

氏名	ほんだ ともゆき 本田 朋之
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第70号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Effects of <i>Porphyromonas gingivalis</i> antigens and proinflammatory cytokines on human coronary artery endothelial cells (ヒト冠状動脈血管内皮細胞における <i>Porphyromonas gingivalis</i> 抗原および炎症性サイトカインの及ぼす影響)
論文審査委員	主査 教授 山崎 和久 副査 教授 織田 公光 教授 吉江 弘正

#### 博士論文の要旨

##### 【目的】

近年、歯周炎が冠動脈性心疾患の原因である動脈硬化症のリスク因子となり得ることが疫学調査や動物実験により示唆されている。しかし、両者を関連付けるメカニズムについては未だ十分に解明されていない。動脈硬化症は単純なコレステロールの動脈壁への沈着により生ずるものではなく、単球・リンパ球の浸潤とそれらが産生するサイトカインなどによる炎症反応として捉えられており、その誘発・増悪因子として微生物感染の関与も明らかとなっている。我々は以前、歯周炎患者における血清中の炎症関連マーカーについて歯周治療前後および健常者のそれと比較検討した。その結果、高感度CRP値が健常者よりも高く、歯周治療により改善を認めたことを示し、歯周炎が全身の炎症状態に影響を及ぼしている可能性を示唆した。今回我々は、歯周炎の動脈硬化症への関与として歯周組織局所における感染と炎症反応が全身循環を経て血管内皮に傷害を与える可能性に着目し、歯周病原細菌成分および炎症性サイトカインのヒト冠状動脈血管内皮細胞に及ぼす影響について検討した。

##### 【材料および方法】

ヒト冠状動脈血管内皮細胞(HCAEC)を増殖因子EGM-2MVを添加したEBM-2培地にて継代(8-12代)培養し実験に供した。HCAECを*Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*)由来細菌抗原であるlipopolysaccharide, outer membrane protein, GroELおよび炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ にて刺激後、接着分子intercellular adhesion molecule(ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule(VCAM)-1の発現をCell-ELISA法にて、サイトカインIL-6およびケモカインMCP-1の産生をELISA法にて測定した。また、細菌抗原認識分子toll-like receptor 4(TLR4), TLR2のmRNA発現をRT-PCR法およびReal-time PCR法にて解析した。

##### 【結果】

1. *P. gingivalis*抗原および炎症性サイトカイン刺激の濃度依存的にICAM-1発現の上昇が認められた。炎症性サイトカイン刺激の濃度依存的にVCAM-1発現の上昇が認め

- られたが、*P. gingivalis* 抗原刺激による VCAM-1 発現への影響は認められなかった。
2. 炎症性サイトカイン刺激の濃度依存的に IL-6, MCP-1 産生の増加が認められた。特に IL-1 $\beta$  刺激は IL-6 産生に対して顕著な影響を与えた。しかし、*P. gingivalis* 抗原刺激による IL-6, MCP-1 産生への影響は認められなかった。
  3. HCAEC において TLR4 の恒常的な発現が認められた。また、低濃度の炎症性サイトカイン刺激により TLR2 発現が誘導された。

#### 【考察】

炎症性サイトカインは血管内皮細胞の接着分子発現およびサイトカイン・ケモカイン産生に対し著明な影響を及ぼし、*P. gingivalis* 抗原においてもその影響が認められた。今回の実験で血管内皮細胞が反応を示した刺激濃度は、いずれも歯周炎患者における血中濃度と比較すると高濃度である。しかし、濃度依存的な反応がみられたことを考慮すると、低濃度においても血管内皮細胞に影響を与えている可能性は考えられ、また種々の炎症性サイトカインや細菌成分が血管内皮細胞に対し複合的に作用することで相乗的な効果が生ずる可能性も考えられる。

#### 【結論】

歯周組織における感染が全身の炎症状態に影響を与えることにより、血管内皮への傷害とそれに続く動脈硬化に関与する可能性が示唆された。

#### 審査結果の要旨

近年、歯性感染症を含む慢性感染症が様々な冠動脈性心疾患や動脈硬化性脳血管疾患などの全身疾患のリスク因子になり得ることが疫学調査により示唆されており、いわゆるペリオドンタルメディスンが有目されている。冠動脈性心疾患の原因である動脈硬化症は単純なコレステロールの動脈壁への沈着により生ずるのではなく、その発症・進行には単球・リンパ球の浸潤とそれらが産生するサイトカインなどによる炎症反応として捉えられている。その炎症反応の誘発・増悪因子として *Chlamydia pneumoniae* などの微生物感染が関与していることが明らかにされてきているが、Case-control study では歯周疾患などの歯性感染症は Chlamydia 感染と同等かそれ以上の相対危険度をもって有意に関連していることも報告されている。しかしながら、Case-control study や Cross-sectional study では原因として作用したのか他の要因があって結果として異なる病態が現れているのかを明らかにすることはできない。

細菌感染により誘発される慢性炎症の全身に及ぼす影響については、以下に挙げる 4 項目が考えられてきた。

1. 感染局所から侵入した細菌成分の直接作用
2. 感染局所で産生された炎症性サイトカインの遠隔作用
3. 活性化された免疫細胞による内皮の傷害
4. 細菌成分と自己成分の相同性に由来する自己免疫応答

本研究ではこれらのうち 1. 2. の 2 項目に注目し、歯周炎と動脈硬化症の関連について検討してきた。動脈硬化病変部血管内皮に傷害を与える可能性について明らかにするため、以下の方法で解析した。ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) を *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 由来細菌抗原である lipopolysaccharide, outer membrane protein, GroEL および炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  にて刺激後、接着分子 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 の発現を Cell-ELISA 法にて、サイトカイン IL-6 およびケモカイン MCP-1 の産生を ELISA 法にて測定した。また、細菌抗原認識分子 toll-like receptor 4 (TLR4), TLR2 の mRNA 発現を RT-PCR 法および Real-time PCR 法にて解析した。

その結果 *P. gingivalis* 抗原および炎症性サイトカイン刺激の濃度依存的に ICAM-1 発現の上昇が認められた。炎症性サイトカイン刺激の濃度依存的に VCAM-1 発現の上昇が認められたが、*P. gingivalis* 抗原刺激による VCAM-1 発現への影響は認められなかった。炎症性サイトカイン刺激の濃度依存的に IL-6, MCP-1 産生の増加が認められた。特に IL-1・刺激は IL-6 産生に対して顕著な影響を与えた。しかし、*P. gingivalis* 抗原刺激による IL-6, MCP-1 産生への影響は認められなかった。HCAEC において TLR4 の恒常的な発現が認められた。また、低濃度の炎症性サイトカイン刺激により TLR2 発現が誘導された。

これまでの報告よりもより低濃度の LPS 刺激にて冠状動脈血管内皮細胞の傷害が認められ、また、歯周炎患者の全身循環レベルでの炎症性サイトカイン刺激が内皮細胞の抗原認識能に影響を及ぼすことを示した。これらのことから歯周炎が全身循環を経て動脈硬化病変の形成に関与することが明らかにされたことは極めて興味深い。

本研究はペリオドンタルメディスンの分子メカニズム解明に寄与するものであり、学位論文として十分な価値を認める。