

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893303

研究課題名(和文) 歯周病が動脈硬化に及ぼす影響についてのメカニズムの検討

研究課題名(英文) The investigation of the effects of periodontitis on atherosclerosis

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) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性炎症性疾患である歯周病が動脈硬化に及ぼす影響についての検討を行った。

in vivo の実験では、マウスの上顎第二臼歯にワイヤーを結さつして歯周病を惹起させ、その後にこのマウスの左大腿動脈をワイヤーで擦過し、マウスモデルを作成した。マウスから血液や組織などのサンプルを回収することができた。in vitroの実験では、ヒト大動脈平滑筋細胞(HASMC)を用いてLipopolysaccharide(LPS)を投与して増殖実験を行い、MTTとBrdUを用いた評価を行ったところ、LPSを投与した場合にHASMCが最も増殖しやすい条件が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on periodontal disease that is a chronic inflammatory disease. We investigated the effects of periodontitis on atherosclerosis.

In the in vivo experiments, we ligated the maxillary second molar of the mouse with wire to cause periodontal disease, and then the mouse were subjected to wire injury operation of the left femoral artery. We were able to collect the samples of blood and/or tissue from the mouse. In the in vitro experiments, to investigate the effects of periodontitis on SMC growth at a mechanistic level, HASMCs were treated with LPS. Cell number was assessed by MTS-based assay. DNA synthesis was measured with a BrdU proliferation assay kit. A condition of the LPS which HASMC was easy to growth became clear.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 歯周病

1. 研究開始当初の背景

炎症が動脈硬化の形成に関連するという研究報告は、心血管系疾患のメカニズムの解明に新たな方向性をもたらした(Ross. N Engl J Med, 340:115-26, 1999)。また、歯周炎は歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患であり、グラム陰性嫌気性菌である歯周病関連細菌の代謝産物と生体細胞との相互作用により炎症反応が亢進し、歯肉の炎症及び歯槽骨の吸収が進行するものである。慢性炎症性疾患である歯周病とアテローム性動脈硬化の間には、有意な相関関係があることも示唆されている(Beck et al, Atheroscler Thromb Vasc Biol, 21:1816-22, 2001)。しかしながら歯周病と動脈硬化に関する数多くの研究が報告されているものの、歯周病が動脈硬化に關与する詳細なメカニズムについては明らかにはなっていない。申請者は、これまでに**血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞の増殖、遊走と新生内皮形成の機序について研究し、骨格筋由来分泌蛋白である Fst11 が部分的には AMPK シグナルを介して新生内皮増殖を抑制することを明らかにした**(Miyabe et al : Cardiovasc Res, 103: 111-20, 2014)。

申請者が所属する愛知学院大学歯学部内科学講座では実験的歯周炎惹起モデルを用いて、糖尿病ラットでは正常ラットと比較して炎症反応が増強しており、その機序の一つにニトロ化ストレスの関与が考えられることことを報告しており、糖尿病や動脈硬化、糖尿病と歯周病の炎症における関連などの研究を実施している(Nishikawa et al, J Clin Periodontol, 39:342-9, 2012)。こうした先行研究より、病的な血管リモデリングがアテローム性動脈硬化等の心血管病進展における重要な役割を果たすことから、血管リモデリングにおいて血管平滑筋の増殖、遊走が新生内皮形成と血管狭窄に重要であると考えている。本研究では、これまでの実験手技を活かして、血管リモデリングにおける歯周病の關与について解明を目指した。

2. 研究の目的

申請者は、先行研究において、病的な血管壁のリモデリングにおいて血管平滑筋細胞の増殖、遊走は新生内皮形成と血管狭窄が重要な要素であること、血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞の増殖と遊走において AMPK シグナルの活性化が重要であることを明らかにした。本研究では、血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞の増殖、遊走およびそのシグナルに対する歯周病の影響を明らかにすることで、歯周病が血管リモデリングに及ぼす影響とそのメカニズムについて

明らかにする。

3. 研究の方法

[in vivo 実験]

マウスに実験的歯周炎を惹起した後、大腿動脈擦過モデルを作成し、擦過部位の大腿動脈を組織染色し、新生内皮の評価を行う(I/M ratio の測定)。他にも、マウスから血液やその他の組織を回収し、炎症における影響を検討する。

[in vitro 実験]

培養ヒト血管平滑筋細胞を用いて、歯周病が血管リモデリングにおける重要な要素である血管平滑筋の増殖に及ぼす影響とそのメカニズムを細胞レベルで明らかにする目的で lipopolysaccharide(LPS) 投与群と対照群に対し、細胞増殖、遊走能、細胞内シグナルについて検討する。特に細胞内シグナルにおいては平滑筋細胞の増殖に対して得られた結果が LPS 阻害薬等で解消されるか否かについても検討する。

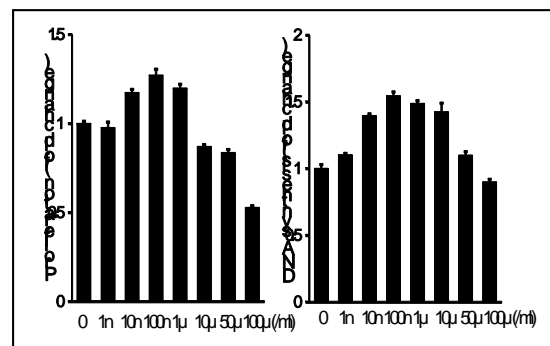
4. 研究成果

[in vivo 実験]

最初に、実験的歯周炎を惹起したマウスから大腿動脈、大動脈、血液等のサンプルを採取し、歯周病を惹起したことによる炎症の評価を行い、併せて大腿動脈の擦過手術を実施する時期の検討を行った。また、作成したモデルマウスから擦過部位の大腿動脈、及び大動脈、心臓、血液等のサンプルを採取した。現在、これらの採取サンプルから炎症による影響の継時的変化を明らかにするため、解析中である。

[in vitro 実験]

これまでの培養ヒト血管平滑筋細胞 (HSMC) を用いて実施した研究では、lipopolysaccharide (LPS) 投与により濃度依存性に HSMC が増殖することを明らかにした。



また、HSMC の増殖に関する経路については現在検討を行っているところであり、同様に HSMC の遊走能についても検討中である。

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)

Omi M, Miyabe M (他 11 名、4 番目) et al: Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. Journal of Diabetes Investigation. 2015 (in press). 査読有
DOI: 10.1111/jdi.12452.

Suzuki S, Miyabe M (他 16 名、3 番目) et al: Anti-inflammatory role of glucose-dependent insulin tropic polypeptide (GIP) in periodontitis. Atherosclerosis. Journal of Diabetes Investigation. 2015 (in press). 査読有
DOI: 10.1111/jdi.12450

Hata M, Miyabe M (他 12 名、6 番目) et al: Transplantation of cultured dental pulp stem cells into the skeletal muscles ameliorated diabetic polyneuropathy: therapeutic plausibility of freshly isolated and cryopreserved dental pulp stem cells. Stem Cell Res Ther. 2015 Sep 7;6:162. 査読有
DOI: 10.1186/s13287-015-0156-4.

Hayakawa S, Miyabe M (他 15 名、5 番目) et al: Cardiac myocyte-derived follistatin-like 1 prevents renal injury in a subtotal nephrectomy model. J Am Soc Nephrol. 2015 Mar;26:636-46. 査読有
DOI: 10.1681/ASN.2014020210.

[学会発表](計 8 件)

大見真衣子, 宮部 愛 (他 8 名、6 番目): 糖尿病性神経障害に対する歯髄幹細胞移植療法の治療効果とメカニズムの検討. 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、京都大学(京都市), 2015.2.13.

Miyajima S, Miyabe M

(他 6 名、4 番目): Circulating monocytes/macrophages activated by periodontitis induced early inflammatory response in aorta. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka (Japan), 2015.4.25.

Nakamura N, Miyabe M (他 3 名、3 番目): Chemerin, a novel adipocytokine, regulates angiogenesis. The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Osaka (Japan), 2015.4.25.

鈴木佑基, 宮部 愛 (他 17 名、4 番目),: GIP による歯周炎抑制経路の検討. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、海峡メッセ下関(下関市), 2015.5.22.

大見真衣子, 成瀬桂子, 秦 正樹, 小林泰子, 中村信久, 宮部 愛, 尾澤昌悟, 田中貴信, 松原達昭: 歯髄幹細胞移植療法の糖尿病性神経障害に対する治療効果とその抗炎症メカニズムの検討. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、海峡メッセ下関(下関市), 2015.5.23.

Omi M, Miyabe M (他 8 名、6 番目): The immunomodulatory effects of dental pulp stem cells on diabetic polyneuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. American Diabetes Association, 75th Scientific Sessions, Boston(USA), 2015.6.6.

Suzuki Y, Miyabe M (他 13 名、3 番目): GIP suppresses periodontitis by inhibition of inflammatory cytokine gene expressions. American Diabetes Association, 75th Scientific Sessions, Boston(USA), 2015.6.6.

Miyajima S, Miyabe M (他 6 名、4 番目): Periodontitis-activated monocytes/macrophages are possible mediators for the induction of the aortic inflammatory response. 第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術総会, 仙台国

際センター(仙台市青葉区) ,2015.7.10.

6 . 研究組織

(1)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