

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791627

研究課題名（和文）心臓血管疾患に対する歯周病由来 anti-phospholipid 抗体の役割

研究課題名（英文）The role of anti-phospholipid antibody against periodontal pathogen to facilitate cardiovascular disease.

研究代表者

菱川 敏光（HISHIKAWA TOSHIMITSU）

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10421249

研究成果の概要（和文）：

anti-phospholipid抗体でオプソニン化した酸化LDLは、樹状細胞からのIL-12 p70の産生量をより増加した。また、anti-phospholipid抗体でオプソニン化した酸化LDLにより活性化した樹状細胞は、NK細胞からの早期IFN-g産生を誘導した。本研究の結果より、歯周病患者におけるanti-phospholipid抗体価の上昇が、局所における炎症反応を増強し、ひいては動脈硬化症の進行を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

oxLDL opsonized with anti-phospholipid promotes production of proinflammatory cytokines by DCs and NK cells and thus may participate in the pathogenesis of atherosclerosis. Opsonization of oxLDL by anti-phospholipid could provide a mechanism to help explain why periodontitis patients are more likely to develop atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学・

1. 研究開始当初の背景

疫学的並びに歯周病関連細菌を感染させた動物モデルでの研究から、歯周病は動脈硬化症の発症および進行ひいては冠動脈硬化性心疾患との関連が示唆されている。しかしながら、歯周病がこれら疾患とどのように関連しているのか満足いく証拠は示されていない。

い。近年、心臓血管疾患の病因論において炎症反応の果たす役割が注目されており、考える仮説は、歯周病と関係の深いグラム陰性細菌が全身的な炎症反応を促進することである。歯周病患者において血清レベルが上昇している anti-phospholipid 抗体は、歯周病関連細菌と交差性を持ち、患者の gingival

crevicular fluid(GCF)中でも増加していることから、歯周病関連細菌がこれら抗体産生を誘導している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

我々は、anti-phospholipid 抗体価の上昇している歯周病患者において、LDL、*P. gingivalis*、活性化血小板、アポトーシス細胞等は、オプソニイズ化され、動脈局所における炎症反応を促進ひいては動脈硬化症を進行させるという仮説を立てた。具体的には、酸化 LDL(oxLDL)や *P. gingivalis* と anti-phospholipid の免疫複合体による樹状細胞(単球/マクロファージ)からの免疫調節作用を明らかにする。今回の計画で、歯周病により全身あるいは局所的に増加するこれら因子が心臓血管疾患においてそれぞれどのように影響するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 樹状細胞およびT細胞、B細胞の分離及び oxLDL, anti-phospholipid 抗体の精製：
研究の協力に同意し、同意文書に署名を得た健常歯周組織を有する被験者（一部 *P. gingivalis* 血清陽性患者）より末梢血を採取し、単球、T細胞、B細胞を単離する。樹状細胞は単球を IL-4 と GM-CSF で刺激して分化させた。血清中から LDL の単離は、Sephacrose CL-6B カラムを使用し、ApoB 陽性の分画を採取した。oxLDL は、活性化好中球の上清を LDL に加えることで作成した。Anti-PC は、p-Aminophenyl PC カラムを使用して精製した。

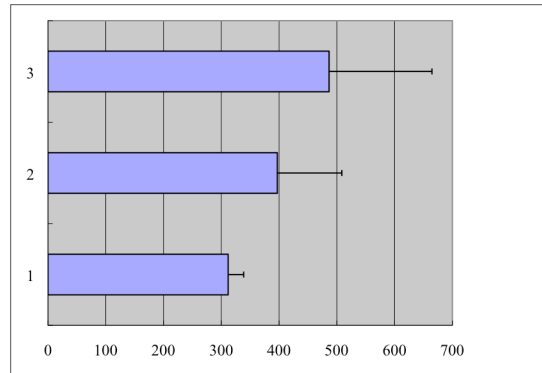
(2) oxLDL 免疫複合体は、樹状細胞の成熟を促進するか：anti-phospholipid 抗体でオプソニイズ化した oxLDL の免疫複合体あるいは oxLDL のみで樹状細胞を刺激し、CD83、CD86、CD40、HLA-II の発現をフローサイトメトリーにて検討した。また、貪食能を検討するため self-quenched green Bodipy dye でラベル化された BSA の取り込みをフローサイトメトリーにて検討した。

(3) oxLDL 免疫複合体は、樹状細胞からの Th-1 サイトカイン産生を促進するか：同免疫複合体あるいは oxLDL のみで樹状細胞を刺激し、IL-12p35 及び IL-12p40 遺伝子発現を Real-time PCR 法で測定した。また、培養液中の IL-12p70 の産生量を ELISA 法で測定した。

(4) oxLDL 免疫複合体で刺激された樹状細胞は、リンパ球からの早期 IFN- γ 産生を誘導するか：同免疫複合体で活性化した樹状細胞を NK 細胞 (CD56 陽性細胞) と共培養し、培養液中の IFN- γ 産生を ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

(1) anti-phospholipid 抗体でオプソニイズ化した oxLDL は、酸化 LDL 単独に比較し樹状細胞の貪食能を増加した。



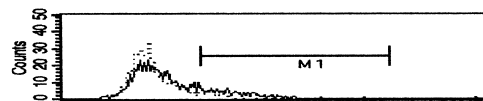
1: no stimulation

2: oxLDL

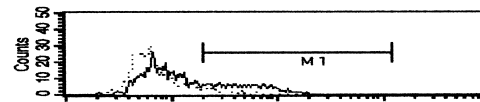
3: oxLDL+anti-phospholipid

樹状細胞内の蛍光標識した oxLDL 量を蛍光強度で表した

(2) 同免疫複合体は、樹状細胞の成熟マーカーである CD83 の発現を増加した。



Marker	% Gated	Mean
All	100.00	12.60
M1	13.99	42.09



Marker	% Gated	Mean
All	100.00	20.76
M1	27.99	52.27



Marker	% Gated	Mean
All	100.00	24.69
M1	32.56	53.98

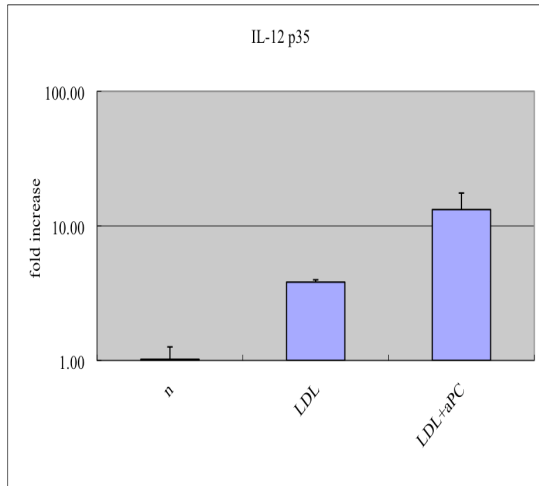
2

LDL

LDL + APC

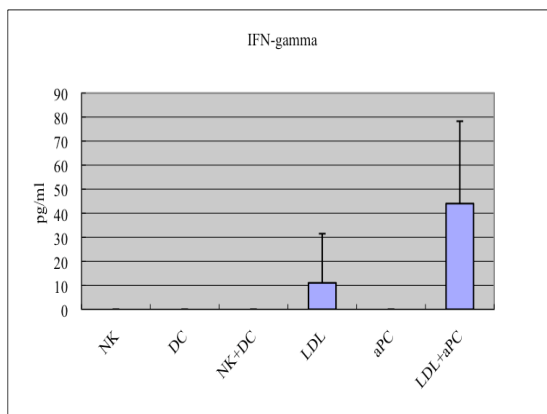
N:no stimulation
 LDL:oxLDL
 LDL+aPC:oxLDL+anti-phospholipid
 樹状細胞上 CD83 発現量を蛍光強度で表した.

(3)同免疫複合体は樹状細胞からの IL-12 p35 遺伝子発現量及び IL-12 p70 の産生量をより増加した.



N:no stimulation
 LDL:oxLDL
 LDL+aPC:oxLDL+anti-phospholipid
 樹状細胞の IL-12 p35 遺伝子発現量を表した.

(4)anti-phospholipid 抗体でオプソニン化した oxLDL により活性化した樹状細胞は, NK 細胞からの早期 IFN-g 産生を誘導した.



NK:Natural Killer 細胞
 DC:樹状細胞
 LDL:oxLDL
 aPC:anti-phospholipid
 培養液中の IFN-g の量を表した.

(5)CRP と oxLDL の免疫複合体及び *P. gingivalis* と anti-PC の免疫複合体は, 同様の作用を認めなかった.
 (Data not shown)

以上の結果をまとめると, anti-phospholipid 抗体によりオプソニン化したoxLDLは, 樹状細胞をより活性化し, NK細胞からの前炎症性サイトカインの産生を促進した. 免疫複合体によって刺激された樹状細胞による免疫応答の増強 (特にTh-1反応) は, 動脈硬化症の病因の一端を担うと考えられる.

今回の結果より歯周病患者における anti-phospholipid抗体価の上昇が, 炎症反応を増強し, ひいては動脈硬化症の進行を促進する可能性が示唆された.

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)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]
 ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菱川 敏光 (HISHIKAWA TOSHIMITSU)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10421249

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし