

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16981

研究課題名（和文）歯周病が関与する動脈硬化の進展にマイオカインが及ぼす影響についての検討

研究課題名（英文）The effect of myokines on the progression of arteriosclerosis associated with periodontal disease

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：今回の研究では、ヒト大動脈平滑筋細胞(HASMCs)を歯周病原細菌のPorphyromonas gingivalis由来Lipopolysaccharide (Pg-LPS)で刺激し、HASMCsの増殖と遊走が有意に増加することを示した。Pg-LPS刺激によるHASMCsの増殖にはTLR4からMyD88非依存性にERKを介するシグナル経路が関与しており、遊走にはTLR4/MyD88からJNKとp38を介する経路とTLR4からMyD88非依存性にERKを介する経路があることを明らかにした。また、Irisinを投与することによって、Pg-LPS刺激によるHASMCsの増殖と遊走が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において慢性炎症性疾患である歯周炎の存在が動脈硬化の発症や進展に関わるメカニズムの一部を明らかにした。それにより歯周病治療による動脈硬化の予防や進展抑制の可能性を示唆することができた。また、マイオカインの一つであるIrisinが歯周病原細菌由来のLPS刺激による血管平滑筋の増殖と遊走を抑制することを示したことで動脈硬化の新たな治療手段や予防法の確立につなげることが可能になる。また、動脈硬化も歯周病も世界中で多くの人々が罹患する疾患であり、特に動脈硬化性疾患によって多くの人の生命予後が左右されることから今回の研究成果はこれからの世界中の多くの患者の生命予後を改善する可能性を持っている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed that human aortic smooth muscle cells (HASMCs) were stimulated with lipopolysaccharide (Pg-LPS) derived from the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis, and that proliferation and migration of HASMCs were significantly increased. We demonstrated that the proliferation of HASMCs stimulated with Pg-LPS involves a signaling pathway mediated by ERK in a manner independent of MyD88 from TLR4, and that migration involves a pathway mediated by JNK and p38 from TLR4/MyD88, and a pathway mediated by ERK in a manner independent of MyD88 from TLR4. Furthermore, administration of irisin suppressed the proliferation and migration of HASMCs stimulated with Pg-LPS.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 歯周病 マイオカイン

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患や脳卒中など心血管疾患の発症には動脈硬化が深く関与するが、その発生や進展には様々な因子が複雑に絡み合っている。動脈硬化は多くの研究報告によって慢性炎症性疾患ととらえられるようになり、炎症が動脈硬化の進展に関与することが示唆されている。歯周病が動脈硬化性心血管障害と関連するとされる疫学調査が報告されているが、発症に関する詳細なメカニズムは解明されていない。近年、骨格筋由来の生理活性物質マイオカインが動脈硬化の改善に関与することが注目されている。申請者は Fstl-1 がヒト血管平滑筋細胞(HASMCs)の増殖、遊走および血管障害後の新生内膜形成を抑制する事(Miyabe M et al. Cardiovasc Res. 2014)を明らかにした。マイオカインの1つである irisin は、脂肪組織のエネルギー代謝の調節に関与すること(Boström et al. Nature. 2012)や、抗炎症作用を有すること(Mazur-Bialy AI et al. J Mol Sci. 2017)、歯根膜細胞の増殖、遊走や基質の産生が促進されることが報告された(Pullisaar H, et al. Arch Oral Biol. 2020)。本研究では歯周炎と動脈硬化の関連、irisin の動脈硬化や歯周炎に及ぼす影響およびそのメカニズムを解明する。動脈硬化性疾患の発症や進展の抑制は健康寿命の延伸につながり、国民医療費軽減にも資する事となる。

2. 研究の目的

本研究では抗炎症効果が期待できる irisin を用いて、歯周炎の原因菌が惹起する炎症を抑制し HASMCs の増殖や遊走を抑制し、血管プラークによる動脈硬化の予防や進展抑制につながることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LPS 刺激による HASMCs の増殖や遊走の検討

歯周病と動脈硬化との関連を検討。歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis*(Pg 菌)由来の LPS(*Pg*-LPS)刺激による HASMCs の増殖について MTT assay、BrdU assay、遊走については scratched wound healing assay, Transwell assay を用いて評価を行った。

(2) LPS 刺激による HASMCs の増殖や遊走のシグナルの検討 1

Pg-LPS 刺激による HASMCs の増殖や遊走に関する細胞内シグナルについて、Western blot 法を用いて解析を行った。

(3) 遺伝子ノックダウンによる HASMCs の増殖と遊走の検討

(2)の実験で *Pg*-LPS による HASMCs の増殖と遊走には TLR4/MyD88 が関与していると考えられたので、HASMCs の TLR4 及び MyD88 をノックダウンして *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の増殖と遊走についてを(1)と同様に評価を行った。

(4) LPS 刺激による HASMCs の増殖や遊走のシグナルの検討 2

(2)の実験で明らかになった TLR4/MyD88 の経路の下流分子の MAPK のリン酸化について、Western blot 法を用いて解析を行った。

(5) MAPK 阻害剤を用いた LPS 刺激による HASMCs の増殖と遊走の検討

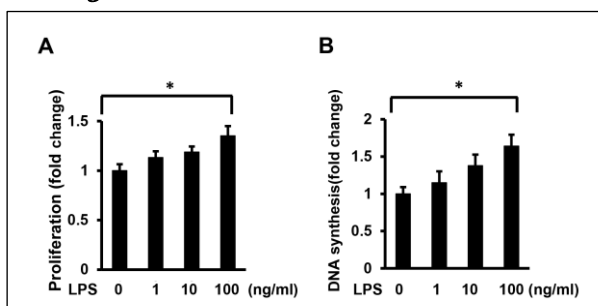
(4)の実験で *Pg*-LPS 刺激によってリン酸化した p38,JNK,ERK の阻害剤を用いて HASMCs を処理し、*Pg*-LPS 刺激による HASMCs の増殖と遊走についてを(1)と同様に評価を行った。

(6) LPS 刺激による HASMCs の増殖や遊走に対する irisin の影響についての検討

リコンビナント irisin で前処置した後で HASMCs に *Pg*-LPS で刺激を行い、HASMCs の増殖や遊走にどのような影響が及ぶのかについて(1)と同様に評価を行った。

4. 研究成果

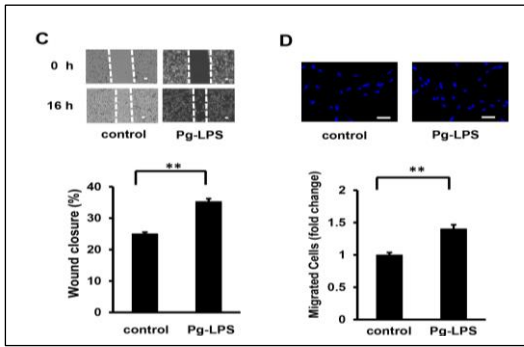
(1) *Pg*-LPS 刺激によって HASMCs の増殖と遊走が促進する



96well プレートで HASMCs を培養、serum starvation 後に *Pg*-LPS で 16h 刺激を行い、(A)MTT assay、(B)BrdU assay を用いて HASMCs の増殖について評価した。*Pg*-LPS の濃度依存性に HASMC の増殖が促進され、*Pg*-LPS 濃度が 100ng/ml で有意に増加することが示された。(Fig.1 A,B)

* $p < 0.05$ vs. basal.

(C)Scratch assay : 6 well プレートで HASMCs を培養、serum starvation 後に scratch を行った。同時に *Pg*-LPS で 16h 刺激し、創の閉鎖について評価した。コントロール群に対し、*Pg*-LPS 刺激群では有意に創の閉鎖が認められた。(D) Transwell assay : serum starvation 後の HASMCs を

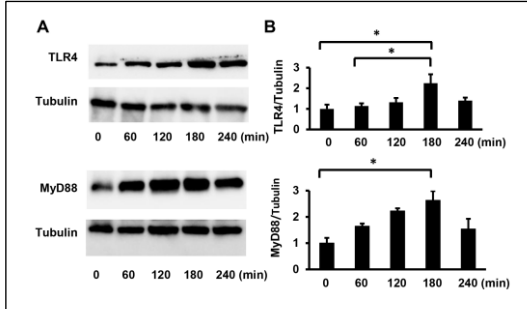


transwell へ播種し、Pg-LPS で 16h 刺激後に細胞の遊走について評価した。コントロール群に対し、Pg-LPS 群では有意に HASMC の遊走が増加した。(Fig.1 C,D)

The scale bar shows 50 μ m.

** $p < 0.01$ vs. basal.

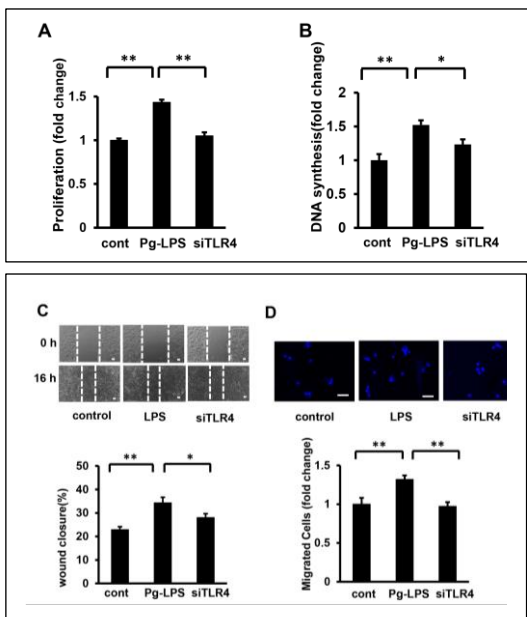
(2) Pg-LPS 刺激によって HASMC の TLR4/MyD88 シグナルが活性化する



(A) Pg-LPS 刺激による HASMC の TLR4/MyD88 の活性について Western blot 法を用いて評価した。(B) (A)の定量を行った。Pg-LPS 刺激 3h で HASMCs の TLR4/MyD88 の活性はピークに達した。(Fig.2 A,B)

* $p < 0.05$

(3) siTLR4 によって Pg-LPS 刺激による HASMCs の増殖と遊走が抑制される



siRNA を用いて TLR4 を knock down した後、Pg-LPS で 16h 刺激を行い HASMCs の増殖について (A) MTT assay、(B) BrdU assay を用いて評価した。siTLR4 によって、Pg-LPS 刺激による HASMCs の増殖が抑制された。(Fig.3 A,B)

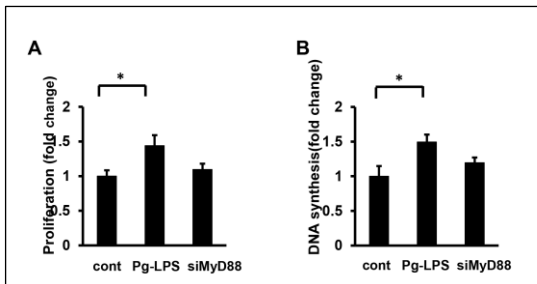
siRNA を用いて TLR4 を knock down し、Pg-LPS で 16h 刺激を行い HASMCs の遊走について評価した。(C) Scratch assay : siTLR4 によって、Pg-LPS 刺激による創の閉鎖が有意に抑制された。

(D) Transwell assay : siTLR4 によって、Pg-LPS 刺激による HASMCs の遊走が有意に抑制された。(Fig.3 C,D) The scale bar shows 50 μ m.

* $p < 0.05$ vs. basal.

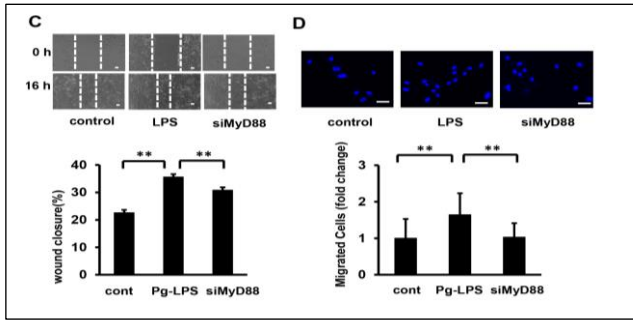
** $p < 0.01$ vs. basal.

(4) siMyD88 によって Pg-LPS 刺激による HASMCs の遊走が抑制される



siRNA を用いて MyD88 を knock down した後、Pg-LPS で 16h 刺激を行い HASMC の増殖について (A) MTT assay、(B) BrdU assay を用いて評価した。siMyD88 によって、Pg-LPS 刺激による HASMC の増殖は抑制傾向を示すものの、有意差は認めなかった。(Fig.4 A,B) * $p < 0.05$ vs. basal.

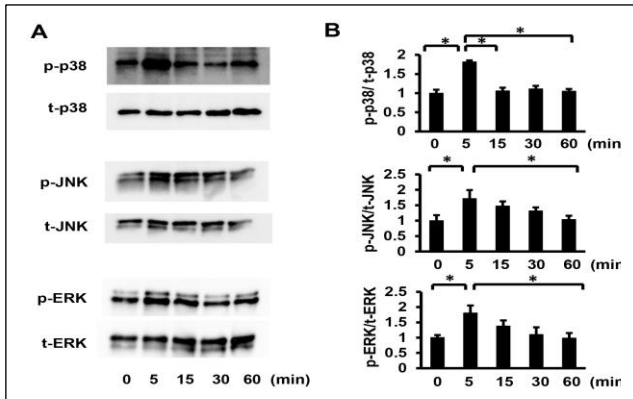
siRNA を用いて MyD88 を knock down した後、Pg-LPS で 16h 刺激を行い HASMC の遊走について評価した。(C) Scratch assay : siMyD88 によって、Pg-LPS 刺激による創の閉鎖が有意に抑制された。(D) Transwell assay : siMyD88 によって、Pg-LPS 刺激による HASMC の遊走が有意に抑制された。(Fig.4 C,D)



The scale bar shows 50 μ m. ** $p < 0.01$ vs. basal.

(5) *Pg*-LPS 刺激によって HASMCs の MAPK が活性化する

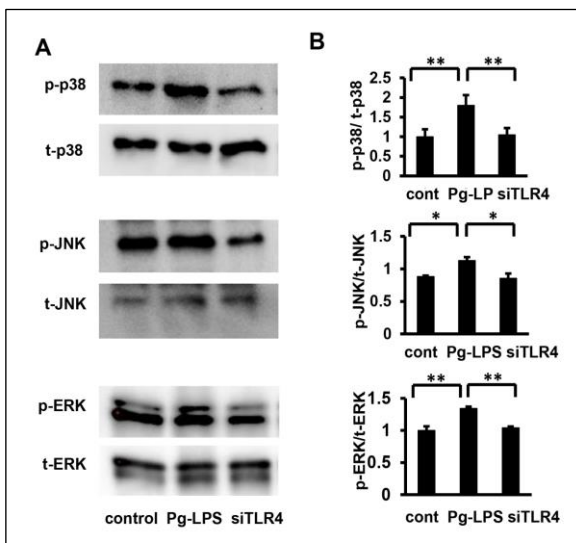
(A) *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の p38MAPK, SAPK/JNK, ERK のリン酸化について Western blot 法を用いて評価した。(B) (A)の定量を行った。*Pg*-LPS 刺激後5分で、HASMCs の p38MAPK, SAPK/JNK, ERK のリン酸化レベルはピークに達した。(Fig.5 A,B)



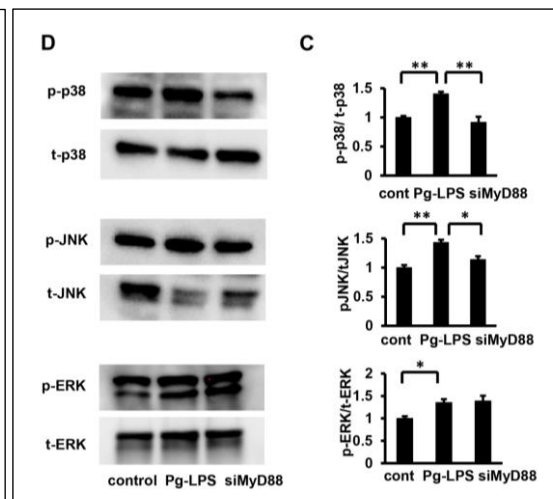
(Fig.5) * $p < 0.05$

(6)-① siTLR4 によって *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の MAPK のリン酸化が抑制される

(A) siRNA を用いて TLR4 を knock down した後、*Pg*-LP 刺激による HASMCs の p38MAPK, SAPK/JNK, ERK のリン酸化について western blot 法を用いて評価した。(B) (A)の定量を行った。siTLR4 によって *Pg*-LPS 刺激による p38MAPK, SAPK/JNK, ERK のリン酸化が有意に抑制された。(Fig.6 A,B)



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. basal.



* $p < 0.05$ vs. basal. ** $p < 0.01$ vs. basal.

(6)-② siMyD88 によって *Pg*-LPS 刺激による p38MAPK, SAPK/JNK のリン酸化は抑制されるが、ERK のリン酸化は抑制されない

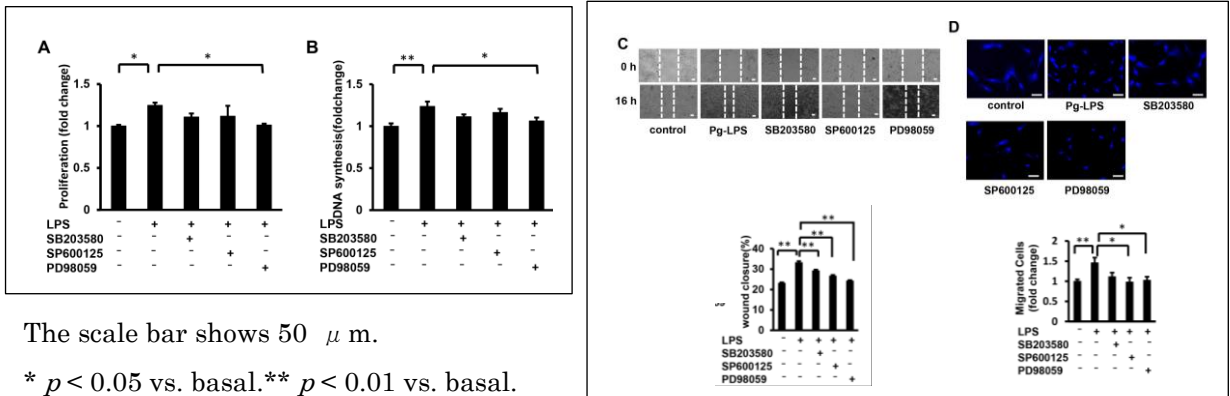
(C) siRNA を用いて MyD88 を knock down し、*Pg*-LP 刺激による HASMC の p38MAPK, SAPK/JNK, ERK のリン酸化について western blot 法を用いて評価した。

(D) (C)の定量を行った。siMyD88 によって *Pg*-LPS 刺激による p38MAPK, SAPK/JNK のリン酸化が有意に抑制されたが、ERK のリン酸化は抑制されなかった。(Fig.6 C,D)

(7)-① ERK 阻害によって *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の増殖は抑制される

阻害剤を用いて HASMCs の MAPK を阻害した後、*Pg*-LPS で 16h 刺激を行い HASMCs の増殖について(A) MTT assay、(B) BrdU assay を用いて評価した。ERK 阻害によって、*Pg*-LPS 刺激

による HASMCs の増殖は有意に抑制された。(Fig.7 A,B)

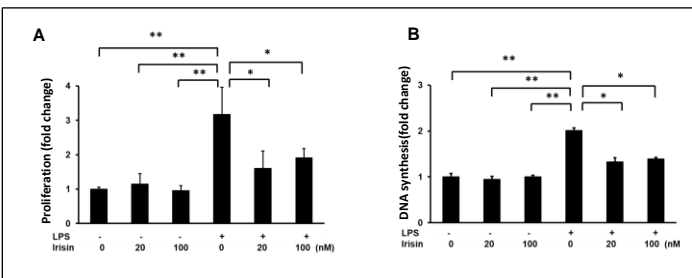


(7)-② MAPK 阻害によって *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の遊走は抑制される

阻害剤を用いて HASMCs の MAPK を阻害し、*Pg*-LPS で 16h 刺激を行い HASMCs の遊走について評価した。(C) Scratch assay : MAPK 阻害によって、*Pg*-LPS 刺激による創の閉鎖が有意に抑制された。(D) Transwell assay : MAPK 阻害によって、*Pg*-LPS 刺激による HASMCs の遊走が有意に抑制された。(Fig.7 C,D) SB203580: p38MAPK 阻害薬、SP400125: SAPK 阻害薬、PD98059: MEK 阻害薬

(8) Irisin は *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の増殖を抑制する

Irisin で 24h 処理後に *Pg*-LPS で 24h 刺激を行い、(A)MTT assay、(B)BrdU assay を用いて HASMCs の増殖について評価した。*Pg*-LPS 刺激による HASMCs の増殖が Irisin 処理によって有意に抑制された。(Fig.8 A,B)

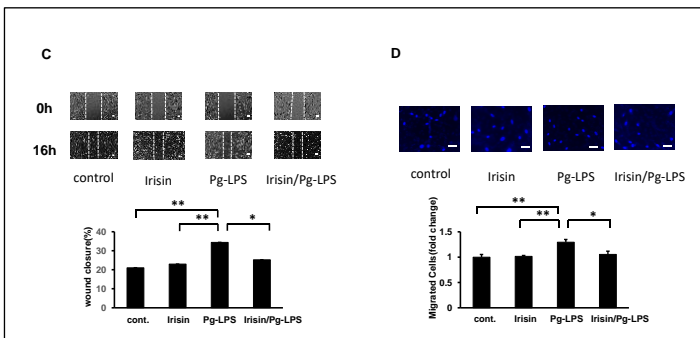


(9) Irisin は *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の遊走を抑制する

. Irisin で 24h 処理後に *Pg*-LPS で 16h 刺激を行い、HASMCs の遊走について評価した。

(A) Scratch assay :Irisin 処理によって、 *Pg*-LPS 刺激による創の閉鎖が有意に抑制された。

(B) Transwell assay : Irisin 処理によって、 *Pg*-LPS 刺激による HASMCs の遊走が有意に抑制された。(Fig.9 A,B)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Yamauchi Taisuke, Miyabe Megumi, Nakamura Nobuhisa, Ito Mizuho, Sekiya Takeo, Kanada Saki, Hoshino Rina, Matsubara Tatsuaki, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Naruse Keiko | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Impacts of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide on Orthodontic Tooth Movement-Induced Bone Remodeling | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 8922 ~ 8922 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23168922 | 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 Fukumura M, Ishibashi K, Nakaguro M, Nagao T, Saida K, Urano M, Tanigawa M, Hirai H, Yagyu T, Kikuchi K, Yada N, Sugita Y, Miyabe M, Hasegawa S, Goto M, Yamamoto H, Ohuchi T, Kusafuka K, Ogawa I, Suzuki H, Notohara K, Shimoda M, Tada Y, Kirita T, Takata T, Morinaga S, Maeda H, Warnakulasuriya S, Miyabe S, Nagao T. | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 Salivary gland polymorphous adenocarcinoma: Clinicopathological features and gene alterations in 36 Japanese patients | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Oral Pathology & Medicine | 6. 最初と最後の頁 710 ~ 720 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jop.13336 | 査読の有無 有 |
| 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Miyabe Megumi, Nakamura Nobuhisa, Saiki Tomokazu, Miyabe Satoru, Ito Mizuho, Sasajima Sachiko, Minato Tomomi, Matsubara Tatsuaki, Naruse Keiko | 4. 巻 24 |
| 2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharides Promote Proliferation and Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells through the MAPK/TLR4 Pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 125 ~ 125 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24010125 | 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 Kondo Shun, Kojima Kento, Nakamura Nobuhisa, Miyabe Megumi, Kikuchi Takeshi, Ohno Tasuku, Sawada Noritaka, Minato Tomomi, Saiki Tomokazu, Ito Mizuho, Sasajima Sachiko, Matsubara Tatsuaki, Mitani Akio, Naruse Keiko | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Increased expression of angiopoietin like protein 4 regulates matrix metalloproteinase 13 expression in <i>Porphyromonas gingivalis</i> lipopolysaccharides stimulated gingival fibroblasts and ligature induced experimental periodontitis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research | 6. 最初と最後の頁 43 ~ 52 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.13067 | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Hirmatsu-Ito Mizuho, Nakamura Nobuhisa, Miyabe Megumi, Matsubara Tatsuaki, Naruse Keiko | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Case Report: Non-episodic Angioedema With Eosinophilia in a Young Lactating Woman | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.627360 | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Saiki Tomokazu, Nakamura Nobuhisa, Miyabe Megumi, Ito Mizuho, Minato Tomomi, Sango Kazunori, Matsubara Tatsuaki, Naruse Keiko | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 The Effects of Insulin on Immortalized Rat Schwann Cells, IFRS1 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 5505 ~ 5505 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22115505 | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Hata Masaki, Omi Maiko, Kobayashi Yasuko, Nakamura Nobuhisa, Miyabe Megumi, Ito Mizuho, Ohno Tasuku, Imanishi Yuka, Himeno Tatsuhiro, Kamiya Hideki, Nakamura Jiro, Miyachi Hitoshi, Ozawa Shogo, Miyazawa Ken, Mitani Akio, Nagao Toru, Goto Shigemi, Takebe Jun, Matsubara Tatsuaki, Naruse Keiko | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Sustainable Effects of Human Dental Pulp Stem Cell Transplantation on Diabetic Polyneuropathy in Streptozotocine-Induced Type 1 Diabetes Model Mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cells | 6. 最初と最後の頁 2473 ~ 2473 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10092473 | 査読の有無 有 |
| 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Minato Tomomi, Nakamura Nobuhisa, Saiki Tomokazu, Miyabe Megumi, Ito Mizuho, Matsubara Tatsuaki, Naruse Keiko | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 -Aminoisobutyric acid, L-BAIBA, protects PC12 cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis via activation of the AMPK and PI3K/Akt pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 IBRO Neuroscience Reports | 6. 最初と最後の頁 65 ~ 72 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibneur.2021.12.001 | 査読の有無 有 |
| 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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮部愛、中村信久、伊藤瑞穂、齋木智一、松原達昭、成瀬桂子 |
| 2. 発表標題 歯周病の存在が動脈硬化促進に影響を及ぼす可能性についての検討 |
| 3. 学会等名 第54回動脈硬化学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮部愛、中村信久、伊藤瑞穂、齋木智一、松原達昭、成瀬桂子 |
| 2. 発表標題 マイオカインによる歯周炎が関与する動脈硬化の進展抑制に対する効果と再生医療への展望 |
| 3. 学会等名 第100回愛知学院大学歯学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮部 愛、中村 信久、伊藤 瑞穂、齋木 智一、松原 達昭、成瀬 桂子 |
| 2. 発表標題 歯周病原細菌由来LPSは血管平滑筋細胞の増殖・遊走を促進する |
| 3. 学会等名 第36回糖尿病合併症学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮部 愛、中村 信久、伊藤 瑞穂、齋木 智一、松原 達昭、成瀬 桂子 |
| 2. 発表標題 歯周病が動脈硬化の促進に及ぼす可能性についての検討 |
| 3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮部 愛、中村信久、伊藤瑞穂、笹島佐知子、成瀬桂子 |
| 2. 発表標題 マイオカインによる歯周炎が関与する動脈硬化の進展抑制に対する効果と歯周組織の再生における効果の検討 |
| 3. 学会等名 第103回愛知学院大学歯学会総会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |