

## 論文審査の結果の要旨

氏名：平澤 正晃

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Analysis of the mechanism which periodontopathic bacteria induce vascular endothelial cell apoptosis

（歯周病原性細菌が血管内皮細胞アポトーシスを誘導するメカニズムの解析）

審査委員：（主査） 教授 吉 垣 純 子  
                  （副査） 教授 三 枝 禎  
                  教授 落 合 智 子

アテローム性動脈硬化症は、炎症性細胞やコレステロールなどの脂質が血管内腔に集積した状態を呈し、これが慢性に経過すると虚血性心疾患や脳梗塞などの発症へと繋がる。アテローム性動脈硬化の危険因子として、高血圧、脂質異常症、肥満、糖尿病、喫煙などがあげられており、歯周病もまた動脈硬化のリスクを増加させていることが疫学調査や動物実験により報告されている。実際に、動脈硬化病巣からは *Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) などの歯周病原性細菌が検出されている。また、アポリポタンパク質 E 欠損マウスや自然発症高脂血症 (Apo<sup>e</sup><sup>sh1</sup>) マウスに *P. gingivalis* や *Aa* を感染することにより動脈硬化の進展が認められている。これまでの研究から、歯周炎が内皮機能障害、アテローム性動脈硬化症、心筋梗塞のリスク上昇と関連していることが報告されている。

血管内皮細胞は血管の内側を一層に覆っており、血中成分の血管壁への移行を制御するバリアとしての機能を有している。何らかの原因で血管内皮細胞のバリア機能に損傷が生じると、LDL (低密度リポ蛋白) が血管壁に過剰に取り込まれ蓄積することにより動脈硬化が発症すると考えられている。近年、動脈硬化病変の発症と進展に関与する血管内皮細胞の損傷の一つとしてアポトーシスが考えられるようになってきている。動脈硬化に関与する血管内皮細胞のアポトーシスの誘因としては、酸化 LDL や白血球から放出された活性酸素による酸化ストレスが挙げられるが、歯周病原性細菌が血管内皮細胞に及ぼす影響は未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) を用い、*P. gingivalis* や *Aa* のアポトーシス誘導機序を解析した。研究結果を以下に示す。

実験 1 : *P. gingivalis* の HUVEC に対するアポトーシス誘導機序の解析

1. *P. gingivalis* は濃度依存的に HUVEC の増殖を阻害し、アポトーシス (DNA 断片化および Caspase 3, 8, 9 の活性化) を誘導した。
2. *P. gingivalis* で誘導される HUVEC アポトーシスに、小胞体 (ER) ストレスが関与しているか否かを検討したところ、*P. gingivalis* は GADD153 及び GRP78 の遺伝子及びタンパク発現を増加し、caspase-12 活性を増強した。更に、*P. gingivalis* で誘導される HUVEC の DNA 断片化は ER ストレス阻害剤 (salburinal) 及び Caspase-12 阻害剤で抑制された。*P. gingivalis* で誘導される caspase-3 及び caspase-12 の活性化もまた salburinal 処理で阻害された。これらの結果は、ER ストレス応答が *P. gingivalis* 誘導アポトーシスに先立って起こることを示唆している。
3. *P. gingivalis* で誘導される HUVEC アポトーシスに、オートファジーが関与しているか否かを検討したところ、*P. gingivalis* は LC-3 及び Beclin-1 の遺伝子及びタンパク発現を増加し、酸性小胞オルガネラの形成を確認した。LC-3 に対する siRNA を用いての RNA 干渉による *P. gingivalis* 誘導オートファジーの抑制は、*P. gingivalis* 誘導アポトーシスを増加した。一方、*P. gingivalis* で誘導される LC-3 の発現増強は ER ストレス阻害剤 (salburinal) で抑制された。これらの結果は、ER ストレス

応答が *P. gingivalis* 誘導オートファジーに先立って起こることを示唆している。

#### 実験2： *Aa* のHUVECに対するアポトーシス誘導機序の解析

1. *Aa* は HUVEC の増殖には直接影響を与えなかったが、単球(THP-1)が共存することにより HUVEC のアポトーシスを濃度依存的に増強した。
2. HUVEC アポトーシスは、*Aa* で感作した THP-1 培養上清の添加においても認められ、これらのアポトーシスは抗酸化剤(NAC)や iNOS 阻害剤で抑制された。
3. *Aa* は THP-1 からの活性酸素(ROS)や酸化窒素(NO)の産生を濃度依存的に増加し、NADPH oxidase である p22phox や p47phox 及び iNOS の遺伝子及びタンパク発現を増強した。
4. ROS の一種である  $H_2O_2$  は HUVEC に対し、増殖阻害、アポトーシス、Caspase3/7 の活性化を誘導した。

以上の結果から、*P. gingivalis* の HUVEC への感染は、ER ストレス介在性のアポトーシスとオートファジーを誘導し、血管系におけるアテローム生成機構を潜在的に増幅するものと考えられた。更に、*Aa* 感作により単球から産生される活性酸素や一酸化窒素もまた、HUVEC におけるアポトーシスを誘導しアテローム形成に関与している可能性が示唆された。

本研究は、歯周病原性細菌感染により増悪されるアテローム性動脈硬化症の発症機序における血管内皮細胞アポトーシスの関与を明らかにしたものである。これらの知見から、疾患メカニズムを適切に制御することにより、疾患予防に大いに貢献するものと期待される。

よって本論文は、博士(歯学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成31年2月21日