

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11862

研究課題名(和文) 歯周病が高密度リポタンパク質の量と質に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Effect of periodontitis on quantity and quality of high density lipoprotein

研究代表者

林田 秀明 (HAYASHIDA, Hideaki)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：20238140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血中高密度リポタンパク質(HDL)コレステロールレベルは、Porphyromonas gingivalis(Pg)に対する血清IgG抗体価と男性では有意な関連を示したが、女性では関連が認められなかった。これらの結果から、血中HDLコレステロールレベルと歯周病の関連には性差があることが示唆された。HDLのコレステロール搬出能やマクロファージにおけるABCA1とABCG1および血管内皮細胞のVCAM-1の発現にはPgLPSの影響は観察されなかった。HDL機能に対する歯周病菌LPSの影響を無細胞系の機能評価法において、PgLPSは直接的にHDL機能を阻害することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病および歯周病原細菌のHDLの量や質に対する影響を調べることは、歯周病が動脈硬化にどのように関連するのかを明らかにする上では重要である。本研究において血中HDL濃度と歯周病細菌抗体価の関連には性差が認められたこと、および歯周病菌の内毒素がHDL機能を低下させる可能性が示唆されたことは、今後の同様の研究の指針になるものと確信している。

研究成果の概要(英文)：In male, circulating high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels were related to serum IgG antibody to Porphyromonas gingivalis(Pg). In female, circulating HDL cholesterol levels were not related to serum IgG antibody to Pg. These results suggest that there is gender difference in the relationship between circulating HDL cholesterol levels and periodontitis.

PgLPS did not effect on cholesterol efflux of HDL, expression of ABCA1 and ABCG1 on macrophages as well as VCAM-1 on vascular endothelial cells. Effect of PgLPS on HDL function were examined in the analysis of an acellular system. The result suggested that PgLPS directly inhibited HDL function.

研究分野：口腔保健学

キーワード：高密度リポタンパク質 歯周病 LPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 心血管疾患やその発症のリスクとなる糖尿病、高血圧症、脂質異常症、肥満といったメタボリックシンドロームと口腔の関係について、種々の基礎、臨床および疫学的知見が得られている。歯周病は、単に不良な生活習慣の結果として全身疾患と関連するだけではなく、歯周局所の細菌感染およびそれに伴って引き起こされる炎症がこれらの全身疾患の発症、進行に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている(Iacopino and Cutler, J Periodontol, 2000)。また、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, 2006)。さらに、Aaを用いたマウスでの研究では動脈硬化病変の形成が観察されている(Tuomainen et al., Microb Pathog., 2007)。

高密度リポタンパク質(HDL)コレステロールの低下は冠動脈硬化性疾患(CAD)の独立した危険因子であることは、多くの疫学研究および介入試験によって明らかである。HDLの粒子組成は多様でHDLの作用メカニズムは複雑であり、近年HDL亜分画の変化やHDLの機能とCADとの関連が注目されている。HDLの機能としてコレステロールの末梢から肝臓への逆輸送(Reverse Cholesterol Transport:RCT)血管内皮における内皮合成酵素(eNOS)の活性化、血小板の抑制が挙げられ、これらの機能はお互いに関連することが示唆されている(Assanassen C. et al., J Clin Invest, 2005)。

(2) HDL粒子を電荷およびサイズごとに大きく分類すると-1、-2、-3、-4、pre-1の5つの分画に分けられるが、Asztalosらは2次元電気泳動によるHDL亜分画定量法によって、健常者に比べてCAD患者で-1、pre-1-HDLが有意に低値で、-3、pre-1-HDLが有意に高値であることを報告した(Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005)。HDLはミエロペルオキシダーゼ(MPO)、パラオキシナーゼ-1(PON-1)との機能的3量体複合体を形成しているが、MPOとPON-1の平衡が崩れてMPOの働きが強くなると、機能不全HDLとなる(Huang Y et al., J. Clin. Invest., 2013)。また、アテローム性動脈硬化病変から分離されたHDLとその主要な構成蛋白質であるアポリポタンパク質A1(ApoA1)は正常な機能を失っておりMPOによって広範に酸化されていることが報告されている(Huang Y et al., Nature Med, 2014)。ApoA1の72番目のトリプトファンがMPOに酸化されることによって、コレステロール受容体活性の消失および血管内皮細胞に対する強力な炎症促進作用が観察されている。歯周病の進行が血中HDLコレステロールレベルの低下に関連するとの報告は多くみられるが、HDLの機能低下における歯周病の影響に関する研究は国内外において十分ではない。

### 2. 研究の目的

(1) 第1の目的は、歯周病原細菌に対する感染応答がHDLコレステロールの濃度に関連するかについて検討することである。

(2) 第2の目的は、歯周病原細菌由来の生体活性物質がHDLの機能の低下を惹起するかについて検討することである。

(3) 第3の目的は、歯周病原細菌由来の生体活性物質がHDLの機能に関連する分子の発現に影響するかについて検討することである。

### 3. 研究の方法

(1) 歯周病原細菌に対する感染応答とHDLコレステロールの濃度の関連を検討するために、歯周病原細菌の感染応答の指標としてPgを含む4種類の歯周病原細菌の血清IgG抗体価を用いた。血中HDLコレステロールレベルを従属変数とし、歯周病原細菌の血清IgG抗体価を独立変数とした多変量解析を用いて関連の有無について検討した。

(2) マクロファージ細胞膜に存在するABCA1およびABCG1はコレステロール搬出に関与すると考えられている。そこで、マクロファージ中のABCA1およびABCG1の蛋白質発現レベルに及ぼすPgLPSの影響を調べるために、ヒトマクロファージ由来の細胞株THP-1細胞を分化させた後、Pgリポ多糖添加(PgLPS最終濃度1µg/mL)添加、HDL添加およびPgLPS(最終濃度1µg/mL)+HDL添加の3条件で処理した。細胞からmRNAおよび蛋白質を抽出し、ABCA1およびABCG1の遺伝子発現およびタンパク量をPgLPS添加、高密度リポタンパク質(HDL)添加およびPgLPS+HDL添加の3群間で比較を行った。

(3) HDLのコレステロール逆輸送の初期段階であるコレステロール流出におけるPgLPSの影響を調べるために、ヒトマクロファージ由来の細胞株THP-1細胞を標識試薬含有の培地で標識し、Pgリポ多糖添加(PgLPS最終濃度1µg/mL)添加、HDL添加およびPgLPS(最終濃度1µg/mL)+HDL添加の3条件で処理後、コレステロール搬出率を測定し、比較した。ヒトマクロファージ由来のTHP-細胞をアセチルLDL負荷と蛍光標識されたコレステロール添加によって泡沫化した。次に、LXRアゴニスト処理し、細胞上清を添加し、反応後の上清中の蛍光強度を比較した。

(4) 単球やマクロファージ等の細胞を使用しない無細胞系の HDL 機能測定系の系を用いて、PgLPS 存在下での HDL の構成成分である ApoA1 にコレステロールが取り込まれる反応を濃度依存的に阻害するかについて解析を行った。PgLPS はリポ蛋白質除去 (LPS-PG UltraPure) および非除去 (LPS-PG Standard) の 2 種類を用いた。コレステロール取り込み反応は、磁性粒子上への ApoA1 の捕捉、コレステロールの酵素標識化、シグナル検出のスキームで実施した。

(5) HDL の抗炎症能に対する影響を調べるために、PgLPS 添加(最終濃度 1 µg/mL)、高密度リポタンパク質 (HDL) 添加および PgLPS(最終濃度 1 µg/mL) + HDL の 3 群で比較した。それぞれの群は HUVEC の培養上清に添加した後、培養した。腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$  で刺激後、HUVEC を回収し、抽出した mRNA を用いて、単球の接着を誘導する細胞接着因子 VCAM-1 の発現を定量的 RT-PCR 法にて測定し、HDL の VCAM-1 の発現に対する抑制度を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 歯周病原細菌に対する感染応答と HDL コレステロールの濃度の関連

血中脂質は HDL コレステロールのほか、中性脂肪、低密度リポ蛋白質コレステロールと関連していた。歯周病の程度を表す 3 つの指標である歯周ポケット深さ、クリニカルアタッチメントレベル、プロービング時の出血、歯周病細菌の感染に対する宿主の抵抗性を表す歯周病原細菌 Pg に対する血清抗体価、年齢、肥満度、中性脂肪、血圧および喫煙習慣等の背景因子を解析したところ、HDL コレステロールと血清抗 PgIgG 抗体価は男性において有意な関連を示した。(表 1)

表1 血中の抗PgIgG抗体価とHDLコレステロールの関連

	回帰係数	信頼区間	調整後決定係数	P値
モデル1	-0.087	-0.17 ~ -0.01	0.03	0.037
モデル2	-0.089	-0.17 ~ -0.01	0.13	0.025
モデル3	-0.100	-0.17 ~ -0.01	0.39	0.004

独立変数

モデル1: 抗PgIgG抗体価

モデル2: 抗PgIgG抗体価、年、BMI

モデル3: 抗PgIgG抗体価、年、BMI、中性脂肪、HbA1c、収縮期血圧、脂質代謝異常薬、アルコール摂取

##### (2) ABCA1 および ABCG1 の発現における PgLPS の影響

LPS 添加、HDL 添加および PgLPS + HDL 添加の 3 群で ABCA1 および ABCG1 の遺伝子発現レベルに有意な差は認められなかった。一方、ABCA1 および ABCG1 のタンパク量は HDL 添加と比較して PgLPS 添加および PgLPS + HDL 添加された群では、タンパク量が低下傾向であった。(図 1)

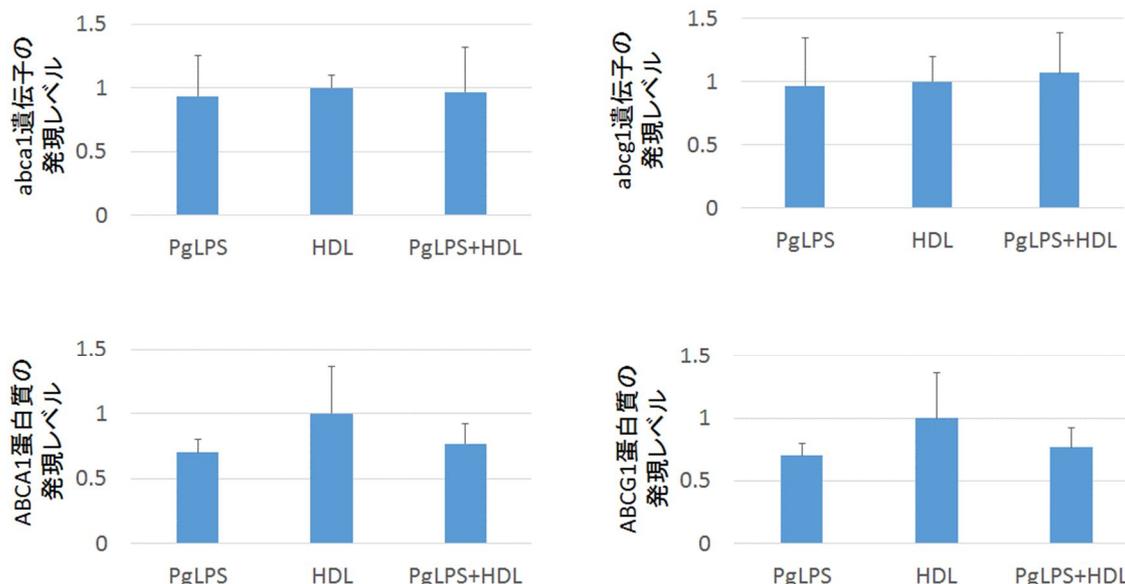


図1 ABCA1およびABCG1の発現におけるPgLPSの影響 (HDL群との比、平均値±標準偏差、n=3)

##### (3) HDL のコレステロール搬出における PgLPS の影響

PgLPS 添加、高密度リポタンパク質 (HDL) 添加および PgLPS + HDL 添加の 3 群間で、コレステロール搬出率を比較した。HDL 添加および PgLPS + HDL 添加群では同等のコレステロール搬出率が観察されたが、LPS 添加のみではコレステロール搬出がほとんど観察されなかった。(図 2)

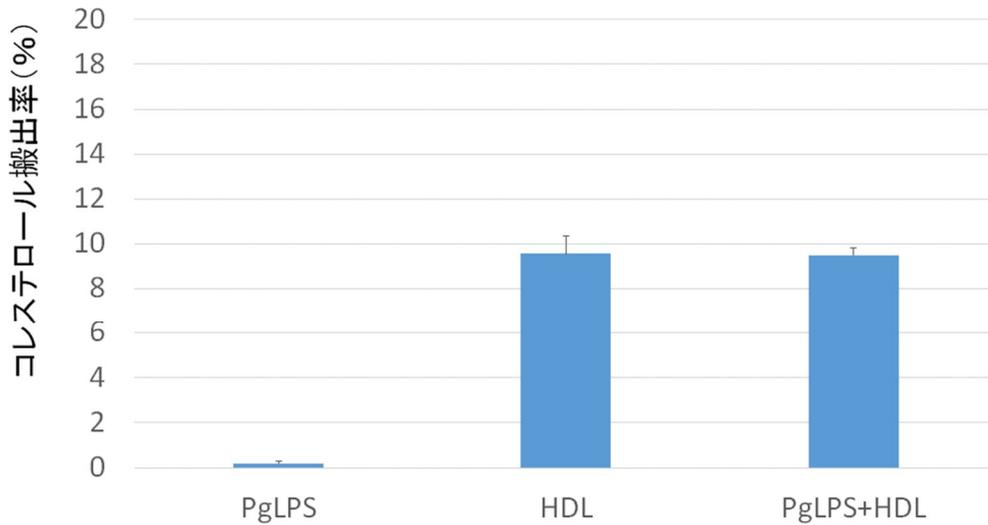


図2 HDLのコレステロール搬出におけるPgLPSの影響  
(平均値±標準偏差、n=3)

(4) 無細胞系 HDL 機能測定系のコレステロール取込反応における PgLPS の影響  
PgLPS UltraPure および PgLPS Standard は対照の未処理群と比較してコレステロールの低下がみられた。しかしながら、PgLPS Ultrapure および PgLPS Standard は同程度のコレステロール取り込みがみられたことから Pg 由来のリポプロテインの影響は少ないと考えられた。また、PgLPS の濃度依存的な取り込み活性の変化は大きくなかった。(図3)

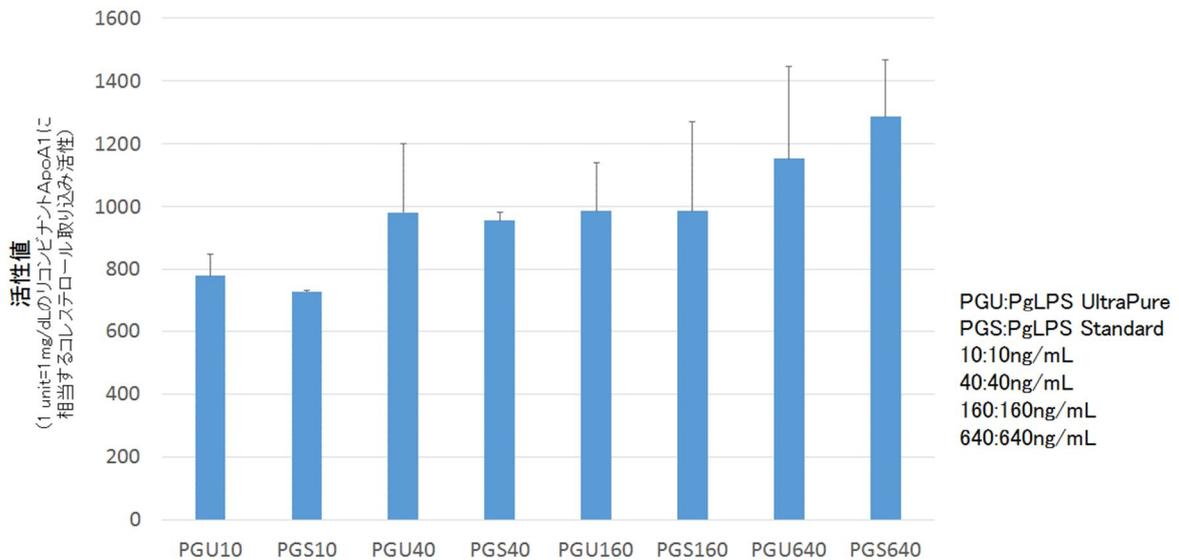


図3 取り込み活性におけるPgLPSの影響(平均値±標準偏差、n=3)

(5) HDL の抗炎症能における PgLPS の影響  
LPS 添加、HDL 添加および PgLPS + HDL 添加の 3 群で HUVEC の細胞接着因子 VCAM-1 の発現量を測定したが、PgLPS による VCAM-1 の発現量の抑制はほとんど認められなかった。(図4)

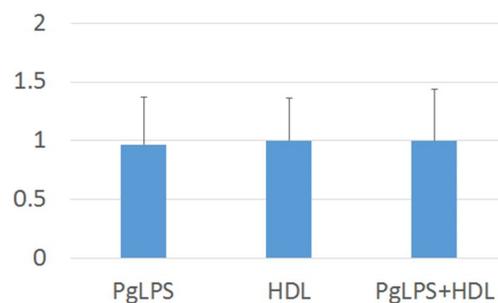


図4 VCAM-1遺伝子の発現レベル  
(HDL群との比、平均値±標準偏差、n=3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furugen Reiko, Hayashida Hideaki, Kawasaki Koji, Kitamura Masayasu, Iwasaki Takahiro, Saito Toshiyuki, Maeda Takahiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Association of the Serum IgG level Against Periodontal Bacteria with Periodontal Status and Serum Lipid Levels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Men's Health	6. 最初と最後の頁 e11 ~ e17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.22374/1875-6859.14.4.3">https://doi.org/10.22374/1875-6859.14.4.3</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 齋藤 俊行、林田 秀明、古堅 麗子	4. 巻 10
2. 論文標題 歯周病があると糖尿病になりやすいのか 疫学的研究成果から	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 月刊糖尿病	6. 最初と最後の頁 31 ~ 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 俊行 (SAITO Toshiyuki) (10170515)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授  (17301)	
研究分担者	古堅 麗子 (FURUGEN Reiko) (90253674)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教  (17301)	