

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	清 本 賢 一
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 530 号
学位授与年月日	令和 6 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	Oral angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril protects the heart from <i>Porphyromonas gingivalis</i> LPS-induced cardiac dysfunction in mice (アンジオテンシン変換酵素阻害薬であるカプトプリルは、 <i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来 LPS によって引き起こされる心機能障害から心臓を保護する) PLoS One. 2023 Nov 20;18(11):e0292624.
論 文 審 査 委 員	主査 教授 里 村 一 人 副査 教授 松 本 直 行 副査 教授 五 味 一 博

内 容 の 要 旨

【背 景】

歯周病患者では歯肉組織局所のレニン-アンジオテンシン系 (RAS) が存在すること、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬の投与により歯周組織の炎症や歯槽骨の吸収が抑制されることが報告されている。しかしながら高血圧や心疾患の発症に重要な全身性の RAS の役割について歯周病患者や動物モデルで調べた報告はない。

Porphyromonas gingivalis 由来のリポポリサッカライド (PG-LPS) を少量持続投与して作成する歯周病マウスモデルでは、サイクリック AMP (cAMP) / プロテインキナーゼ A および cAMP / カルモジュリンキナーゼ II (CaMK II) 経路の活性化が誘導されること、心筋細胞内の筋小胞体にあるホスホランパン (PLB) の過剰なリン酸化が誘導され心不全が発症することを我々は報告した。

β 遮断薬ならびにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬は不全心の収縮機能を改善して心不全患者の生命予後を改善することが大規模臨床試験で確認され、心不全の第 1 選択薬として臨床で広く用いられている。腎臓からのレニン分泌が傍糸球体細胞に存在する β_1 アドレナリン受容体 (β_1 -AR) 刺激で誘導されることに着目し、 β_1 -AR と RAS は相互に関連して心筋の生理機能を制御していると考えた。そこで本研究では「PG-LPS による心筋の機能不全は交感神経活性の亢進による RAS の活性化を介して起こる」という仮説をたて、本仮説の検証を行った。

【目 的】

PG-LPS の少量持続投与で誘導される心不全発症過程における RAS の役割を解明する。

【手技と方法】

PG-LPS (0.8 mg/kg/day) を 7 日間腹腔内投与した C57BL6/J 雄性マウス (12 週齢) を用い、カプトプリル (Cap, 飲料水中 0.1 mg/ml) が心機能障害に及ぼす影響を検討した。マウスは PBS を投与した Control 群, LPS を注射した群, Cap を飲水投与した群, LPS と Cap を併用した 4 群に分けた。LPS の投与 1 週間後に、心エコーにより心機能を測定、体重測定後にマウスを屠殺し心臓、肝臓、肺重量の測定、新鮮凍結切片を作成後、HE 染色、Masson-trichrome 染色、TUNEL 染色、Western-blotting を行った。

【結 果】

心エコーを用いて心機能を調べたところ、左室駆出率 (EF) は PG-LPS 群ではコントロールと比較して有意に低下していた (WT vs. PG-LPS : 66 ± 1.8 vs. $59 \pm 2.5\%$, $P < 0.01$) が, Cap を併用投与した群ではその傾向が抑制された (PG-LPS vs. PG-LPS + Cap : 59 ± 2.5 vs. $63 \pm 1.1\%$, $P < 0.05$). 左室内径短縮率 (%FS) も PG-LPS 群ではコントロールと比較して有意に低下していたが (Control vs. PG-LPS : 31 ± 1.2 vs. $27 \pm 1.5\%$, $P < 0.01$), Cap 併用投与群ではその傾向が抑制された (PG-LPS vs. PG-LPS + Cap : 27 ± 1.5 vs. $29 \pm 0.7\%$, $P < 0.05$).

血中 Ang II 濃度に対する PG-LPS の効果を調べるため, 4 群の血中 Ang II レベルを ELISA 法で調べた. その結果 Ang II 濃度は, コントロールと比較して PG-LPS 群で有意に増加していたが (Control vs. PG-LPS : 88 ± 12 vs. 759 ± 624 pg/ml, $P < 0.05$), Cap の併用投与を行った群ではその増加は有意に抑制されていた (PG-LPS vs. PG-LPS + Cap : 759 ± 624 vs. 62 ± 67 pg/ml, $P < 0.05$).

心臓, 肺および肝臓に対する PG-LPS の影響を調べるため, 脛骨長比あたりの心筋重量, および脛骨長比あたりの肺重量と肝臓重量に対する影響を調べたところ, 4 群間で有意差は認められなかった. このデータは PG-LPS により心肥大, 肺水腫, 肝臓うっ血が発症しなかったことを示唆している.

心筋の線維化に対する PG-LPS の影響を Masson-trichrome 染色を行い評価した. その結果, PG-LPS 投与は心筋の線維化領域を有意に増加させたが (Control vs. PG-LPS : 0.7 ± 0.1 vs. $2.0 \pm 0.2\%$, $P < 0.01$), Cap の併用投与によりその増加は抑制された (PG-LPS vs. PG-LPS + Cap : 2.0 ± 0.2 vs. $0.6 \pm 0.1\%$, $P < 0.01$). 線維化のパラメーターである α -SMA の心筋組織内の発現レベルは, PG-LPS で有意に増加していたが ($P < 0.01$), この増加は Cap の併用投与で有意に抑制された ($P < 0.01$).

心臓アポトーシスに対する PG-LPS の効果を調べるため, TUNEL 染色を行い評価した. PG-LPS の投与は心筋細胞のアポトーシス陽性細胞率を有意に増加させたが (Control vs. PG-LPS : 1.1 ± 0.1 vs. $6.2 \pm 0.8\%$, $P < 0.01$), その増加は Cap の併用投与で抑制された (PG-LPS vs. PG-LPS + Cap : 6.2 ± 0.8 vs. $2.3 \pm 0.4\%$, $P < 0.01$).

以上のメカニズムを調べるため Western-blotting を行ったところ, PG-LPS 投与マウスの心筋組織では, プロテインキナーゼ C δ (PKC δ) のリン酸化 (Tyr-311) 増加, NADPH オキシダーゼ 4 (NOX4) とキサンチンオキシダーゼ (XO) の発現量増加, カルモジュリンキナーゼ II (CaMK II) のリン酸化 (Thr-286) とホスホランバン (PLB) のリン酸化 (Thr-17) 増加が確認された. また, これらの変化は Cap の併用投与で有意に抑制された.

【考察と結論】

血中 PG-LPS 濃度が歯周病患者と同等になる歯周病マウスモデルでは, 血中の Ang II 濃度がコントロールに比較して約 8.6 倍増加し, 全身性 RAS の活性化が亢進して心不全が誘導されるが, これらの所見は ACE 阻害薬 Cap を投与することで回避され, 心臓リモデリング (線維化, アポトーシス), 心不全も誘導されないことが明らかになった. 以上の結果は歯周病による心疾患発症に全身性 RAS の活性化亢進が重要な役割をはたしていることが示唆された.

審査の結果の要旨

心不全の治療に有用であると考えられているアンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin-converting enzyme : ACE) 阻害薬は, 歯周組織の炎症や歯槽骨の吸収を抑制することが報告されているが, 高血圧や心疾患の発症に重要な全身性のレニン-アンジオテンシン系 (RAS) の役割について歯周病患者や動物モデルで検討した報告はない. そこで本研究では, *Porphyromonas gingivalis* 由来のリポポリサッカライド (PG-LPS) の少量持続投与で誘導される心不全発症過程における RAS の役割を解明することを目的に, C57BL6/J 雄性マウス (12 週齢) を, PBS 投与群 (対照群), PG-LPS (0.8 mg/kg/day) 投与群, ACE 阻害薬カプトプリル (0.1 mg/ml) 投与群 (Cap 群) および PG-LPS + Cap 併用群の 4 群に分け, 心エコー, 体重測定, 心臓重量, 肝臓・肺重量 / 脛骨長比測定, HE 染色, Masson-trichrome 染色および TUNEL 染色による組織学的観察, ELISA 法による血中 Ang II 定量, Western-blotting による細胞内シグナル伝達機構解析を行った. その結果, 対照群に比べて PG-LPS 投与群においては, 左室駆出率および左室内径短縮率の低下, 血中 Ang II 量, 心筋線維化領域, アポトーシス心筋細胞の増加がみられ, これらの変化は Cap の併用により抑制された. また, PG-LPS 投与群マウスの心筋においては, protein kinase C δ のリン酸化, NADPH oxidase 4 と xanthine oxidase の upregulation, calmodulin kinase II および phospholamban のリン酸化の亢進が認められ, これらの変化も Cap によって抑制された. 以上の結果は, RAS が PG-LPS によって誘発される心疾患の発症に重要な役割を果たしている可能性を示唆している.

博 士 学 位 論 文

本研究により、歯周病患者の血中と同等の PG-LPS により惹起される血中 Ang II により、全身性 RAS の亢進が誘導され、心筋障害が誘発されること、さらにこれが ACE 阻害薬 Cap を投与することで回避されることが明らかになった。本研究は、歯周病による心疾患発症に全身性 RAS の亢進が重要な役割を果たしていることを示唆するものであり、歯周病による重篤な合併症の予防や進行抑制に繋がることが期待できるものと考えられた。

よって、本研究は博士（歯学）の学位を請求するにあたり、十分な価値を有するものと判定した。