

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名 松 尾 一 朗
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 甲 第 517 号
学位授与年月日 令和 4 年 3 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目 Effects of chronic *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide infusion on cardiac dysfunction in mice
(歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来内毒素の慢性投与におけるマウス心機能障害に及ぼす影響)
Journal of Oral Biosciences 第 62 巻 第 4 号 357 頁～ 362 頁掲載 2021 年 10 月 13 日発行
論 文 審 査 委 員 主査 教授 河 原 博
副査 教授 里 村 一 人 副査 教授 五 味 一 博

内 容 の 要 旨

【背 景】

歯周病は歯周病原細菌の内毒素 (lipopolysaccharide ; LPS) によって引き起こされる慢性炎症性疾患である。厚生労働省歯科疾患実態調査 (2016 年度) によると成人の約 70% が歯周病に罹患していることが報告されている。慢性歯周炎は歯と歯周組織の付着機構の破壊をもたらし深い歯周ポケットが形成される炎症性疾患である。歯周ポケット内に存在するグラム陰性嫌気性細菌の細胞壁外膜の構成成分である LPS は、宿主に慢性的な炎症反応・刺激状態を引き起こすことが知られている。近年報告された疫学調査では歯周病罹患患者は冠動脈危険因子として知られる β_1 -アドレナリン受容体 (β_1 -AR) に対する自己抗体陽性率が高く (92.8%), 心拍変動の異常を示すことが報告され以上の先行研究から歯周病は交感神経活性化によって心血管疾患 (CVD) 発症に関与している可能性を示唆している。しかしながら歯周病に起因する CVD の発症メカニズムに関する分子レベルでの解明は不十分である。

【目 的】

以上の先行研究結果をもとに、本研究では、歯周病患者の血液中に検出される同程度の歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 由来 LPS (PG-LPS) を慢性投与した歯周病マウスモデルを作成した。この歯周病モデルでは心筋リモデリングならびに心機能低下が誘導され、そのメカニズムとして心筋細胞内の β_1 -AR/cyclic AMP (cAMP) シグナルが亢進しているという仮説をたて、これを検証することとした。

【材料と方法】

雄マウス (C57BL6/J, 12 週齢) を用いて PBS 投与群 (Control) と (PG-LPS) 投与群 (0.8 mg/kg/day : 腹腔内投与) を 1 週間行った。投与終了後心機能測定を目的に心エコー測定 (TUS-A300, Toshiba, Tokyo, Japan) を実施、終了後心筋 (CM) を摘出し、筋重量 (筋重量 / 前脛骨長比 (CM : mg/mm)), Masson-trichrome 染色により線維化面積 (%), TUNEL 染色によりアポトーシス陽性細胞率 (%) を Image J にて測定した。さらにウエスタンブロッディング法にて関連シグナルの解析を行った。統計解析は SPSS を使用し Student's t-test にて解析を行った。

【結 果】

①心筋 (CM) の筋重量の解析を行った結果、(Control vs. PG-LPS は : 4.4 ± 0.04 vs. 4.3 ± 0.08 mg/g であり有意差を認めなかった。

② PG-LPS 慢性投与後の心機能に及ぼす影響を検討するため心エコー測定を行った。左室駆出率 (LVEF) (Control vs. PG-

LPS: 66 ± 0.5 vs. $57 \pm 1.1\%$, $p < 0.05$)・左室内径短縮率 (% FS) (Control vs. PG-LPS: 31 ± 0.3 vs. $25 \pm 0.7\%$, $p < 0.05$) のいずれも Control 群 ($n=5$) と比較し PG-LPS 投与群 ($n=5$) で有意に低値であった。

③ PG-LPS 慢性投与の心臓線維化に及ぼす影響を検討するため, Masson-trichrome 染色を行った結果, 線維化率は (Control vs. PG-LPS: 0.7 ± 0.1 vs. $1.8 \pm 0.2\%$) であり Control 群 ($n=5$) と比較し PG-LPS 投与群 ($n=5$) での線維化面積は有意 ($p < 0.05$) に増加を示した。

④ PG-LPS 慢性投与の心筋アポトーシスに及ぼす影響を検討するため, TUNEL 染色を用いて, アポトーシス陽性細胞率の測定を行った。その結果 Control 群 ($n=4$) と比較し PG-LPS 投与群 ($n=4$) でのアポトーシス陽性細胞率は有意に増加を示した (Control vs. PG-LPS: 0.6 ± 0.1 vs. $9.1 \pm 1.2\%$, $p < 0.01$)。

⑤ 心筋における組織学的影響を解析した結果, PG-LPS の慢性投与によって心筋リモデリングを引き起こす事が示唆されたため, ウェスタンブロッディング法を用いて関連シグナルの解析を行った。線維化関連因子である α 平滑筋アクチン (α -SMA) の発現量の測定を行った。Control vs. PG-LPS: 100 ± 11 vs. $166 \pm 10\%$ であり Control 群 ($n=4$) と比較し PG-LPS 投与群 ($n=4$) での発現量は有意 ($p < 0.05$) に増加を示した。

⑥ 内因性アポトーシス関連因子である BCL-2, BAX の発現量の測定を行った Control 群と比較し PG-LPS 投与群での発現量は有意に増加を示した (BAX: Control ($n=4$) vs. PG-LPS ($n=5$): 100 ± 5.7 vs. $134 \pm 10\%$, $p < 0.05$, BCL-2: Control ($n=4$) vs. PG-LPS ($n=4$): 100 ± 3.2 vs. $55 \pm 4.4\%$, $p < 0.05$)。

⑦ cAMP シグナル伝達経路は β アドレナリン受容体を介した心機能低下に重要な役割を果たしているため, PKA・CaMKII シグナル伝達経路の解析を行った。(PKA: Control vs. PG-LPS: 100 ± 8.1 vs. $141 \pm 14\%$, $p < 0.05$, CaMKII: Control vs. PG-LPS: 100 ± 15 vs. $157 \pm 9.7\%$, $p < 0.05$) であった。

Control 群 ($n=5$) と比較し PG-LPS 投与群 ($n=5$) での PKA リン酸化レベル (Thr198)・CaMKII リン酸化レベル (Thr286) の亢進を認めた。

【考 察】

心エコーを用いた心機能評価より PG-LPS による慢性刺激が心機能低下を引き起こすことが示唆された。PG-LPS の慢性刺激は心肥大を誘導しないが, 心臓線維化および心筋細胞のアポトーシス陽性の割合は Control 群と比較して PG-LPS 群では有意な増加を認め, 関連する分子マーカーの発現量からも PG-LPS の慢性投与は心筋リモデリングに関与している可能性が示唆された。

β アドレナリン・cAMP シグナルの下流に存在する PKA・CaMKII のリン酸化 (活性化) レベルも PG-LPS 投与群での有意な増加を認めた。これらの結果から PG-LPS の慢性刺激が心筋細胞内の cAMP シグナルの活性化は心臓リモデリングならびに CVD 発症に関与している可能性を示唆している。

本研究では, PG-LPS への持続的な曝露が心筋リモデリングを引き起こした結果, 心機能が低下し CVD を発症させる可能性が示唆された。またその発症メカニズムの一端として心筋 β アドレナリン受容体刺激による cAMP シグナルの活性化が関与している可能性も示唆された。これらの結果は, 歯周病による慢性的曝露は CVD 発症の主要な原因の 1 つである可能性を示唆している。

審査の結果の要旨

歯周病罹患患者は, 冠動脈危険因子として知られる β_1 -アドレナリン受容体 (β_1 -AR) に対する自己抗体陽性率が高いことや, 心拍変動の異常を示すことが多いことなどから, 歯周病は, 交感神経活性化によって心血管疾患 (CVD) 発症に関与している可能性が示唆されている。本論文は, 歯周病によって心筋細胞内の β_1 -AR の cyclic AMP (cAMP) シグナルが亢進し, それによって心筋リモデリングと心機能低下が誘導されるという仮説を, 歯周病菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 由来 LPS (PG-LPS) を投与して作成した歯周病モデルマウスによって検討した。

歯周病モデルマウスに心エコーによる心機能評価を行い, その後心筋を摘出して, 心筋重量, Masson-trichrome 染色による心筋線維化面積率, TUNEL 染色による心筋アポトーシス陽性細胞率, ウェスタンブロッディング法による β_1 -AR 関連シグナルの解析を行った。その結果, 歯周病モデルマウスでは, 心筋重量には変化がなかったが, 心エコーによる心機能評価で左室駆出率と左室内径短縮率が低下し, 心筋線維化面積率と心筋アポトーシス陽性細胞率が増加していた。また, 線維化関連因子である α 平滑筋アクチンの発現量が増加し, 内因性アポトーシス関連因子である BCL-2, BAX の発現量も増加していた。また, β_1 -AR を介した心機能低下に重要な役割をもつ cAMP シグナル伝達経路では, PKA・CaMKII のリン酸

化レベルが活性化し、cAMP シグナルが活性化していた。

以上から、歯周病モデルマウスでは、心筋リモデリングの結果、心機能が低下し CVD を発症している可能性が示唆され、その発症メカニズムの一端として心筋 β_1 -AR を介した cAMP シグナルの活性化が関与している可能性が示唆された。

本論文は、歯周病が交感神経を活性化することによって CVD を発症させることを示し、歯周病治療が CVD の発症予防や症状改善につながることを示唆している。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。