

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862063

研究課題名(和文)血清アミロイドAアイソタイプの種類による動脈硬化症に対する影響

研究課題名(英文)Influence on arteriosclerosis by the serum amyloid A isotypic kind

## 研究代表者

窪川 恵太(kubokawa, keita)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20460420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周病を介したSAAアイソタイプ別による動脈硬化症の発症機序の解明を目的とした。ApoE-/-マウスにIL-6を投与し、肝臓および病変部ともにSAA1、SAA2のmRNA量が有意に発現上昇し、病変部でのICAM-1、VCAM-1、MCP-1、TLR2のmRNAも発現が上昇した。さらに、血管内壁の脂肪沈着量も増大した。また、血管内皮細胞にSAA1、SAA2、SAA3を添加すると、SAA1、SAA2で、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1およびTLR2のmRNA量が有意に発現上昇した。以上のことより、SAAアイソタイプ別による動脈硬化症発症および増悪のさせる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was the pathogenesis elucidation of the mechanism of arteriosclerosis according to another SAA isotype from periodontal disease. As a result of having examined a periodontitis model mouse injected IL-6 to periodontium, quantity of mRNA of SAA1 and SAA2 significantly soared in liver and the lesion. And quantity of mRNA of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, TLR2 developed in the lesion. Furthermore, the aortic lipid deposition was increased. Further, the addition of vascular endothelial cells in SAA1, SAA2, SAA3, when the SAA1 and SAA2, quantity of mRNA of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 and TLR2 was increased significantly. From the above, possibility of the onset and exacerbation of arteriosclerosis according to another SAA isotype was suggested.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：歯周病 動脈硬化症 ApoE-/-マウス SAAアイソタイプ TLR2

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は、マクロファージを主体とした炎症性応答によりアテロームを形成し、血管内腔の狭窄や閉塞をきたす疾患である。現在までに歯周病と動脈硬化性疾患の多様な相互メカニズムが示唆されており、細菌感染やその後に続く炎症・免疫応答による動脈硬化性疾患、および心臓血管疾患 (cardiovascular disease: CVD) の発症または増悪が推察されている。そして、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においても歯周病と CVD の関係が支持されている。また、両疾患の関連性の機序に関しては、歯周炎患者における菌血症や炎症性マーカーの上昇の関与が推察されている。後者の根拠は、炎症反応性タンパク質である C 反応性タンパク (CRP) やる血清アミロイド A (Serum Amyloid A: SAA) の血中濃度の増加が、冠状動脈疾患と強い相関性を示すことが報告されている。また、SAA がアテローム病変を生じている血管の内皮細胞や平滑筋、マクロファージなどで発現していること (Meek, 1994) や、肝臓以外の正常ヒト組織 (特に上皮細胞) でも広範囲に SAA が発現していること (Urieli, 1998) が示され注目されている。しかし、これらのタンパク質が冠状動脈疾患の病因となっているのか、ただ単に炎症状態を示すマーカーであるのかは依然として不明である。

近年、慢性炎症性疾患に合併する続発性アミロイドーシスである AA アミロイドーシスの前駆蛋白質が SAA1 と SAA2 であり、アミロイドからは SAA1 が多く分離されることから、SAA1 が主体となってアミロイドを形成することが確認されている。また、SAA アイソタイプ別による HDL との親和性が異なることが報告され (Yamada, 2009)、SAA アイソタイプ別による作用機序が注目されている。SAA は分子量約 12,000 の蛋白質で主に肝臓から産生され、アポリポ蛋白質としての特徴を持ち、分泌された SAA は HDL と結合して血中を循環している (Benditt, 1997, Cunnan, 2001)。ヒトでは 4 種類の SAA アイソタイプ (SAA1, SAA2, SAA3, SAA4) があり、SAA1 と SAA2 は

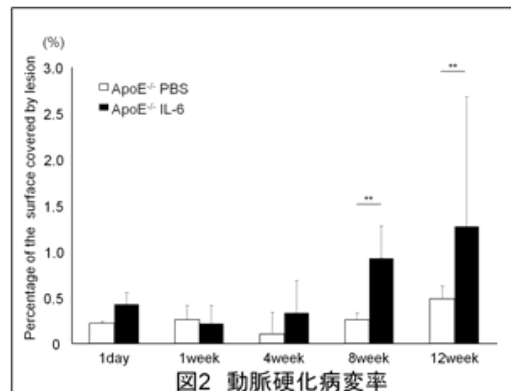
急性期蛋白質として構造上類似しており 90%以上の相同性を示す。SAA3 は偽遺伝子で、SAA4 は HDL の構成成分であるが炎症による発現の変化はほとんど認められない。また、マウスでも 5 つのアイソタイプ (SAA1, SAA2, SAA3, SAA4, SAA5) が同定 (図 1) され、SAA1, SAA2, SAA3 が急性期蛋白質であることが示されている (Uhlir, 1999)。しかしながら、各 SAA アイソタイプの形成機序および生理学的機能は未だ不明である。

	Human	mouse
isotype	SAA1(A-SAA)	SAA1 (A-SAA)
	SAA2(A-SAA)	SAA2 (A-SAA)
	SAA3(pseudogene)	SAA3 (A-SAA)
	SAA4 (C-SAA)	SAA4 (C-SAA)
		SAA5 (pseudogene)
	Acute-phase SAA(A-SAA), Constitutive SAA(C-SAA)	

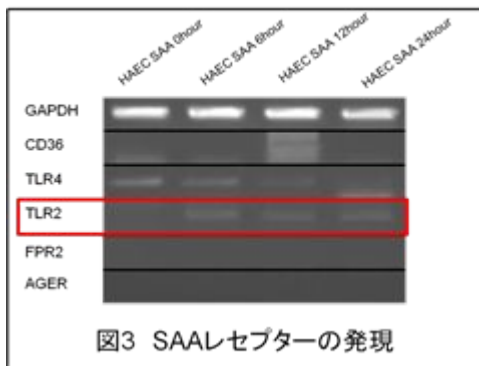
図1 血清アミロイドAアイソタイプの分類

2. 研究の目的

申請者は、現在まで動脈硬化症易形成性である ApoE ノックアウト (ApoE<sup>-/-</sup>) マウスの腹腔内に、歯周組織で産生される炎症性サイトカインの一つである IL-6 を注入した場合、肝臓での SAA mRNA 発現上昇、血中 SAA タンパクの増加に伴い動脈硬化病変が増悪することを明らかにした (図 2)。



また、ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) において SAA 添加により SAA レセプターである TLR2 の発現を確認し (図 3)、動脈硬化症病変部に組織学的検討を行い、TLR2 の発現を見出した。しかし、SAA の動脈硬化病変に対する詳細な作用機序は未だ不明なままである。



そこで本研究課題では、歯周病により産生されるSAAのアイソタイプ別の病変部血管内皮における接着因子(ICAM-1, VCAM-1), 遊走因子(MCP-1)およびTLR2の発現, 亢進の比較を行い, SAAの経路を介した歯周病による動脈硬化症の発症, および増大の詳細なメカニズム解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

ApoE<sup>-/-</sup>マウス歯肉部にIL-6を連続投与(4週連続)による歯周炎誘導性動脈硬化症亢進モデルを用い, (1) In vivo研究にて各SAAアイソタイプを肝臓, 病変部大動脈のmRNA発現および血清蛋白濃度より捻出する。(2) 病変部における動脈硬化程度と接着因子, 遊走因子, SAAレセプターの発現をリアルタイムPCR法, 免疫組織学的解析を行う。(3) In vitro実験にてマウス血管内皮細胞におけるSAAアイソタイプ添加による接着因子, 遊走因子, SAAレセプターの発現をリアルタイムPCRにて解析する。以上よりSAAアイソタイプによる作用機序および動脈硬化症病変部への影響を解析し, SAAを介した歯周病による動脈硬化症の発症, および増大の詳細なメカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

このために当該年度は, 歯周炎誘導性動脈硬化亢進モデルとして, ApoE<sup>-/-</sup>マウスの口腔内よりIL-6を週1度投与し, 1日, 1, 2, 3, 4週で血液, 肝臓, 大動脈を回収し, 肝臓および病変部でのSAA(SAA1, SAA2, SAA3)遺伝子発現, 大動脈での動脈硬化程度, 病変部における接着因子(ICAM-1, VCAM-1), 遊走因

子(MCP-1), SAAレセプター(TLR2)遺伝子発現を観察, 計測した。その結果, 肝臓および病変部ともにSAA3と比較してSAA1, SAA2のmRNA量が有意に発現上昇し, 病変部でのICAM-1, VCAM-1, MCP-1, TLR2のmRNAも発現が上昇した。また, 免疫組織染色にて病変部の血管内皮でICAM-1, VCAM-1, MCP-1, TLR2の発現を確認した。さらに, 血管内壁の脂肪沈着量も増大した。以上より, 歯周病により産生されるIL-6刺激で, 肝臓でのSAA1, SAA2産生が上昇し, 動脈硬化発症を誘導することが確認された。また, 血管内皮細胞における接着因子, 遊走因子およびSAAレセプターの発現より得られた血管内皮細胞にmouse recombinant SAA(SAA1, SAA2, SAA3)を添加した実験群とコントロール群を作成し, 2つの細胞からAllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit(QIAGEN)にてタンパクとRNAを抽出する。抽出したRNAはcDNAに変換し, リアルタイムPCR法にてICAM-1, VCAM-1, MCP-1およびTLR2を解析した。その結果, SAA3と比較してSAA1, SAA2のmRNA量が有意に発現上昇した。

以上のことより, SAAアイソタイプ別による動脈硬化症発症および増悪のさせる可能性が示唆された。今後, さらに本研究を進めることにより, 歯周病による動脈硬化症発症機序の解明および動脈硬化症に対する新規治療法にも応用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1件)

1. A Taguchi, M Miki, A Muto, K Kubokawa, Y Higashi, N Yoshinari. Association between Oral Health and the Risk of Lacunar Infarction in Japanese Adults. Gerontology. 59: 499-506 2013 (査読有) doi: 10.1159/000353707.

[学会発表](計5件)

1. 血清アミロイド A (SAA) の血管内皮細胞への影響:高橋弘太郎,海瀬聖仁,窪川恵太,尾崎友輝,中村 卓,後藤賢亮,石田直之,内田啓一,石原裕一,吉成伸夫 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会(静岡県,浜松市) 2015.9.12

2. 実験的歯周炎の動脈硬化症への影響:高橋弘太郎,海瀬聖仁,尾崎友輝,窪川恵太,武藤昭紀,内田啓一,吉成伸夫 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会(千葉県,千葉市) 2015.5.15

3. 動脈硬化易形成性マウスの加齢変化:海瀬聖仁,高橋弘太郎,窪川恵太,武藤昭紀,三木 学,吉成伸夫 日本老年歯科医学会第 25 回学術大会(福岡県,福岡市) 2014.6.13

4. 動脈硬化易形成性マウスにおける加齢の影響特定:海瀬聖仁,武藤昭紀,窪川恵太,三木 学,岩井由紀子,石岡康明,吉成伸夫 第 139 回日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会(秋田県,秋田市) 2013.10.17

5. The effect of SAA on atherosclerogenesis in ApoE deficient mice: Muto A, Takahashi K, Kaise K, Kubokawa K, Miki M, Taguchi A, Yoshinari N 10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Nara-city, Nara, 2013.9.7

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

窪川 恵太 (KUBOKAWA KEITA)  
松本歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号: 20460420