

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09914

研究課題名(和文) 歯周病による動脈硬化発症におけるアディポカインとマクロファージの相互作用解析

研究課題名(英文) Analysis of the interaction between adipokines and macrophages in the development of atherosclerosis caused by periodontal disease.

研究代表者

古堅 麗子 (Furugen, Reiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：90253674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化のうち粥状硬化症の発症は、ヒト血管内皮細胞への単球の接着が関連する。ヒト臍帯静脈内皮細胞を歯周病原細菌由来LPSやTNF- α などの炎症性サイトカインで刺激し、単球様、好中球様、マクロファージ様の細胞に分化させたHL60細胞を用いて、その後の接着度や各種アディポカインとの共存下での影響などを確認するためのモデル作成を試みた。このモデルにおいて、歯周病原細菌由来LPSや炎症性サイトカインにより、各種アディポカインと接着因子の発現増加が認められ、歯周病が動脈硬化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は歯肉における慢性炎症であるが、血流などにより全身の健康にも影響を与えていることが報告されている。とりわけ、糖尿病についてはエビデンスとして確立されているが、動脈硬化との関連については、確立されていない。本研究では、動脈硬化発症モデルとして内皮細胞とマクロファージの共培養システムを作成し、歯周病が動脈硬化に与えるメカニズムの解析を試みた。結果、歯周病における炎症性因子と肥満に関わる因子が動脈硬化発症に相加的に影響を与える可能性があることから、歯を失うことを防ぐだけでなく、動脈硬化の発症予防のためにも、歯周病予防や重症化抑制が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Atherosclerosis is associated with adhesion of monocytes to human vascular endothelial cells. We attempted to create a model in which human umbilical vein endothelial cells are stimulated with inflammatory cytokines such as LPS and TNF- α derived from periodontopathogenic bacteria, and HL60 cells are differentiated into monocyte-like, neutrophil-like, and macrophage-like cells to confirm the subsequent adhesion degree and effects in the presence of various adipokines. In this model, the expression of various adipokines and adhesion factors was increased by LPS and inflammatory cytokines derived from periodontopathogenic bacteria, suggesting that periodontal disease may be affecting atherosclerosis.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：歯周病 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周ポケット内のバイオフィルムが主因となり、宿主の免疫応答とも関連しながら最終的には骨吸収に至る局所の慢性的な炎症性疾患であるが、糖尿病と歯周病が相互に増悪因子となるなど全身疾患との関連が注目されている。歯周病が全身に及ぼす影響について、疫学調査においてメタボリックシンドロームと関連する項目が多いほど歯周病のリスクが高いことが明らかとなっている。脂肪細胞から産生される生理活性タンパク質は、アディポカイン(アディポサイトカイン)と総称され、これら TNF- α や IL-6、アディポネクチン、レプチンなどは、炎症や免疫応答と強く関連することが報告されている。歯周病患者血清レベルの解析により、アディポカインの一種であるアディポネクチンは低い傾向にあり、一方レジスチンや PAI-1 は、高いことを確認し、アディポカインが歯周病の病態において、関連することが示唆されている。

また、LPS は、ごく微量でも脂肪組織や肝臓における代謝に影響を及ぼすことが報告されており、血管系においても影響を及ぼしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

歯周病と動脈硬化の関連については、動脈硬化の病巣から様々な歯周病原菌が検出されたことと歯周ポケットが 4 mm 以上の部位が 4 か所以上の場合で、動脈硬化の病巣からの歯周病原菌の検出割合が高くなる報告があることから、歯周病が重度になるほど、動脈硬化と関連する可能性が高くなることが予測される。歯周病菌が歯肉から血管内に入り、歯周病原菌が産生する内毒素(LPS)や炎症性生体物質であるサイトカイン、アディポカインが原因となり、血管に炎症や血栓を形成するようになり、動脈硬化を進行させると考えられているが、歯周病と関連するメカニズムは明らかではない。動脈硬化のうち粥状硬化症の発症の最初のステップは、障害を受けたヒト血管内皮細胞へ単球が接着しやすくなることである。次にマクロファージ化した細胞は、酸化 LDL を取り込み、泡沫細胞となり、粥状物質に変化していく。この過程で、歯周病原菌由来 LPS により産生されるサイトカインやアディポカインが、その作用を促進していると予測されるため、様々な観点から影響を与えるかどうかについて解析することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) マクロファージ化した THP-1 細胞において、歯周病原菌由来 LPS や大腸菌由来 LPS を様々な培養時間や濃度で培養後の培養上清中の様々なサイトカインやアディポカイン量を ELISA 法で測定した。
- (2) 使用した各々の条件下の細胞より RNA を抽出し、real-time PCR 法にて、様々なサイトカインやアディポカインの mRNA 量を定量し、比較した。
- (3) JNK や MAPK の抗体作用後に LPS を添加し、様々なサイトカインやアディポカイン量および mRNA レベルでの発現量を比較した。
- (4) マクロファージ化した THP-1 細胞に LPS や TNF- α などで刺激後、フローサイトメトリーを用い、蛍光ビーズ貪食細胞比率により貪食能の変化を、AnnexinV-FITC を用いて、アポトーシス/細胞死比率を測定し、接着因子(ICAM-1, VCAM-1, P-selectin) 発現と細胞形態の変化を確認した。
- (5) ヒト臍帯静脈内皮細胞を歯周病原菌由来 LPS や TNF- α などの炎症性サイトカインで刺激し、HL60 細胞を培養後の接着細胞数を測定した。この際、HL60 細胞に前処理して単球系、好中球系、マクロファージ兼の細胞に分化させた HL60 細胞を用いて、その後の接着度や脂肪細胞からの因子である各種アディポカインとの共存下での影響などを確認し、歯周病による炎症と各種アディポカインとの関連を推測するモデル作成を試みた。

4. 研究成果

マクロファージ化 THP-1 細胞について

LPS 刺激後のアポトーシス細胞の割合については、LPS 濃度による違いはほとんど認めず、また高血糖培地で培養した場合にも、有意な違いを認めなかった。各種シグナル伝達抑制剤処理の有無で比較したところ、MEK, p38MAPK ではほとんど抑制が認められず、JNK 抑制剤で減少が認められた。

RA 処理しマクロファージ化したヒト U937 細胞を各種 LPS で刺激後の mRNA 発現量の違いについては、レジスチンの発現量は減少したが、TNF- α では、歯周病原菌由来 LPS では 2 倍ほど、大腸菌由来 LPS でも 1.2 倍ほどの発現量の増加を認め、MCP-1 の発現量はさらに増加が認められた。

HL60 細胞について

DMSO 処理し、好中球化した HL60 細胞において LPS 刺激後の細胞を用いた mRNA レベルでの解析の結果、歯周病原菌由来 LPS でも大腸菌由来 LPS でもレジスチンや TNF- α の発現量の増加を認めたが、同じ濃度で刺激した場合、歯周病原菌由来 LPS では大腸菌由来 LPS で刺激した場合の

6割ほどにとどまった。MCP-1では、大腸菌由来 LPS では10倍ほど多い発現量を認め、LPSの種類により、サイトカインやアディポカインへの影響が異なることが示唆された。

血管内皮細胞への接着性について

歯周病原菌由来 LPS でも大腸菌由来 LPS でも、LPS の刺激により接着性の増加を認め、また、ICAM-1 などの接着因子の発現増加も認めたため、歯周病の局所のあまり強くはない炎症ではあるが、LPS および各種サイトカインやアディポカインの産生により、動脈硬化の最初のステップでの接着に影響があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Reiko Furugen, Koji Kawasaki, Masayasu Kitamura, Takahiro Maeda, Toshiyuki Saito, Hideaki Hayashida	4. 巻 62
2. 論文標題 Association of low fetuin-A levels with periodontitis in community-dwelling adults	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 67-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.18-0282	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 該当する

1. 著者名 Iwasaki, T., Fukuda, H., Kitamura, M., Kawashita, Y., Hayashida, H., Furugen, R., Koyama, Z., Ando, Y., Saito, T.,	4. 巻 107
2. 論文標題 Association between number of pairs of opposing posterior teeth, metabolic syndrome, and obesity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Odontology,	6. 最初と最後の頁 111-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10266-018-0386-x.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田英輝、北村雅保、川崎浩二、林田秀明、古堅麗子、岩崎理浩、田代謙輔、前田隆浩、五月女さき子、川下由美子、齋藤俊行
2. 発表標題 地域住民における歯間ブラシの使用状況と歯周疾患との関連：五島研究
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代謙輔、五月女さき子、船原まどか、川下由美子、北村雅保、福田英輝、古堅麗子、岩崎理浩、林田秀明、川崎浩二、東 美穂、前田隆浩、齋藤俊行
2. 発表標題 地域住民を対象とした舌圧と口腔および全身健康状態との関連性：五島研究
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2021年

〔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	林田 秀明 (Hayashida Hideaki) (20238140)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------