。*in vitro*の実験系で、IL-17A が血管内皮細胞および単球細胞表面の接着因子発現を増強することで、単球 血管内皮細胞間の Adhesion

に關与する可能性を見出した。今後、これらのメカニズムにAIMが影響ある因子としてどのように存在するか、詳細な検討を行っていく予定である。

参考文献

- 1) Arai et al., Cell Metabolism 2005; 1(3): 201-213
- 2) Kurokawa et al., Cell Metabolism 2010; 11(6): 479-492
- 3) Hotamisligil GS., Nature 2006; 444(7121): 860-867
- 4) Pal D et al., Nature Medicine 2012; 18(8): 1279-1285
- 5) Kurokawa et al., Cell Metabolism 2010; 11(6): 479-492;
- 6) Saito et al., The New England Journal of Medicine 1998; 339(7): 482-483

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

守下 昌輝 (Morishita Masaki)
九州歯科大学・口腔機能学講座歯周病学分野・助教
研究者番号: 60710522

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中道 郁夫 (Nakamichi Ikuo)

九州歯科大学・健康増進学講座総合内科学講座・講師
研究者番号: 60419570

中島 啓介(Nakashima Keisuke)
九州歯科大学・口腔機能学講座歯周病学分野・教授
研究者番号: 10422924

小原 成将(Obara Shigeyuki)
九州歯科大学・口腔機能学講座歯周病学分野・特別研修員
研究者番号: 70735878

(4)研究協力者

西原 達次(Nishihara Tatsuji)
九州歯科大学・健康増進学講座感染分子生物学分野・教授
研究者番号: 80192251

有吉 渉(Ariyoshi Wataru)
九州歯科大学・健康増進学講座感染分子生物学分野・准教授
研究者番号: 40405551

沖永 敏則(Okinaga Toshinori)
九州歯科大学・健康増進学講座感染分子生物学分野・講師
研究者番号: 60582773