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 早川佳男
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第520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 Vidarabine, an anti-herpes agent, prevents occlusal-disharmony-induced cardiac dysfunction in mice
(心臓型 AC 遮断薬 (ビダラビン) によるマウス咬合異常モデルに見られる心筋障害に対する保護効果の検討)
The Journal of Physiological Sciences 72(1), 2, 2022
論文審査委員 主査 教授 友成 博
副査 教授 二藤 彰 副査 教授 河原 博

内容の要旨

【緒言】

口腔の健康状態は加齢とともに低下し、心疾患を含む全身性疾患の主要なリスクファクターになることが疫学調査研究で明らかにされている。しかしながら分子レベルでのメカニズムの解明は不十分である。

加齢に伴う歯の喪失、歯周病の悪化は咬合異常の原因となる。交感神経の慢性的な活性化は、心疾患を惹起させる因子の1つとして注目されている。我々は歯科用レジンをマウスの下顎切歯に装着し、0.7 mm の開口負荷を加えた咬合異常 (Bite-opening : BO) モデルを作成し解析を行った。その結果 BO マウスでは交感神経活性が慢性刺激状態になっていること、心臓線維化ならびに心筋細胞のアポトーシス (心臓リモデリング) が誘導され心機能が低下していること、これらの所見は β 受容体遮断薬であるプロプラノロールを併用投与することで消失することを先行研究で明らかにした。

β 受容体遮断薬は導入初期の心機能低下、気管支平滑筋の収縮、インスリン分泌低下などの重篤な副作用があり、特に慢性呼吸器疾患や糖尿病合併頻度が高い高齢者では慎重に投与することが必要である。我々は β 受容体の下流に存在し心臓特異的に発現する 5 型 (心臓型) アデニル酸シクラーゼ (AC) の特異的阻害作用を示す抗ヘルペス薬 (ビダラビン) は、 β 受容体遮断薬に見られる副作用がなく、かつ β 受容体遮断薬と同等の心臓保護効果を示し高齢者にも安全に投与可能な心不全治療薬になる可能性が示唆されている。

本研究では BO マウスを用いて、咬合異常に起因する心機能障害に対するビダラビンの心臓保護効果について検証を行った。

【方法】

雄 16 週齢の C57BL/6 マウスを、1) コントロール群、2) BO 群、3) ビダラビン投与群 (15 mg/kg/day)、4) BO + ビダラビン投与群の 4 群に分けた。実験開始日より 13 日後に心エコーで心機能の評価を行った。14 日後に心臓を摘出、組織学、分子生物学的手法を用いて BO に起因する心臓線維化、アポトーシス、酸化ストレスならびにタンパク発現に及ぼす影響を検討した。

【結果、考察】

1) 心エコーを用いて咬合異常による心機能障害に対するビダラビンの効果を左室心拍出量 (ejection fraction : EF) ならびに左室内径短縮率 (% Fractional shortening ; % FS) を指標に調べた。その結果、EF ならびに % FS は BO 群で有意に低下したが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。以上の結果は咬合異常で引き起こされる心機能障

害に、AC5の活性化が重要であることを示唆している。

2) マッソン-トリクローム染色を用いて咬合異常による心臓線維化に対するビダラビンの効果を検討した。その結果BO群ではコントロール群に比較して心臓線維化領域は有意に増加したが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。さらに心臓線維化のマーカである α -SMA (smooth muscle actin) の発現レベルはBO群で有意に増加したが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。以上の結果は咬合異常で引き起こされる心臓の線維化に、AC5の活性化が重要であることを示唆している。

3) TUNEL染色を用いて、咬合異常による心筋細胞アポトーシスに対するビダラビンの効果を検討した。その結果BO群ではコントロール群に比較してアポトーシス陽性心筋細胞の割合はBO群で有意に増加したが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。さらにアポトーシスのマーカであるBaxタンパク質とBCL-2タンパク質の比率はBO群で有意に増加したが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。以上の結果は咬合異常で引き起こされる心筋細胞のアポトーシス発症に、AC5の活性化が重要であることを示唆している。

4) 咬合異常による酸化ストレスに対するビダラビンの効果を8-OHdG免疫染色、OxiSelect™プロテインキット、ウェスタンブロッティングを用いて調べた。その結果8-OHdG陽性細胞の割合と酸化ストレスタンパクの発現量はBO群で有意に増加し、その増加はビダラビンによって抑制された。またストレス応答タンパクであるNADPH oxidase (NOX)のうち心筋に発現するNOX2とNOX4の発現量ならびに活性酸素種を産生するキサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase XO) の発現量をウェスタンブロッティングを用いて測定した。その結果NOX4ならびにXOの発現量はBO群で有意に増加し、その増加はビダラビンによって抑制された。以上の結果は咬合異常で引き起こされる心筋細胞に対する酸化ストレスに、AC5の活性化が重要であることを示唆している。

5) PLNの過剰なリン酸化による心筋細胞内の Ca^{2+} 制御の異常は心臓のリモデリングや機能障害の発症に大きく寄与している。そこで、咬合異常による心筋細胞内の Ca^{2+} 制御の異常に対するビダラビンの効果を筋小胞体に存在し筋小胞体への Ca^{2+} の取り込みに重要なホスホランパンの活性化(リン酸化)状態を、ウェスタンブロッティングを用いてCaMKIIによりリン酸化が制御されているThreonine-17ならびにプロテインキナーゼAによってリン酸化が制御されているSerine-16のリン酸化状態を調べた。その結果BO群ではThreonine-17ならびにSerine-16のいずれのリン酸化も有意に増加していたが、この増加はビダラビンによって抑制された。以上の結果は、咬合異常で引き起こされる心筋細胞内の Ca^{2+} 制御異常にAC5の活性化が重要であることを示唆している。

【結 論】

本研究結果から、咬合異常による心機能障害にビダラビンは心臓保護的に作用することが明らかになった。高齢者にも安全に投与可能な心不全治療薬の開発は高齢化の進むわが国ではきわめて重要な課題である。心不全治療の標準指針は、慢性的に亢進しすぎた交感神経の遮断であるが、その主たる薬剤であるベータ遮断薬には、導入初期の心機能低下による心不全の急性増悪と呼吸機能抑制という重篤な副作用があるため、高齢者では大きな問題となる。今後咬合異常を合併する高齢心不全患者はこれからますます増加することが予測される。したがって心機能低下を起こさず、呼吸機能抑制も起こさずにベータ遮断薬と同等の効果が得られる心疾患治療薬の開発はきわめて急務な課題である。

心臓型アデニル酸シクラーゼに選択的抑制作用をもつ抗ヘルペス薬(ビダラビン)は1984年に販売が開始されて以来長年にわたって市販されており、安全性も確認されていること、ヒトへの投与が既に認可されている投与量(15 mg/kg/day)で咬合異常に起因する心機能障害に対して同薬剤が心臓保護的に作用することが明らかになったことは、同薬剤が咬合異常に起因する心機能障害の治療薬として早急な臨床応用実現が可能性であることを示唆している。

以上レセプターレベルでベータアドレナリン受容体シグナルを遮断する従来のベータ遮断薬の副作用がなくかつ同等の心不全治療効果が期待できる選択的心臓型アデニル酸シクラーゼ抑制薬ビダラビンを高齢者にも安心して使える心疾患治療薬として臨床応用することが本研究の最終目標である。

審査の結果の要旨

加齢に伴う歯の喪失、歯周病の悪化は咬合異常の原因となる。交感神経の慢性的な活性化は、心疾患を惹起させる因子の1つとして注目されている。本研究では咬合異常(Bite-opening: BO)マウスを用いて、咬合異常に起因する心機能障害に対するビダラビンの心臓保護効果について検証を行った。

雄16週齢のC57BL/6マウスを1)コントロール群、2)BO群、3)ビダラビン投与群(15 mg/kg/day)、4)BO+ビダラビン

博士學位論文

投与群の4群に分けた。実験開始日より13日後に心エコーで心機能の評価を行った。14日後に心臓を摘出、組織学、分子生物学的手法を用いてBOに起因する心臓線維化、アポトーシス、酸化ストレスならびにタンパク発現に及ぼす影響を検討した。

その結果、BO群ではコントロール群に比較して、左室心拍出量ならびに左室内径短縮率の有意な低下、心臓線維化領域、心臓線維化のマーカーである α -SMA (smooth muscle actin) 発現の有意な増加、アポトーシス陽性心筋細胞、アポトーシスのマーカーであるBaxタンパク質とBCL-2タンパク質比率の有意な増加が認められたが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。また、BO群では8-OHdG陽性細胞割合と酸化ストレスタンパク発現量の増加、ストレス応答タンパクであるNADPH oxidase (NOX)のうちNOX4の発現量の増加、活性酸素種を産生するキサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase XO) 発現量の増加が認められたが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。さらに、BO群では筋小胞体への Ca^{2+} の取り込みに重要なThreonine-17ならびにSerine-16のいずれのリン酸化も増加していたが、その効果はビダラビンを併用投与することで抑制された。

以上から、心臓型アデニル酸シクラーゼに選択的抑制作用をもつ抗ヘルペス薬は、咬合異常に起因する心機能障害に対して心臓保護的に作用することが明らかとなった。本研究の成果は、同薬剤が従来のベータ遮断薬の副作用がなくかつ同等の心不全治療効果が期待できる心疾患治療薬として臨床応用の可能性を示唆している。よって、本論文は博士(歯学)の学位請求論文として十分価値を有するものと判定した。