

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462850

研究課題名(和文) 歯周病原細菌による菌血症モデルを用いた心血管系疾患の発症メカニズムの検討

研究課題名(英文) Analysis of the Mechanism of Cardiovascular Disease using periodontopathic bacteria

研究代表者

藤野 あかね (Fujino, Akane)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20405327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト冠状動脈内皮細胞は、歯周病原細菌由来の内毒素である lipopolysaccharide に対して、炎症性サイトカイン遺伝子の発現が時間依存的に増加した。次に、菌血症モデルでは心臓の炎症性サイトカイン遺伝子の発現がコントロールと比較して有意に増加した。しかしながら、48時間後にはその発現が有意に減少するとともに、骨髄由来免疫細胞の割合が増加した。

歯周病原菌は、冠状動脈内皮細胞および心臓組織全体の炎症を惹起し、骨髄由来免疫細胞が炎症の鎮静化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Gene expression of inflammatory cytokines increased with time in human coronary artery endothelial cells when they were stimulated with lipopolysaccharide, an endotoxin derived from periodontal pathogens. Similarly, gene expression of cardiac inflammatory cytokines increased significantly compared with the control in a model of bacteremia. However, the gene expression of inflammatory cytokines decreased significantly after 48 hours. Instead, the proportion of bone marrow-derived immune cells increased.

These findings suggest that periodontal pathogens cause inflammation in human coronary artery endothelial cells and cardiac tissue, and that bone marrow-derived immune cells may act to reduce the inflammation.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原菌 心血管系疾患 マウス菌血症モデル

## 1. 研究開始当初の背景

- (1)近年、心血管系疾患と歯周病との関係について多数の報告がみられる。これには、歯周病原細菌自体、または lipopolysaccharide (LPS)、その他菌体構成成分が影響を与え、冠動脈血管の内皮細胞や心内膜細胞が関与している可能性が高い。これまでに、代表的な歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 由来タンパクが牛の動脈内皮細胞のアポトーシスを誘導(文献 ) また *P. gingivalis* 抗原がヒト冠動脈血管内皮細胞における Monocyte Chemoattractant Protein(MCP)-1 産生を促進(文献 ) *P. gingivalis* 由来菌血症が動脈内膜肥厚を誘導(文献 ) との報告がある。
- (2)これまでに我々は、マウスに *P. gingivalis* を静脈内投与することで心内膜炎を惹起する可能性(文献 ) や心筋炎もしくは心筋梗塞を惹起する可能性を報告した(文献 )。これらの報告から、歯周病原細菌が心疾患発症を誘導し、その病態経路として冠動脈における免疫応答が重要であるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

- (1)歯周病原細菌に対するマウス由来血管内皮細胞に発現する炎症性サイトカインや接着因子、アポトーシス関連因子について説明する。
- (2)歯周病原細菌を用いて菌血症マウスモデルを作製、心臓ならびに脾臓での歯周病原細菌に対する免疫応答を検討する。

## 3. 研究の方法

- (1)ヒト冠動脈内皮細胞(HCAECs; Human Coronary Artery Endothelial Cells)は、増殖因子 EGM-2MV(EBM™-2 Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2, Single Quots™ Supplements and Growth Factors,

Lonza, Switzerland)を添加した EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium-2, Lonza, Switzerland)培地にて培養、24穴プレートに  $1 \times 10^5$  播種後、*P. gingivalis* LPS (#14946-71, Invivogen, CA)(0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml)で刺激を加えた。刺激6, 24時間後の IL-1, IL-6, TNF- の遺伝子を real-time RT-PCR 法(applied biosystems 7300 real time PCR system, Thermo Fisher Scientific Inc, MA)と ELISA 法にて測定した。また、ICAM, VCAM の細胞接着因子は real-time PCR 法にて測定した。

- (2)16~20週の C57BL/6J マウスに腹腔内注射により *P. gingivalis* LPS 刺激(1.67  $\mu$ g/ml)を与え、菌血症モデルを作製した。1, 3, 48時間後、摘出した心臓は RNA 抽出後(ISOGEN, Nippon Gene, Japan)、cDNA 合成し real-time RT-PCR 法にて炎症性サイトカインの遺伝子発現量を観察した。また、マウス脾臓細胞を各種抗体(抗 CD3e, 抗 CD45R 抗体, 抗 Gr-1 抗体, 抗 CD11c 抗体, 抗 CD11b 抗体)で染色、その割合をフローサイトメトリー(FACS Calibur flow cytometer Becton-Dickinson, Mansfield, MA)で解析した。

## 4. 研究成果

- (1)*P. gingivalis* LPS 刺激6・24時間後、HCAECs の IL-1, IL-6, TNF- の発現は、時間依存的に増加した(図1)。また LPS 刺激後、HCAECs の IL-6 産生は増加、細胞活性は増殖曲線を示した。
- (2)マウスの心臓は、*P. gingivalis* LPS 投与1時間後で IL-6, IL-17, TNF-a の遺伝子発現量が、*P. gingivalis* LPS 投与3時間後で IL-6, IL-17, TNF-a, HMGB1 の遺伝子発現量がコントロールと比較して有意に増加した。また、*P. gingivalis* LPS 投与48時間後では IL-6, IL-17, TNF-a において有意に減少した(図2)。

*P. gingivalis* LPS 投与 48 時間後、脾臓細胞のポピュレーションは、*P. gingivalis* LPS 投与群ではコントロール群と比べて Gr-1 陽性細胞・CD11b 陽性細胞の骨髄細胞の割合の増加を認めた (図 3)

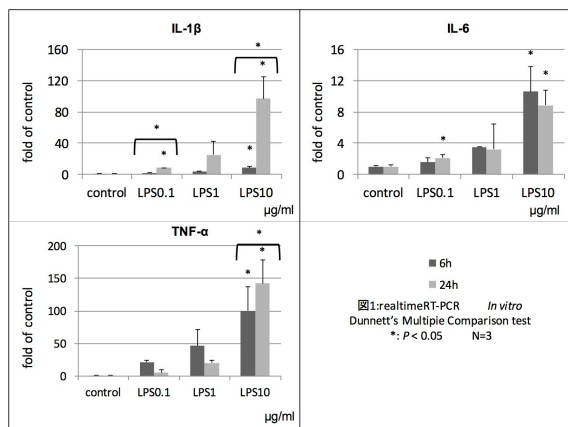


図 1 *P. gingivalis* LPS に対するヒト冠状動脈内皮細胞の炎症性サイトカイン発現

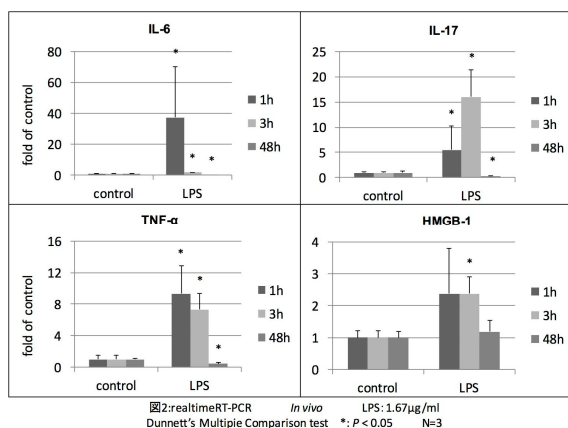


図 2 *P. gingivalis* LPS に対するマウスの心臓の炎症性サイトカイン発現

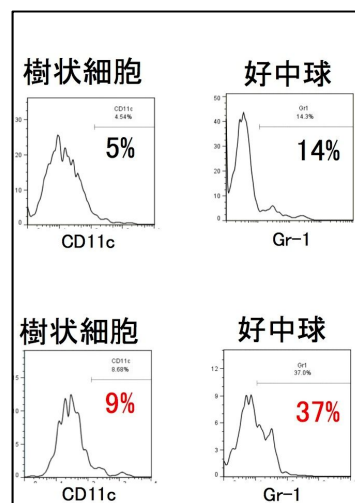
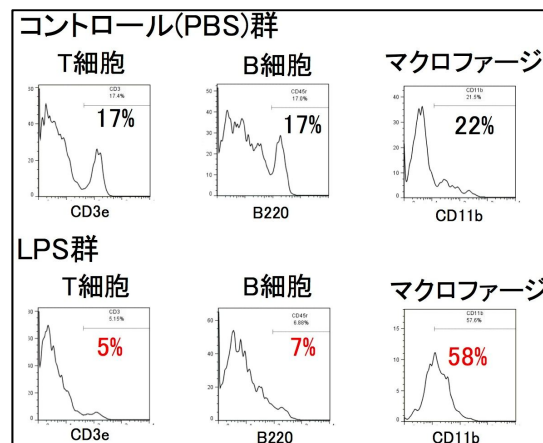


図 3 脾臓細胞における細胞のポピュレーション

#### < 引用文献 >

Tian N, Ouyang XY. Trypsin-like protease-active extracellular protein extracts from *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 induce apoptosis in bovine aortic endothelial cells. J Periodont Res, 45, 2010, 650-657.

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 upregulation of early growth response-1 transcription in human

coronary artery endothelial cells. J Vasc Res, 47, 2009, 346-354.

Hokamura K, Inaba H, Nakano K, Nomura R, Yoshioka H, Taniguchi K, Oshima T, Wada K, Amano A, Umemura K. Molecular analysis of aortic intimal hyperplasia caused by *Porphyromonas gingivalis* infection in mice with endothelial damage. J Periodont Res, 45, 2010, 337-344.

山本俊郎、赤松佑紀、西垣 勝、大迫文重、雨宮 傑、中村 亨、金村成智。P. *gingivalis* 感染に対するマウス心臓の炎症性サイトカイン発現。障歯誌、31、2010、172-178。

Akamatsu Y, Yamamoto T, Yamamoto K, Oseko F, Kanamura N, Imanishi J, Kita M. *Porphyromonas gingivalis* induces myocarditis and/or myocardial infarction in mice and IL-17A is involved in pathogenesis of these diseases. Arch Oral Biol, 56, 2011, 1290-1298.

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：10398406

山本 俊郎（YAMAMOTO Toshiro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：40347472

喜多 正和（KITA Masakazu）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：60153087

金村 成智（KANAMURA Narisato）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：70204542

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

張 端良、山本俊郎、市岡宏顕、藤野あかね、西垣 勝、大迫文重、雨宮 傑、金村成智。歯周病原細菌がヒト冠状動脈内皮細胞に及ぼす影響。第58回秋季日本歯周病学会学術大会。2015年9月12日。アクトシティ浜松（静岡県浜松市）。

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

藤野 あかね（FUJINO Akane）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：20405327

### (2)研究分担者

大迫 文重（OSEKO Fumishige）