

令和元年6月19日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20682

研究課題名(和文) 歯周病と動脈硬化の進展に関する検討

研究課題名(英文) Study on the progress of periodontal disease and arteriosclerosis

研究代表者

宮部 愛 (Miyabe, Megumi)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70734929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病が動脈硬化に関与する詳細なメカニズムの解明を目的に、lipopolysaharide (LPS)のヒト大動脈平滑筋細胞(HASMC)の増殖・遊走に対する影響を検討した。LPSのHASMCの増殖促進作用についてMTT assay及びBrdU assayを用いて確認し、toll like receptor4 (TRL4)のノックダウンがLPS刺激によるHASMCの増殖を抑制する事、LPS刺激によるHASMCの増殖にはTLR4/ERKの経路が関与していることを明らかにした。またHASMCの遊走について検討したところ、TLR4のノックダウンでLPS刺激によるHASMCの遊走は有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血性心疾患、脳卒中など心血管疾患発症には動脈硬化が深く関与するが、動脈硬化の発生・進展には種々の危険因子が複雑に絡み合っている。危険因子として、歯周病等感染症も注目されているが、その詳細については一定の見解が得られていない。歯周病患者には、虚血性心疾患の罹患率が高いといった疫学研究が報告されているが、否定的な結果も散見される。本研究の成果より、歯周病原細菌やその産生物が直接動脈硬化を進展させる可能性が示唆された。すなわち、歯周病の予防・治療が、動脈硬化の発生・進展を抑制し、心血管疾患発症を低減させることとなり、国の施策としても掲げられている健康寿命の延伸にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that effects of lipopolysaharide (LPS) on regulation of human aortic smooth muscle cells (HASMCs) proliferation. Levels of DNA synthesis in HASMCs were measured by BrdU incorporation assay, and increase in the number of HASMCs were assessed by MTT-based assay. Then, we focused on toll like receptor 4 (TLR4), which was knocked down using siRNA technique. After knocking down of TRL4, LPS-stimulated proliferation of HASMCs was significantly suppressed. We also observed that LPS stimulated the migration of HASMCs, which was inhibited by the knockdown of TLR4. Furthermore, we confirmed using Western blotting that LPS stimulated the proliferation HASMCs through activation of ERK and TLR4 pathway.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 血管リモデリング 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 1999年、Rossは動脈硬化の形成に炎症が関連すると報告し、心血管系疾患のメカニズムの解明に新たな方向性をもたらした(Ross. N Engl J Med 340:115-26,1999)。慢性炎症性疾患の1つである歯周病は、アテローム性動脈硬化と相関関係があることが示唆されている(Beck et al. Atheroscler Thromb Vasc Biol 21:1816-22,2001)。これまでに歯周病と動脈硬化に関する多くの研究が報告されているが、歯周病が動脈硬化に関与する詳細なメカニズムについては一定の見解が得られていない。

(2) 申請者は、これまで血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞の増殖、遊走と新生内膜形成の機序について研究し、骨格筋由来分泌蛋白であるFstl1が部分的にはAMPKシグナルを介して内膜増殖を抑制することを明らかにした(Miyabe et al. Cardiovasc Res 103:111-20,2014)。また、われわれは、動脈硬化や糖尿病と歯周病との関連について研究を実施しており、これまでに実験的歯周炎惹起モデルを用いて糖尿病ラットでは正常ラットと比較し、歯肉における炎症反応が増強すること、その機序の一つとしてニトロ化ストレスの関与が考えられること(Nishikawa et al. J Clin Periodontol 39:342-9,2012)を明らかにした。また歯周炎は、局所で活性化した単球・マクロファージの血管内皮細胞への接着を介してNF- κ Bの活性化とVCAM-1の発現を増加させることを明らかにした(Miyajima et al. Sci Rep 4:5171,2014)。さらに申請者の予備実験において、新生内膜中に炎症細胞が観察されていることから、血管内膜増殖は炎症の影響を受けており、慢性炎症性疾患である歯周炎が、アテローム性動脈硬化の進展に影響を与えると考えた。

2. 研究の目的

近年、炎症に関連するサイトカインが互いに複雑に影響し合い、様々な病態を引き起こす誘因となりうることが示唆されている。歯周病は、口腔内の細菌感染に起因する慢性炎症であり、冠動脈疾患の進行に関与する可能性が示唆されている(Berent et al. Metabolism 64:2371-80,2011)。しかし、生体における歯周病の動脈硬化への関与についての詳細なメカニズムは未だ明らかではなく、その解明は動脈硬化の治療法及び新たな予防法の開発につながると考えられる。

本研究の目的は歯周病が動脈硬化に及ぼす影響とその機序を解明し、歯周病の予防や治療が心血管疾患の進展の抑制に有用である事を明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) lipopolysaccharide(LPS)刺激によるヒト大動脈平滑筋細胞(HASMC)の増殖についての検討: HASMCを用いて培養実験を行い、LPSの刺激による影響を観察した。用いたLPSは体内(腸管内)、口腔内に常在する菌である大腸菌(E. coli)由来を用いた。細胞増殖はMTT assayとBrdU assayを用いて評価を行った。

2) LPS刺激によるHASMCの遊走能についての検討: 培養HASMCを用いてLPS刺激による遊走能について遊走はscratch-wound assayを用いて検討した。

3) Western blot法を用いたHASMCの増殖メカニズムについての検討: HASMCの増殖のメカニズムについて、そのシグナルをWestern blot法を用いて検討した。

4) toll like receptor 4 (TLR4) ノックダウン後のHASMCの増殖についての検討: LPSのレセプターであるTLR4に着目し、TLR4をノックダウンしてHASMCのLPS刺激による増殖について検討した。

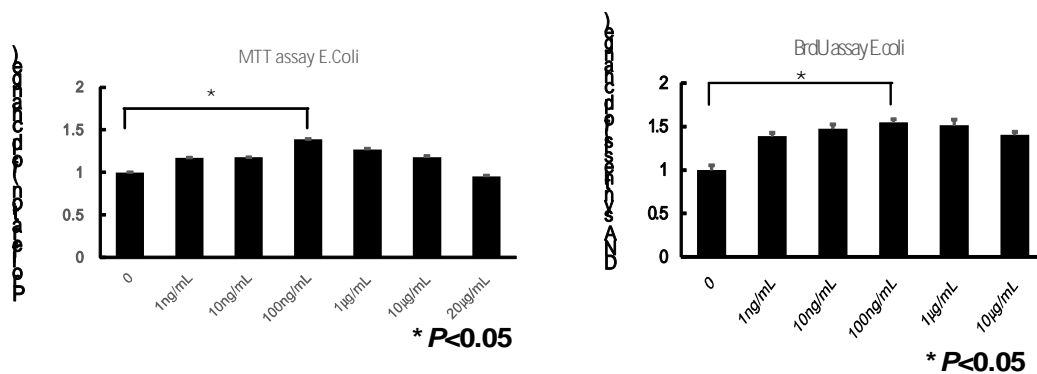
5) TLR4 ノックダウン後のHASMCの遊走能についての検討: TLR4をノックダウンしてHASMCのLPS刺激による遊走能について検討した。

6) Western blot法を用いたTLR4 ノックダウン後のHASMCの増殖メカニズムについての検討: TLR4をノックダウンしてHASMCの増殖に係るシグナルについてその変化を検討した。

4. 研究成果

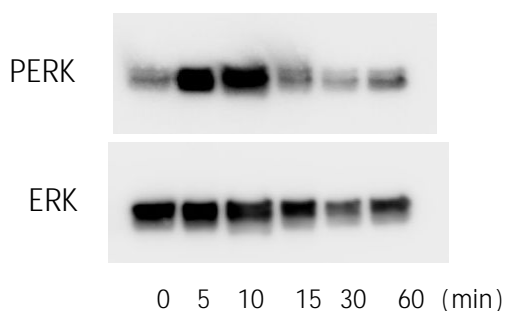
1) 血管リモデリングにおいては血管平滑筋の増殖と遊走が重要な要素であることから、培養 HASMC を用いて LPS 刺激を行う事により、HASMC の増殖が促進するかについて検討を行った。その結果、HASMC は一定の濃度までは LPS の濃度依存性に増殖が促されることが明らかになった。(図 1)

2) 1)の検討で得た最も HASMC の増殖が認められる LPS の濃度において、LPS 刺激による HASMC の遊走について検討を行った。その結果、LPS 刺激によって HASMC の遊走が対照群に比較して 1.4 倍程度で有意に促進されることが明らかとなった。

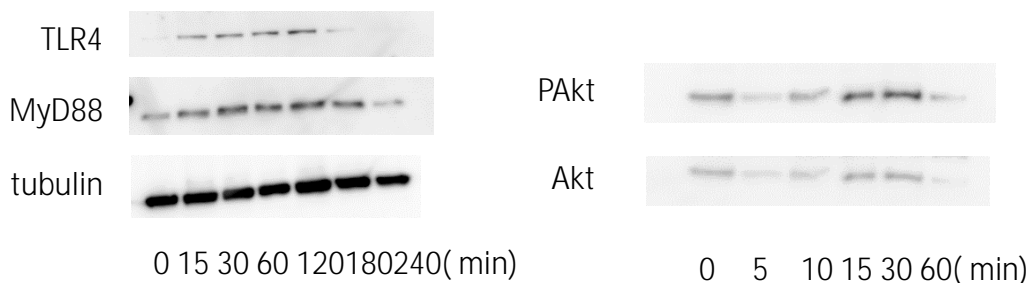


(図 1)

3) HASMC の増殖には ERK の経路が重要であることから、LPS の刺激による HASMC の増殖にこの経路が関与しているかを Western blot 法を用いて検討を行ったところ、LPS 刺激から 10 分後に ERK のリン酸化がピークに達することが明らかとなった(図 2)。また、LPS は TLR4 を介して作用することから、HASMC の TLR4 やその下流の経路、及び Akt の経路についても同様に検討を行ったところ、TLR4 とその下流の MyD88 では刺激後 120 分で反応が最大となり、Akt は刺激後 30 分でリン酸化がピークとなること明らかとなった。(図 3)

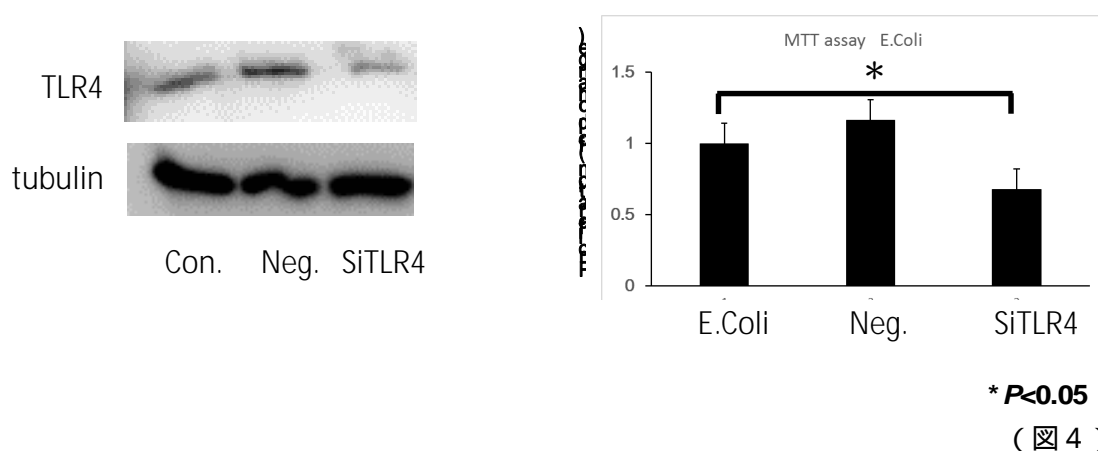


(図 2)



(図 3)

4) LPS のレセプターである TLR4 をノックダウンした場合の HASMC の増殖について検討を行った。TLR4 のノックダウンによって、LPS 刺激による HASMC の増殖が有意に抑制されることが明らかとなり、LPS 刺激による HASMC の増殖効果は TLR4 を介していると考えられた。(図 4)



5) TLR4 をノックダウンした場合の HASMC の遊走能について検討した。TLR4 のノックダウンにより LPS 刺激による HASMC の遊走は 0.8 倍程度に有意に抑制され、LPS の HASMC 遊走効果は TLR4 を介することが示唆された。

6) 現在 HASMC における LPS 刺激による増殖・遊走効果における TLR4 の経路の下流のシグナルについて検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Nakamura N, Naruse K, Kobayashi Y, Miyabe M, Saiki T, Enomoto A, Takahashi M, Matsubara T. Chemerin promotes angiogenesis in vivo. *Physiol Rep*. 査読有、2018.6. e13962-
- Adachi K, Miyajima S, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Nishikawa T, Suzuki Y, Kikuchi T, Kobayashi S, Saiki T, Mizutani M, Ohno N, Noguchi T, Mitani A, Matsubara T, Naruse K. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the pathogenesis of periodontitis in diabetes. *J Clin Periodontol*. 査読有、2017. 44:971-980
- Suzuki Y, Nakamura N, Miyabe M, Nishikawa T, Miyajima S, Adachi K, Mizutani M, Kikuchi T, Miyazawa K, Goto S, Tsukiyama K, Yamada Y, Ohno N, Noguchi T, Mitani A, Matsubara T, Naruse K. Anti-inflammatory role of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in periodontitis. *J Diabetes Investig*. 査読有、2016.7:497-505

〔学会発表〕(計 3 件)

- 中村信久、成瀬桂子、宮部愛、伊藤瑞穂、松原達昭
Chemerin の血管形成作用と Chemerin 受容体の同定、2018 年、第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会
- Makino E, Nakamura N, Miyabe M, Ito M, Kanada S, Hata M, Saiki T, Kamiya H, Nakamura J, Miyazawa K, Goto S, Matsubara T, Naruse K.
Mechanisms of Therapeutic Effects of Conditioned media from cultured dental pulp stem cells on diabetic polyneuropathy, 2018, American Diabetes Association, 77th Scientific Sessions (Orlando)
- Naruse K, Makino E, Hata M, Omi M, Nakamura N, Miyabe M, Saiki T, Sango K, Himeno T, Kamiya H, Nakamura J, Miyazawa K, Goto S, Matsubara T.
Therapeutic effects of conditioned media from cultured dental pulp stem cells in diabetic polyneuropathy. 2017, American Diabetes Association, 77th Scientific Sessions (San Diego)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。