

博士(医学) 外村和也

論文題目

Molecular analysis of aortic intimal hyperplasia caused by *Porphyromonas gingivalis* infection in mice with endothelial damage

(マウス血管内皮傷害部位での *Porphyromonas gingivalis* 感染による内膜肥厚の分子学的解析)

論文の内容の要旨

[はじめに]

口腔内細菌が心内膜炎、バージャー病、動脈硬化など心血管疾患の発症に関与しているといわれている。口腔内に存在する細菌が他の臓器へ浸潤するには、菌がまず血管内に侵入することが不可欠である。たとえば、う蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は歯科治療による口腔の傷害を介して、また歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は慢性的な歯周炎により菌が血液中に侵入することが考えられている。しかし、これら口腔内細菌が傷害や炎症に伴い血管内に侵入し菌血症を起こしたとしても、その菌が傷害臓器にどのように蓄積し、障害を起こすか未だ詳細に解明されていない。

そこで口腔内細菌の感染により動脈硬化を起こす動物モデルの確立を試み、さらにそのモデルを用いて動脈硬化が増悪するメカニズムの解明を行った。

[材料ならびに方法]

in vivo 実験には ICR 雄性マウス 8 週齢を供した。内皮傷害モデルには photochemical induced thrombosis (PIT) モデルを用いた。ペントバルビタール (40 mg/kg) を腹腔内投与し、保温パッド上にマウスを仰臥位にて固定した。左大腿動脈を露出し、直径 3 mm のプローブを大腿動脈上に留置した。血管の末梢側にはパルス・ドプラ血流計のプローブを留置し、緑色光照射開始から 10 分以内に動脈血流が閉塞したことを確認し、動物を麻酔から回復させた。内皮傷害から 24 時間後に頸静脈より *P. gingivalis* または *S. mutans* を投与した。口腔内細菌の投与から 28 日後に血管を採取し、内膜肥厚の度合いを内膜/中膜比にて評価した。またメカニズム解明のため、6 時間後、1 および 7 日目に血管組織を摘出しマイクロアレイなどの解析に用いた。

[結果]

内皮傷害から 30 日後では 2 層程度の内膜肥厚が形成されていたが、内皮傷害後に *P. gingivalis* を投与した群では、明らかに内膜肥厚の増悪が認められた。一方、内皮傷害をせずに、*P. gingivalis* のみを投与した群では内膜肥厚は観察されなかった。また、内皮傷害後に *S. mutans* を投与した群では、内膜肥厚に対して影響を及ぼさなかった。

P. gingivalis による内膜肥厚のメカニズムを解明するために、傷害部位の血管組織を用いマイクロアレイ法による解析を行ったところ、カルシウム結合タンパク S100A9 の発現が増加していた。

[考察]

P. gingivalis は血管内皮の傷害部位において平滑筋細胞の増殖を促進し、結果として血管内膜の肥厚を増悪することが示唆された。動物実験および培養細胞を用いた検討から、*P. gingivalis* により平滑筋細胞での S100A9 タンパクの増加とそれに伴う増殖型への形質転換が誘発され、それが内膜肥厚の増悪に重要であることが示された。また *in vitro* 実験において、血漿と *P. gingivalis* を混合した後の上清を培養平滑筋細胞に滴下したところ、平滑筋細胞の増殖がみられた。また合成

型となった平滑筋細胞には S100A9 が発現していた。siRNA を用い、S100A9 をノックダウンした細胞に上清を滴下した時には、平滑筋細胞の増殖が抑制された。

P. gingivalis 由来の S100A9 タンパク発現誘導因子の同定までは至らなかったが、少なくとも誘導された S100A9 は細胞外に放出されることにより周辺細胞の receptor for advanced glycation end products と結合し、mitogen-activated protein kinase や nuclear factor-kappa B 経路を活性化することにより平滑筋細胞の更なる増殖を促進しているものと考えられる。このことから、S100A9 が治療の標的分子の可能性や増悪のバイオマーカーになりうる可能性も示唆される。

[結論]

口腔内細菌である *P. gingivalis* の感染により、内膜肥厚の増悪を定量的に評価できる動物モデルを確立した。このモデルを用いることにより *P. gingivalis* が血管内皮傷害部位に集積し、平滑筋細胞の S100A9 発現増加を介して内膜肥厚を増悪することを示した。さらに S100A9 自体が内膜肥厚の病態予測、および治療標的分子となりうる可能性も示唆された。

論文審査の結果の要旨

口腔内細菌(*Streptococcus mutans*:*S. mutans*; *Porphyromonas gingivalis*:*P. gingivalis*)の心血管疾患発症への関与が注目されている。申請者らは、口腔内細菌の感染により動脈硬化を起こす動物モデルの確立を試み、さらにそのモデルを用いて動脈硬化が増悪するメカニズムの解明を行った。

本研究では、photochemical induced thrombosis (PIT)法により 8 週齢の雄性マウスの左大腿動脈血管内皮を傷害し、傷害 24 時間後に頸静脈より *P. gingivalis* または *S. mutans* を投与した。PIT 法による内皮傷害によって内膜肥厚が惹起され、さらに *P. gingivalis* を投与した群では明らかな内膜肥厚の増悪が認められた。しかし、*S. mutans* 投与群では増悪は認められず、内皮を傷害せずに *P. gingivalis* のみを投与した群では内膜肥厚は観察されなかった。マイクロアレイ解析では、*P. gingivalis* による内膜肥厚部位にカルシウム結合タンパク S100A9 の発現増加が認められた。*P. gingivalis* により平滑筋細胞での S100A9 タンパクの増加とそれに伴う増殖型への形質転換が誘発され、siRNA による S100A9 のノックダウン細胞では増殖が抑制された。

本研究は、口腔内細菌 *P. gingivalis* 感染による内膜肥厚動物モデルを確立し、さらに *P. gingivalis* が血管傷害部位において平滑筋細胞の S100A9 発現増加を介して内膜肥厚を増悪することを明らかにした。この結果は、S100A9 が内膜肥厚の病態予測、および治療標的分子となりうる可能性を示唆したものであり高く評価される。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	渡邊 裕司
	副査	浦野 哲盟
		副査 問賀田 泰寛