

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463148

研究課題名(和文) 血清アミロイドAを介した歯周病から動脈硬化症悪化機序に対する老化への影響

研究課題名(英文) Effects of periodontal disease via serum amyloid A on aging on the mechanism of exacerbation of arteriosclerosis

研究代表者

吉成 伸夫 (Yoshinari, Nobuo)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20231699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、serum amyloid A(SAA)刺激によるヒト大動脈血管内皮細胞(HAECs)に対する老化効果を解析することにより、歯周病からSAAを介した動脈硬化症の悪化、生物学的老化への機序を検索することであった。

21と81歳のドナーのHAECsをSAAで刺激、SAA受容体遺伝子発現を確認したところ、TLR2の発現が著明であった。また、81歳のHEACでは接着分子が強発現しており、炎症応答は強かった。さらに、SA-Gal染色で陽性細胞が多数認められた。

これらの結果からSAA 投与によりTLR2を介して炎症応答、老化応答が高齢者のHAECsにて起こることが推測された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is through searching the aging effect on Human Aortic Endothelial Cells (HAECs) by serum amyloid A (SAA) stimulation, to find the mechanism to biological aging through SAA from periodontal disease via aggravation of atherosclerosis. The donor stimulated two kinds of HAECs, 21 years old and 81 years old, with SAA and confirmed the expressed SAA receptor gene, and the expression of TLR2 was remarkable in both donors. In addition, adhesion molecules were strongly expressed in HAECs of 81-year-old donor, therefore, inflammatory response was stronger in HAECs of the elderly. Furthermore, in the HAECs experimental group of the 81-year-old donor, many positive cells were found by SA-Gal staining.

From these results, it was supposed that SAA administration induced inflammatory responses and aging responses in the aortic vascular endothelial cells of the elderly via TLR2.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 心臓血管疾患 老化

1. 研究開始当初の背景

歯科の疾病構造は著しく高齢者型に変化し、高齢者の増加は、慢性の全身疾患を持つ歯科疾患患者の増加をきたし、歯科の研究課題が、従来の口腔科学に加えて健康科学・生活科学を目指すことを求められている。

歯周疾患では、他臓器疾患(心臓血管疾患: cardiovascular disease: CVD, 糖尿病, 骨粗鬆症, 慢性閉塞性肺炎, 早産・低出生体重児)との多面的, 双方向的関係を検討した疫学研究結果より, 歯周病が他の疾病リスクを増すという疾病相関に基づく新たな治療法の創生が望まれている。

また, 加齢に伴う内的, あるいは外的刺激により, 臓器構成細胞は種々の障害を受け, 各臓器では多様な老化病変が発症する。CVDには様々な疾患が含まれるが, 大部分の原因は動脈硬化症に起因している。動脈硬化性疾患の割合は, 加齢と共に増大し日本の80歳以上の高齢者では癌以上の割合を示している。その最大の危険因子の1つとして, 生物学的老化(加齢に伴って細胞機能の低下をはじめとする生体機能の低下)が動脈硬化進展に寄与すると考えられている。

申請者らは, 動脈硬化易形成マウスである ApoE ノックアウトマウスを長期間飼育することにより, 有意に動脈硬化病変が増加すること, さらに, 老化細胞マーカーである SA- Gal 染色で, 動脈硬化巣で強い陽性反応を示すのを観察している。よって, 高齢者に認める動脈硬化症には加齢に伴う老化という特有の因子が関与すると推測できる。

一方, 歯周病も加齢にともない発症率が著しい増加を示す。歯周病原細菌は, 血管炎を惹起するとともに血栓傾向を高める。また, 動脈硬化症は, 歯周組織の再生力を低下させ, 歯周病原細菌に対する抵抗力を減弱させる。そのため, 歯周病モデルマウス, 高齢マウス, 共に老年性疾患である動脈硬化症が進展することに着目し, 両モデルにおいて増加する因子を検出すべく, 歯周炎誘導性動脈硬化亢進モデルを作製した結果, 急性炎症マーカーである SAA が上昇し, 動脈硬化部位が増大することを見出し, 血管内皮細胞において SAA シグナルにより, toll-like receptors2 (TLR2) を通して動脈硬化発症に関わる接着分子群が発現上昇することを明らかにした。

しかし, 老年性疾患である動脈硬化症において, 歯周病由来 SAA とその受容体を介した生物学的老化に対するメカニズムの詳細は不明であった。

2. 研究の目的

加齢に伴う生物学的老化は, 心臓血管疾患 (CVD) に対する最も有力な危険因子である。しかし, 加齢と CVD の原因となる動脈硬化症を結びつけるメカニズムはまだ解明されていない。申請者らは, 歯周病を惹起させたマウスの末梢血タンパクと肝臓 mRNA において急性炎症マーカーである血清アミロイド A (SAA) が上昇し, マウスの加齢に伴って SAA が上昇することを見出した。そこで, 本研究では SAA, およびその受容体シグナルが血管老化に大きく関与していると考え, 1) 血管内皮細胞における老化に関わる SAA 受容体を解析, 2) SAA 刺激による高齢ヒト大動脈血管内皮細胞に対する老化効果を解析することにより, 歯周病から SAA を介して, 生物学的老化へのメカニズムの詳細を明らかにすることを目的とし研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) ヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) の培養

HEAC を専用培地で, 12 穴プレートに各 5×10^5 個を播種し, コンフルエントになるまで 37 °C, 5% CO₂ 下で培養を行い, コンフルエントに達した細胞を, 無血清専用培地に交換し, human recombinant SAA (hSAA) を 20 μg/ml の濃度で添加し実験群とした。また, PBS 添加群を対照群とし, 20 日間継代培養を行った。

(2) HAEC の長期間培養による SAA 受容体, 各種接着分子の遺伝子発現の確認

(1) の細胞から All Prep DNA/RNA/Protein Mini Kit にてタンパクと mRNA を抽出した。抽出した mRNA は逆転写を行い, cDNA に変換, real-time PCR 法にて各種 SAA 受容体 (TLR2, TLR4, CST3, ABCA1, ABCA7, CD36, SCARB1, FPR2, AGER) の発現を比較した。すでに申請者らは, SAA による動脈硬化に対して TLR2 が重要であることを確認しているが, 細胞老化による SAA 受容体発現を確認するために, 候補受容体のすべてを確認した。さらに, SAA シグナルにより, 動脈硬化発症に関わる接着分子群 (ICAM1, VCAM1, MCP1, E-Selectin, P-Selectin, L-Selectin) が発現上昇しているかどうか real-time PCR 法にて検討した。

(3) SAA による老化マーカーの発現の確認

(1) の細胞に発現する老化細胞マーカーである SA- Gal (senescence-associated-galactosidase) を染色にて, また, 老化マーカー遺伝子 (p53, p21) を real-time PCR 法にて確認し, 対照群と老化マーカーの発現を比較した。

以上より, 老年性疾患である動脈硬化症において, SAA とその受容体シグナルを介した機序から, 歯周病と生物学的老化の関係を検討した。

4. 研究成果

ドナーが 21 歳と 81 歳の 2 種類の HAEC を 20 日間継代培養し、発現する SAA 受容体遺伝子発現を real-time PCR 法にて確認したところ、両ドナーとも実験群で TLR2 のみ発現が著明であった。また、21 歳ドナーの HEAC では E-Selectin が(図 1)、81 歳ドナーの HEAC では P-Selectin が強発現しており、81 歳ドナーの発現が強かった(図 2)。すなわち、高齢者のヒト大動脈血管内皮細胞の方が SAA に対して炎症応答が強かった。

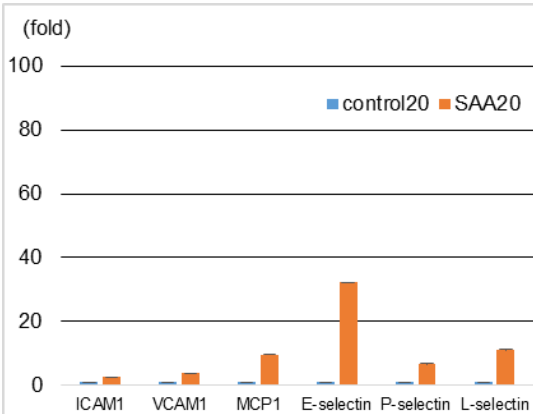


図1. 21歳HAEC 接着分子発現

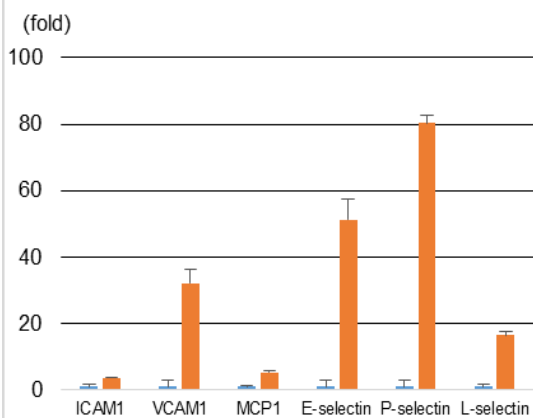


図2. 81歳HAEC 接着分子発現

さらに、81 歳ドナーの HEAC 実験群では SA-Gal 染色で陽性細胞が多数認められたが、21 歳ドナーの HEAC 実験群、あるいは対照群ではほとんど認められなかった。これらの結果から SAA 投与により TLR 2 を介して炎症応答、老化応答が高齢者の大動脈血管内皮細胞にて起こっていることが推測されるが、老化マーカー遺伝子(p53, p21)の発現に関してはドナー年齢、実験群、対照群間で有意な変動はなく今後の更に詳細な検討が必要とされた。

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 8 件)

(1) E. Kakuta, Y. Nomura, T. Morozumi, T. Nakagawa, T. Nakamura, K. Noguchi, A. Yoshimura, Y. Hara, O. Fujise, F. Nishimura, T. Kono, M. Umeda, M. Fukuda, T. Noguchi, N. Yoshinari (15 番目), (他 22 名), Assessing the progression of chronic periodontitis using subgingival pathogen levels: a 24-month prospective multicenter cohort study. *BMC Oral Health* 17(査読有) doi: 10.1186/s12903-017-0337-x.

(2) Yorimasa Ogata, Yohei Nakayama, Junichi Tatsumi, Takehiko Kubota, Shuichi Sato, Nobuo Yoshinari (44 番目), (50 名) Prevalence and risk factors for peri implant diseases in Japanese adult patients. *Journal of Oral Science* (査読有) 59: 1-11 2017

(3) 牧 茂, 荒 敏昭, 竹内由里, 岩井由紀子, 吉成伸夫, 佐藤 晶, 前島信也. 歯周疾患の病態に関する栄養学的視点を含めた総合的分析. *松本歯学* (査読有) 42: 91-103 2016

(4) 牧 茂, 荒 敏昭, 竹内由里, 岩井由紀子, 吉成伸夫, 佐藤 晶, 前島信也. 現在歯数に関連する因子 特に生理学的, 血液生化学的, 栄養学的視点から. *松本歯学* (査読有) 42: 16-24 2016

(5) Morozumi T, Nakagawa T, Nomura Y, Sugaya T, Yoshinari N (23 番目), (他 32 名), Salivary pathogen and serum antibody to assess the progression of chronic periodontitis: a 24-month prospective multicenter cohort study. *J Periodont Res* (査読有) 51: 768-778 2016

(6) S Ymamura, K Uchida, Y Iwamoto, N Sugino, N Yoshinari, H Kagami, A Taguchi. Panoramic radiography measurements, osteoporosis diagnoses and fractures in Japanese men and women. *Oral Diseases* (査読有) 21: 335-341 2015

(7) Takahiro Nakayama, Gnanasagar J. Thirukonda, Sakae Nagasawa, Ichiro Kawahara, Nobuyuki Udagawa, Kimitoshi Yagami, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada, Yutaka Doi, Nobuo Yoshinari, Naoyuki Takahashi. Polarization of osteoclasts on dental implant materials is similar to that observed

on bone. Journal of Oral Biosciences (査読有) 56: 136-142 2014

- (8) Noriyasu Mochizuki, Noriyuki Sugino, Tadashi Ninomiya, Nobuo Yoshinari, Nobuyuki Udagawa and Akira Taguchi. Association of cortical shape of the mandible on panoramic radiographs with mandibular trabecular bone structure in Japanese adults: a cone-beam CT image analysis. Oral Radiol (査読有) 30: 160-167 2014

[学会発表](計7件)

- (1) Nobuo Yoshinari, Yukiko Iwai, Akira Taguchi, Yasuaki Ishioka, Keita Kubokawa, Keiichi Uchida. Analysis of the relationship between periodontal disease and diabetes mellitus. 102nd Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration the Japanese Society of Periodontology and Japanese Academy of Clinical Periodontology, Convention Center (San Diego), USA, 2016.9.12
- (2) Nobuo Yoshinari, Kotaro Takahashi, Kiyohito Kaise, Murtaza Saleem, Yuki Ozaki, Suguru Nakamura, Keita Kubokawa, Yuichi Ishihara. The effect of serum amyloid A for endothelial cell. The 94th Annual Meeting of International Association for Dental Research, COEX Convention Center (Seoul), Korea, 2016.6.24
- (3) 吉成伸夫. 血清アミロイドAは動脈硬化症を進展させる. 第15回松本ポーンフォーラム, 信州大学医学部講堂(松本), 2016.5.27
- (4) 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. 血清アミロイドA(SAA)の血管内皮細胞への影響. 第58回秋季日本歯周病学会, アクトシティー浜松(浜松), 2015. 9.12
- (5) 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. 実験的歯周炎の動脈硬化症への影響. 第58回春季日本歯周病学会, 幕張メッセ(千葉), 2015.5.15
- (6) Kotaro Takahashi, Kiyohito Kaise,

Murtaza Saleem, Yuki Ozaki, Keita Kubokawa, Akinori Muto, Nobuo Yoshinari. IL-6 injection from the periodontal tissue accelerates arteriosclerosis. 第62回国際歯科学研究学会日本部会(JADR) KKRホテル大阪(大阪), 2014.12.4

- (7) 海瀬聖仁, 高橋弘太郎, 窪川恵太, 武藤昭紀, 三木学, 吉成伸夫. 動脈硬化易形成性マウスの加齢変化. 日本老年歯科医学会第25回学術大会, 電気ビルみらいホール(福岡), 2014.6.13

[図書](計9件)

- (1) 吉成伸夫. インプラント周囲炎とレーザー 一般社団法人 日本レーザー歯学会編 渡辺 久監修 CHAPTER 1 インプラント周囲炎の概要と病因 Section 1 歯周病学的立場から CHAPTER 5 インプラント周囲炎治療の従来法 Section 3 インプラント周囲炎治療の文献的考察 10-15, 91-94, 2017年5月10日 クインテッセンス出版株式会社
- (2) 横井隆政, 西田英作, 吉成伸夫. 改訂版 口腔ケア基礎知識 口腔ケア4級・5級認定資格準拠 編集 一般社団法人日本口腔ケア学会 歯周病とは 231-234, 2017年4月7日 株式会社永末書店
- (3) 吉成伸夫, 海瀬聖仁. 言語聴覚士のための基礎知識 臨床歯科医学・口腔外科学 第2版 第2章臨床歯科医学 D 歯周組織の疾患 58-62, 2016年12月1日 株式会社 医学書院
- (4) 山崎和久, 梅田 誠, 吉成伸夫. 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編 歯周病と全身の健康 第2部 細胞・分子のメカニズム 2) 歯周炎と動脈硬化症の関連メカニズム 40-47, 2016年3月25日 医歯薬出版株式会社
- (5) 石原裕一, 吉成伸夫. 患者さんに語る シンプル歯周治療 吉江弘正、和泉雄一編 II 細菌・感染のコントロール 2 見えるブランク コンプライアンスからアドヒアランス(患者主導)へ、効果的なブランクコントロール VI 予防と介護に向けて 2 フレイル(虚弱)患者の歯周治療はどこがちがう 幅広いゆるいゴールの設定, 要介護期への準備: 感染除去とシンプルな口腔 40-47, 94-97, 2016年3月10日 医歯薬出版株式会社

- (6) 吉成伸夫. 特定非営利活動法人 日本歯周病学会編 糖尿病患者に対する歯周ガイドライン改訂第2版 2014 2 歯周治療と糖尿病 5)歯周組織再生療法, インプラント治療 69-78, 2015. 3. 20 医歯薬出版株式会社
- (7) 吉成伸夫. 口腔インプラント学学術用語集 第3版 歯周53- 64, 2014. 6. 10 歯出版株式会社
- (8) 三木 学, 武藤昭紀, 吉成伸夫. ザ・ペリオドントロジー 監修: 和泉雄一, 沼部幸博, 山本松男, 木下淳博 第9章 ペリオドンタルメディシン5. 歯周病と骨粗鬆症、第10章歯周組織の突発病変への対応5. 歯周外科処置後における持続性出血の対策6. 急性および慢性疼痛 251-252, 266-267, 268-269, 2014. 3. 28 株式会社永末書店
- (9) 吉成伸夫. 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ 患者さんの生涯にわたるQOL に貢献するために第5章 基本治療の限界を超えた歯周組織の問題に, どのように対応するのか? 歯周基本治療後に残存した歯周ポケットへの対応 2)組織再生誘導法(GTR法) 139-144, 2014.2.20 医歯薬出版株式会社

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉成 伸夫 (YOSHINARI NOBUO)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20231699

(2)研究分担者

田口 明 (TAGUCHI AKIRA)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70243582

小出 雅則 (KOIDE MASANORI)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 10367617

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

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高橋 弘太郎 (TAKAHASHI KOTAROU)
松本歯科大学・歯学部・大学院生