

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792492

研究課題名（和文） 歯周病による血管石灰化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the blood vessel calcification mechanism due to periodontal disease

研究代表者

武藤 昭紀（MUTO AKINORI）

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50549433

研究成果の概要（和文）：

血管の石灰化は血管の抵抗性の増加により、様々な疾患の要因となる。そこで本研究では歯周病を介した血管の石灰化の作用機序を解明することを目的として実験を行なった。IL-6 を口腔内より投与する歯周病誘導性血管石灰化モデルの実験系において、IL-6 投与群において、大動脈弓における脂質沈着が有意に亢進した。また、血管の石灰化度が高かった。さらに、HUVEC における IL-6 添加による石灰化への影響を解析した。その結果、ALP、RANKL の発現上昇が見られたが、MGP の発現は亢進しなかった。以上により歯周病誘導性サイトカインの上昇により、血管の石灰化に関与する可能性が示唆された。今後、さらに本研究をすすめることにより、歯周病による動脈硬化症、特に血管の石灰化における機序、影響程度が解明されるとともに、血管の石灰化に対する歯周病の直接的な因果関係が明らかにできると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

The calcification of the blood vessel becomes the risk factor by the resistant increase of the blood vessel. Therefore, I started research on the mechanism of the calcification of the blood vessel through periodontal disease in this study. In the periodontal disease inductivity blood vessel calcification model (IL-6 injected to intraoral), atherosclerotic plaque was increased in the IL-6 administrated group. In addition, the calcified degree of the blood vessel was high in the IL-6 administrated group. Furthermore, I performed of the influence on calcification by the inflammatory cytokine (IL-6) addition in human aorta vascular smooth muscle cell (HUVEC). As a result, expression of ALP and RANKL were increased, but the expression of MGP which was a calcified inhibitor did not increase. Therefore, these results suggested that increasing of periodontal disease inductivity cytokines were involved in the calcification of the blood vessel. In future, this study may contributes to elucidation of mechanism in the calcification of arteriosclerosis due to periodontal disease and it will be elucidated in the relation with periodontal disease and calcification of the blood vessel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病, 血管の石灰化, RANK, ペリオドンタルメディシン

## 1. 研究開始当初の背景

### 血管の石灰化は心臓血管疾患

(cardiovascular disease: CVD)の重大な危険因子であり、血管壁での石灰化、特に末梢の血管の石灰化があると、血管の抵抗ができて、高血圧の原因となる。また、末梢組織への虚血がおこりやすくなる。心臓の血管の石灰化では、心臓の細胞への虚血により狭心症や、心筋梗塞の原因となる。従来、その発生機序は、「細胞が壊死した状態でカルシウムが沈着するという受動的な過程」と考えられてきたが、近年になって「骨が形成されるときと同様に積極的な石灰沈着がおきる能動的な過程」とあるという報告が数多くされている。

一方、歯周病は歯肉のみならず、他のさまざまな疾患の原因になりうるものが、近年の研究で明らかになっている。特に、1990年代に始まった歯周病とCVDとの関連に関する疫学研究結果の蓄積は、1999年以後に6編のシステマティックレビューとして報告されている。これらの結果は、6報告ともに歯周病とCVDの関係を支持している。また歯周病は、バイオフィーム感染症として認識されている。生体側は、細菌感染に対して免疫担当細胞（マクロファージ、リンパ球）が産生するサイトカイン（主にIL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ ）や他の炎症性メディエーターにより、免疫防御機構を働かせる。しかし、細菌刺激が慢性的、かつ持続的に存在し続けると、炎症、免疫応答の遷延化が起こり、歯周組織に多量に存在する細菌や過剰に産生されたサイトカインが血中に流入し全身を循環することになる。実際に、歯周病の患者で心冠状動脈のバイパス手術を受けた人の血管壁から歯周病原細菌が検出されることが報告されている。このように歯周病原細菌が動脈硬化の形成に関わる報告はあるが、歯周病原細菌が、どのようなメカニズムで発症するのか未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

血管の石灰化の発症機序に対して多くの報告がなされており、歯周ポケット内で歯周病原細菌と白血球、マクロファージの間で炎症、免疫応答が惹起され、多くのサイトカインが活性化されることによりRANK-RANKLが活性化され、歯槽骨吸収を引き起こす歯周病の病

因と類似している点が多く存在するが明らかになってきた。歯周病と動脈硬化性疾患発症の共通メカニズムとして、①歯周病原細菌、あるいは細菌産生物による上皮、内皮細胞および血管平滑筋に対する直接的な作用、②細菌あるいは細菌産生物によるIL-6、TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカイン刺激による間接的障害作用、③LPSあるいは、IL-6、TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインの刺激によって肝臓から産生されるC反応タンパクや血清アミロイドA(SAA)タンパク等の急性期タンパクによる間接的障害作用の3つの経路が可能性として挙げられる。そこで本研究では、病原細菌が動脈硬化部位に直接作用するだけでなく、それによって産生される炎症性サイトカインの刺激によって血管の石灰化が発症すると考え、そのメカニズムを解明、およびマーカー分子を見つけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

血管石灰化亢進マウス(ApoE<sup>-/-</sup>/OPG<sup>-/-</sup>)に対して歯周病原細菌を感染させることにより、(1)歯周病における血管石灰化モデルを作製する予定であったが結果のばらつきが強いので、口腔内より炎症性サイトカイン(IL-6)を口腔内に投与する系に変更した。(2)次に石灰化度の程度や、RANK、RANKLの発現を組織学的に検討する。さらに石灰化病変部における、石灰化誘導遺伝子(RUNX2、BMP-2)発現を検討する。またヒト血管平滑筋細胞への直接的影響を検討するため、(3)RANKL投与下の血管平滑筋細胞に対して、歯周病原細菌、または歯周病由来の炎症性サイトカイン(IL-6、TNF- $\alpha$ 、LPS)を投与し、Alizalin-red染色にて石灰化度を評価する。以上のことにより、歯周病(細菌および炎症性サイトカイン)による血管の石灰化の作用機序を明らかにする

## 4. 研究成果

歯周病原細菌により産生亢進が著明なIL-6を口腔内より投与する歯周病誘導性血管石灰化モデルの実験系において、IL-6投与群において、大動脈弓における脂質沈着が有意に亢進した。またIL-6投与群において血管の石灰化度が高かった。さらに、ヒト大動脈血管平滑筋細胞(HUVEC)における炎症性サイトカイン

(IL-6) 添加による石灰化への影響の解析実験を行なった。その結果、ALP、RANKLの発現上昇が見られたが、石灰化抑制因子であるMGPの発現は亢進しなかった。また、Alizalin-red染色にて石灰化度を評価をしたところ、IL-6投与群の方が、石灰化度が高い傾向を示した。

以上のことにより歯周病誘導性サイトカインの上昇により、血管の石灰化に關与する可能性が示唆された。今後、さらに本研究をすすめることにより、歯周病による動脈硬化症、特に血管の石灰化における機序、影響程度が解明されるとともに、血管の石灰化に対する歯周病の直接的な因果関係が明らかにできると考えられる。

#### 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4件)

1. Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahawa I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunol* 188: 1772-1781 2012 (査読有) doi: 10.4049/jimmunol.1101174.
2. 口腔衛生指導によるFRAXの10年間の骨折リスクの推定に関する検討 田口明, 三木学, 高橋美穂, 西田英作, 武藤昭紀, 細井孝之, 吉成伸夫 *Osteoporosis Jpn* 20: 470-473 2012 (査読有)
3. 歯肉メラニン色素沈着症に対する歯科用(Er:YAG, Co2)レーザーの着色除去効果 西田英作, 三木学, 武藤昭紀, 窪川恵太, 片瀬剛士, 内田啓一, 阪中孝一郎, 大原盛勝, 大野友三, 吉成伸夫 *日レ歯誌* 23: 27-32 2012 (査読有)
4. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. Muto A,

Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahawa I, Abiko A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N. *J Bone Miner Res* 26: 2978-2990 2011 (査読有) doi: 10.1002/jbmr.490.

[学会発表] (計7件)

1. The effect of serum amyloid A (SAA) accelerates atherosclerosis in mice Nobuo Yoshinari, Akinori Muto, Keita Kubokawa, Kiyohito Kaise, Kotaro Takahashi, Manabu Miki, Akira Taguchi The 51st Annual Scientific Meeting of the Korean Academy of Periodontology, Seoul, Korea 2012. 11. 21
2. Serum amyloid Aを介した歯周病から動脈硬化症への経路 窪川恵太, 武藤昭紀, 海瀬聖仁, 三木学, 高橋弘太郎, 坂本浩, 吉成伸夫 第22回日本歯科医学学会総会(大阪) 2012. 11. 10
3. 培養ヒト血管内皮細胞に対する歯周病由来Serum Amyloid Aの効果 海瀬聖仁, 武藤昭紀, 高橋弘太郎, 窪川恵太, 高橋美穂, 西田英作, 河谷和彦, 吉成伸夫 第22回日本歯科医学学会総会(大阪) 2012. 11. 10
4. 歯周病由来動脈硬化病変部における接着関連因子の発現 高橋弘太郎, 窪川恵太, 武藤昭紀, 海瀬聖仁, 山田真一郎, 上条博之, 中野敬介, 川上敏行, 吉成伸夫 第22回日本歯科医学学会総会(大阪) 2012. 11. 10
5. Circulating lineage-committed osteoclast precursors settle down into bone in mice. : Akinori Muto, Toshihide Mizoguchi, Nobuyuki Udagawa, Josef M. Penninger, Naoyuki Takahashi, Nobuo Yoshinari 98<sup>th</sup> Annual Meeting American Academy of Periodontology, Los Angeles, USA, 2012. 9. 30
6. 上顎洞底に近接した部位における歯の移

植症例 武藤昭紀, 窪川恵太, 海瀬聖仁,  
三木 学, 佐藤徳志, 内山真紀子, 内田  
啓一, 山本昭夫, 田口 明, 吉成伸夫 第  
136 回日本歯科保存学会春季学術大会 (沖  
縄) 2012. 6. 30

7. 歯周基本治療で掌蹠膿胞症患者が改善し  
た症例 蛭江由季, 岡本成美, 羽田えり  
か, 小林加奈, 河合 悠, 海瀬聖仁, 大  
野友三, 武藤昭紀, 吉成伸夫 第 54 回季  
日本歯周病学会学術大会 (札幌)  
2012. 5. 17

[図書] (計 1 件)

1. 新・口腔の生理からどうして? を解く  
森本俊文監修 第 25 章 「どうして歯石  
のような硬いものができるのだろう」の  
項 104-107 2012. 4. 1 デンタルダイ  
ヤモンド社

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 昭紀 (MUTO AKINORI)  
松本歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 50549433