

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592426

研究課題名(和文) 歯周炎と動脈硬化性疾患の生物学的関連を解明する一インターフェースとなるエイジング

研究課題名(英文) Biologic pathways for the relationship between periodontitis and cardiovascular disease

研究代表者

多部田 康一 (TABETA KOICHI)

新潟大学 研究推進機構

研究者番号：20401763

研究成果の概要(和文)：

歯周炎マウスモデルを用いた解析においては、*P. gingivalis*の口腔内感染が全身的な炎症応答を誘導し、動脈組織における遺伝子発現の変化に加え、血清脂質の動脈硬化症リスクを高める方向への変動も誘導することが示された。動脈硬化性疾患と口腔感染の関連メカニズムとして、口腔感染が脂質代謝変動に寄与する新しい知見が得られた。またエイジングとの関連について検討を継続している。

研究成果の概要(英文)：Periodontal infection itself does not cause atherosclerosis, but it accelerates it by inducing systemic inflammation and deteriorating lipid metabolism, particularly when underlying hyperlipidemia or susceptibility to hyperlipidemia exists, and it may contribute to the development of coronary heart disease. Further study is undertaken related to aging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎、*Porphyromonas gingivalis*、エイジング、動脈硬化症、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景  
心血管系疾患の原因である動脈硬化症は単純なコレステロールの動脈壁への沈着によ

り生ずるのではなく、その発症・進行は単球・リンパ球の浸潤とそれらが産生するサイトカインなどによる炎症反応として捉えら

れるようになってきている。炎症反応の誘発・増悪因子として *Chlamydia pneumoniae* などの微生物感染の関与する可能性も報告されており、歯周病原細菌感染も動脈硬化症のリスクを高める Infectious burden の一つとしてその重要性が認識されてきている。歯周炎は一連の歯周病原細菌による感染症であり歯を支える結合組織と歯槽骨の慢性炎症による破壊を特徴とする疾患である。その組織破壊のメカニズムにおいては細菌の産生する組織破壊性の因子の他に、宿主の免疫応答による炎症性反応が中心的役割を果たしていると考えられている。歯周炎の発症や組織破壊の程度は、細菌量や細菌種と必ずしも一致するものでなく、宿主の感受性に大きく影響される。この感受性は遺伝的因子や加齢因子による宿主個体の応答性の違いによるものと考えられるが、歯周炎の発症や重症度を規定する因子は明確でなく、プラークコントロール以上の予防法は未だ確立されていない。我々は歯周炎局所に浸潤する T 細胞のクローナリティーが非常に高いことから、種を越えて保存され免疫原性の高い抗原としての HSP60 に早くから注目してきた (Yamazaki K *et al.* Clin Exp Immunol. 2000)。実際、歯周炎患者ではヒト HSP60、*P. gingivalis* GroEL に対する抗体産生が上昇していること (Tabeta K *et al.* Clin Exp Immunol. 2000)、またこれらの抗体は互いに交叉反応性を示すことも報告している (Tabeta K *et al.* Oral Microbiol Immunol. 2001)。しかしながら、HSP60 を標的とした免疫応答の詳細は未だ明らかではなく、特に歯周組織の炎症で活性化される HSP60 特異的 T 細胞の血管内皮細胞へ及ぼす影響、ひいては動脈硬化症の病因に及ぼす影響は全く解っていない。動脈硬化組織に浸潤する T 細胞には CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null1</sup> 集団の集積が認められ (Zang X

*et al.* Circ. Res 2006)、抗原非特異にパーフォリン、グランザイム B を産生して内皮細胞を傷害する。また急性冠症候群患者由来の HSP60 を認識する CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null1</sup>T 細胞の存在も報告されており (Saha PK *et al.* Circulation 1999)、加齢に伴い CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null1</sup>T 細胞サブセットが増殖することも報告されている (Goronzy J *et al.* Experimental Gerontology 2007)。これらの報告は加齢現象に関連する疾患に T 細胞が深く関与し、まさにこの T 細胞の加齢現象が慢性炎症性疾患としての歯周炎と動脈硬化症に共通したメカニズムを説明する可能性を示唆している。一方、本研究を着想するもう一つの重要な理由として口腔の細菌叢と病態の間の時間的ディスレパンシーがある。歯周病原細菌は幼少期より口腔内から検出されるものであるが (Lamell *et al.* J Clin Microbiol. 2000, Tanner *et al.* J Dent Res 2002)、永久歯の萌出した少年期より歯周炎の発症する 30 歳台後半までの間には歯周病原細菌の存在にも関わらず歯周炎の発症しない期間が存在する。また歯と歯肉の境界である歯肉溝は生体内外を分けるバリアーとなっており、通常健康な歯肉においてもその周囲に炎症応答は認められて組織の破壊と修復がなされている。これらを踏まえ年齢とともに上昇する歯周炎罹患率の高さを考えると歯周炎への罹患は動脈硬化性心血管系疾患と同様にエイジングによる宿主の変化が大きく関与していると考えられる。そこで本研究においては破壊と修復のバランスを崩すエイジングに着目して、特に歯周組織と免疫系を分離した実験系にて病態形成のメカニズムを明らかにすると共に、動脈硬化症との関連についてマウスモデルを用いてその関連機序を明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はエイジングを視点として、マウス歯周炎モデルにおける病態形成のメカニズムを明らかにすると共に動脈硬化症との関連について炎症応答における生物学的な共通項から分子免疫学的・細胞免疫学的にその関連機序を明らかにすることである。歯周炎の予防、治療を目的とするのみならず、歯周炎と動脈硬化の関連についてのエビデンスを明らかにすることでその成果が社会に有効に還元されることを期待する。

### 3. 研究の方法

すべての動物実験は苦痛軽減に配慮し、新潟大学動物実験倫理委員会の承認のもと行われた。

歯周炎の発症は歯周病原細菌感染による歯周組織の炎症性破壊と修復における加齢におけるホメオスタシスの変化、破綻であると捉えられる。歯周炎発症へエイジングの影響として歯周組織（細胞・基質）の変化と免疫応答の変化が考えられる。これらについて

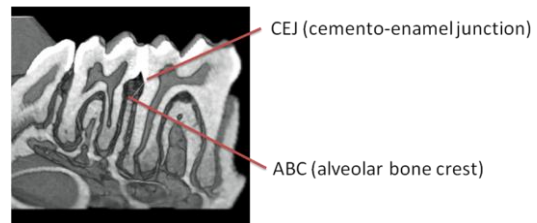
(1) 歯周炎発症におけるエイジングの影響にて検討する。(2) マウスモデルにおける歯周炎と動脈硬化症の相互関連の検討において歯周炎と動脈硬化形成の生物学的関連の存在を検討する。(3) 歯周炎と動脈硬化症における加齢の影響においてはヒト末梢血リンパ球のマウス移入モデルを用いて加齢によるT細胞応答の変化を中心に解析する。以上を当初予定した。これまでマウス、ラットの歯周炎モデルは対象が極めて小さいことから疾患による組織の病的変化を正確に定量評価することが困難であった。また人工的に口腔内を傷害しながら感染する手法で行われていたため人の歯周炎とは違ったメカニズムで歯周組織の破壊が生じていると考えられた。そこで本研究においては加齢による歯周炎感受性、免疫系の応答性検討するにあたり、最初に新たなマウス歯周炎モデルを作成しその妥当性を歯槽骨の吸収により

確認するとともに、歯周炎と動脈硬化症の相互関連の検討をおこなった。C57BL/6マウス (Paigen B *et al.* Biochem Genet. 1987)を用いた歯周炎発症モデルを用い、*P. gingivalis*を口腔内より感染させる。通常食飼育下における動脈硬化形成についてオイルレッド染色と免疫組織学的によって検討した。また、血清中リポタンパク質の主要分画（カイロミクロン, VLDL, LDL, HDL）に含まれるコレステロールとトリグリセリドの量の変化についても測定し歯周炎が動脈硬化因子に与える影響を評価した。血清中の炎症性サイトカインについてELISAにより測定した。また感染による動脈硬化症関連遺伝子の変化、および長期に感染を継続した際の影響についても検討した。十分な動脈硬化が得られない場合には確実に動脈硬化を起こすApoE<sup>sh1</sup>マウス（B6バックグラウンド）を利用することとした。

### 4. 研究成果

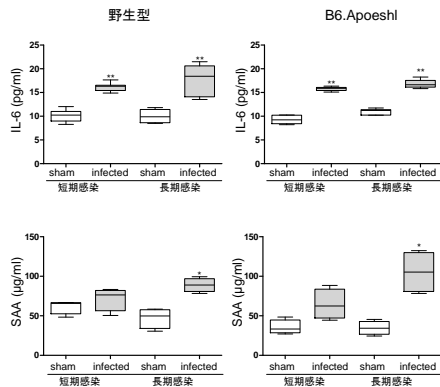
(1) マウス歯周炎モデルの作成と歯槽骨吸収

歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) W83株をC57 BL/6マウスに経口感染（3日毎に $1 \times 10^9$ CFU）し4週、32週の感染を行った。マウスにおける感染後の歯槽骨吸収の絶対量は非常に少ないがマイクロCTを用いることにより有意な歯槽骨吸収が生じることが確認できた。口腔から摂取された *P. gingivalis*によりヒト歯周炎と同様な歯槽骨吸収を観察することができた。

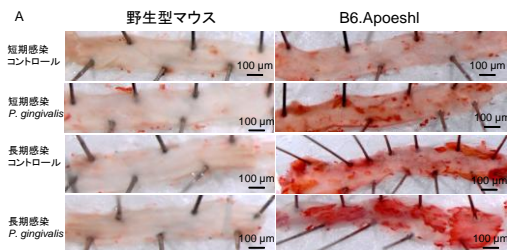


(2) *P. gingivalis* の口腔内感染による血清中 IL-6、SAA の変化  
血清を採取し ELISA 法により計測した。感染

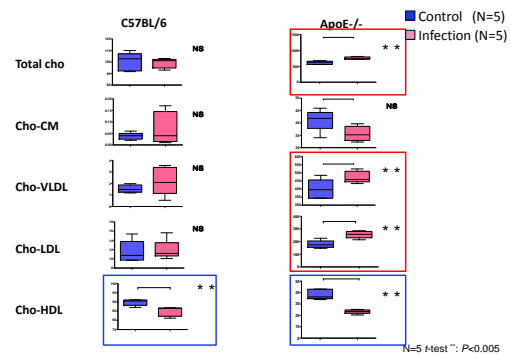
により急性期タンパクとして SAA、骨吸収の促進に重要と考えられる IL-6 は非侵襲的な *P. gingivalis* 口腔感染によっても全身的に炎症性応答が生じている。



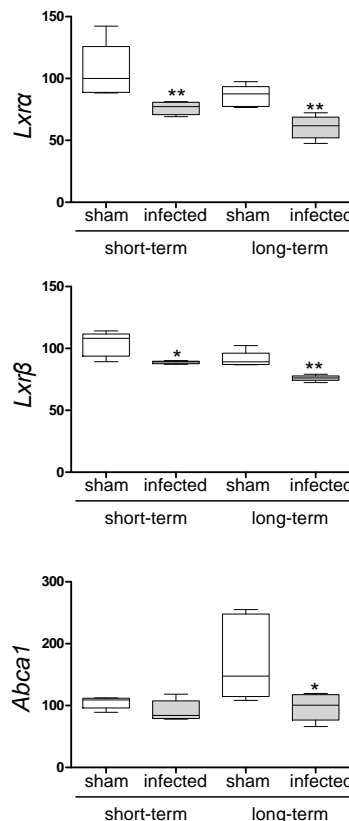
(3) 大動脈における動脈硬化病変の進展 *P. gingivalis* 感染により C57BL/6 マウスにおいて動脈硬化病変の形成や進展は認められない。ApoE ミュータントマウスにおいては感染を長期に継続した群において動脈硬化病変の進展促進が認められた。



(4) *P. gingivalis* 感後血清脂質の変化 長期に感染を継続した C57BL/6 においては HDL コレステロールの減少が、ApoEsh1 においては HDL コレステロールの減少に加えて LDL コレステロールの上昇が認められた。口腔からの非侵襲的な *P. gingivalis* 感染により血清コレステロール値の変動が動脈硬化促進性に変化することが明らかとなった。



(5) 大動脈においては動脈硬化症関連遺伝子としてコレステロール排出関連遺伝子の発現が減少し、*P. gingivalis* 感染が動脈硬化症促進性の遺伝子発現変動を誘導する。



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2件)

- ① Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K, Aoki Y, Miyashita H, Miyauchi S, Miyazawa H, Nakajima T, Yamazaki K. Chronic Oral Infection with *Porphyromonas gingivalis* Accelerates Atheroma Formation by Shifting the Lipid Profile. PLoS One 2011. in press (査読あり)
- ② Maekawa T, Takahashi N, Honda T, Yonezawa D, Miyashita H, Okui T, Tabeta K, Yamazaki K. *Porphyromonas gingivalis* antigens and interleukin-6 stimulate the production of monocyte chemoattractant protein-1 via the up-regulation of early growth response-1 transcription in human coronary artery endothelial cells. J Vasc Res., 47: 346-354, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

- ① Tabeta K: *Porphyromonas gingivalis* alters the serum lipid profile in mice. 88<sup>th</sup> General Session of the IADR, Barcelona, July 17, 2010.
- ② 多部田康一：動脈硬化自然発症モデルマウスにおける *Porphyromonas gingivalis* 長期感染後の血清脂質プロファイルの変化. 第132回日本歯科保存学会 2010年度春季学術大会、熊本市、2010.6.4.
- ③ 多部田康一：Apolipoprotein E 欠損マウスにおける *Porphyromonas gingivalis* 長期感染後の血清脂質プロファイルの

変化. 第31回日本炎症・再生医学会、東京、2010.8.5.

- ④ 多部田康一：マウス *Porphyromonas gingivalis* 口腔感染モデルにおける動脈硬化性変化の解析. 第2回口腔環境制御研究カテゴリー集会、長崎市、2010.2.10

[その他]

ホームページ等

[http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki\\_lab/](http://www.dent.niigata-u.ac.jp/yamazaki_lab/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多部田 康一 (タバタ コウイチ)  
新潟大学・超域研究機構・准教授  
研究者番号：20592426

(2) 研究分担者

山崎 和久 (ヤマザキ カズヒサ)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：00182478