

学位論文

実験的歯周炎の動脈硬化症への影響

高橋 弘太郎

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学
(主指導教員: 吉成 伸夫 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

The effect of experimental periodontitis for atherosclerosis.

Kotaro Takahashi

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Nobuo Yoshinari)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. in Dentistry

【背景と目的】

動脈硬化症は、西欧諸国および日本での死亡原因の主要なものである。この病因は、血管内皮細胞への慢性刺激に対する炎症、免疫応答であり、血管内壁での脂質沈着（血管内皮細胞内へのコレステロールおよびリン脂質侵入）、炎症性細胞浸潤（マクロファージ、T 細胞）、平滑筋細胞の内膜への遊走と増殖、結合組織の増殖（コラーゲン、グリコサミノグリカン、弾性線維）、カルシウム沈着、および血栓化を特徴とする病変である。一方、歯周病は、一部の特定の細菌を含む口腔内細菌感染に対する免疫応答の結果として、歯周組織において様々なサイトカインや、酵素類が産生され、動脈硬化性病変を悪化させることが報告されている。

また、歯周病は、動脈硬化症のリスク因子としても注目されており、システマティックレビューでは、歯周病と動脈硬化症は弱いながらも関連性が認められている。しかし、歯周病からアテローム性動脈硬化症へ至る経路については数多く報告されているものの、詳細は依然不明のままである。そこで、局所の低レベル慢性炎症性疾患としての歯周病の病態を想定して、マウスの歯周組織へのサイトカイン (Interleukin-6: IL-6) 注入が、肝臓で血清アミロイド A (Serum Amyloid A: SAA) を産生上昇させ、血管内皮細胞を刺激し、動脈硬化症の増悪因子として関与する可能性、機序を検討した。

【材料と方法】

実験には、動脈硬化症易形成性マウスであるアポリポプロテイン E 欠損マウス (ApoE^{-/-}) の生後 8 週齢の雄 24 匹を使用した。動物は、Recombinant Mouse IL-6 投与群 (IL-6 群) と、Phosphate Buffered Saline (PBS) 投与群 (PBS 群) の 2 群に分けた。IL-6 群には、0.1% Bovine Serum Albumin (BSA) 含有 PBS で希釈した Recombinant Mouse IL-6 (25ng/μl) を、PBS 投与群には、0.1% BSA 含有 PBS を 10μl ずつ隔日毎に週 3 回、下顎臼歯部頬側歯肉に両側交互に (歯周組織局所では 4 日に 1 回) 全身麻酔下にて 33G の注射針を用いて投与した。

IL-6 群では、投与開始後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 20, 21, 41, 42 (6 週), 62, 63, 83, 84 (12 週) 日後に尾静脈より血液を採取し、ELISA 法にて血清 SAA 濃度を測定した。両群ともに投与開始後 6, 12 週に、各群 6 匹ずつ血液採取後に屠殺し、大動脈、下顎骨を摘出した。摘出した大動脈は縦断試料を作製し、Sudan IV 染色により動脈硬化病変部位率を測定した。さらに、大動脈基部では横断薄切切片を作製し、動脈硬化病変部位での Sudan IV 染色、動脈硬化病変部への単球および T 細胞の組織浸潤に関与する走

化性因子である Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1), SAA 受容体の 1 つである Toll-like receptor 2 (TLR2) の免疫組織化学染色を施行した。また、下顎骨は μ CT にて撮影し、IL-6, あるいは PBS 投与部位周辺の歯槽骨吸収を測定、歯周組織炎症程度とした。

さらに、血管内皮細胞に対する SAA の作用機序を検討するため、ヒト大動脈血管内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells: HAECs) を培養、SAA で刺激後、Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1), MCP1 の発現を real-time PCR 法で解析した。

【結果】

動物は、両群ともに経時的な体重増加がみられ、成長に有意な差は認められなかった。IL-6 群では、投与 1 日で血清 SAA 濃度が上昇し、その翌日には低下することを繰り返したが、血清 SAA 濃度は、投与開始前と比較し、有意に上昇した状態を全実験期間中持続していた。また、PBS 群と比較しても、6, 12 週ともに有意に上昇した。投与部周囲歯槽骨では、IL-6 群は PBS 群と比較し、6 週の第 1 臼歯 (M1) 遠心根と第 2 臼歯 (M2) 近心根においてセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離が有意に増加し ($P < 0.05$)、12 週においても距離は長く、第 1 臼歯近心根と第 2 臼歯近心根の歯根中央部の頰側歯槽骨幅は有意に減少した ($P < 0.01$)。一方、大動脈における動脈硬化病変部位率は、6 週では有意な差は認められなかったが、12 週では IL-6 群で有意に増加した ($P < 0.05$)。大動脈基部の免疫組織染色において、IL-6 群では血管内膜の TLR2 の発現が上昇する傾向を認めた。また、PBS 群と比較し、MCP1 の発現が 6, 12 週ともに増加し、経時的な病変部の増大とともに増加した。さらに、HAECs においては、SAA 刺激により ICAM1, VCAM1, MCP1 の発現が増加したが、刺激前に抗 TLR2 抗体を添加し、TLR2 受容体に結合することにより発現が減少した。

【結論】

局所の低レベル慢性炎症性疾患である歯周病により産生される IL-6 が、肝臓を刺激して血中 SAA 濃度を上昇させ、血管内皮細胞の SAA 受容体である TLR2 に結合することにより、ICAM1, VCAM1, MCP1 の発現が上昇し、動脈硬化症が増大する経路の存在が示唆された。

緒 言

心臓血管疾患 (Cardiovascular Disease: CVD) とは、心臓血管系に影響を与える多くの疾患の総称であり、高血圧症、冠状動脈疾患、脳血管疾患、末梢血管疾患、心不全、リウマチ性心疾患、先天性心疾患、および心筋症等が含まれる。この CVD の病因の多くは、動脈壁が硬化する動脈硬化症に起因する。動脈硬化症が悪化すると血栓症を引き起こし、さらには遠隔諸臓器の梗塞の原因となり、生命に関わる病態に結びつく。現在、動脈硬化症は慢性炎症性疾患として考えられており、血管の内腔を被覆している血管内皮細胞の傷害と、それに続く血管壁中のマクロファージの浸潤、脂質取り込み、線維性結合組織の増生、内膜の肥厚をきたして、血管内腔の狭窄や閉塞をきたすという考え方が通説となっている¹⁾。

一方、歯周病は、主に偏性嫌気性グラム陰性桿菌の口腔内常在細菌増殖による歯周組織に対する日和見感染で、現在はバイオフィルム感染症としても認識されている。この細菌感染に対して宿主側である歯周組織は、接合上皮の物理的防御機構、炎症応答として好中球による異物の貪食、殺菌作用にて対応し、さらに免疫応答として免疫担当細胞 (マクロファージ、リンパ球) が産生するサイトカイン (主に Interleukin-1: IL-1, Interleukin-6: IL-6, Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) やプロスタグランジンなどの炎症性メディエーターにより、防御機構を働かせる。しかし、プラーク除去が徹底されない場合、歯周ポケット内に存在する細菌を完全に排除するには至らず、細菌刺激が慢性的、かつ持続的に存在し続けることになる。これにより、宿主側の炎症、免疫応答の慢性化、遷延化が起こり、歯周組織の破壊は継続する。さらに、歯周組織に多量に存在する細菌や過剰に産生されたサイトカインが血液中に流入し、全身を循環することになる。

これらの歯周病由来の細菌やサイトカインは、血液を介して動脈硬化病変部に到達し、血管内皮細胞やマクロファージを刺激し、さらなるサイトカインや炎症性メディエーターを産生することにより、動脈硬化性病変を悪化させることが動物実験で報告されている²⁾。さらに、1990年代より、歯周病と動脈硬化症との疫学的関連性が、疫学的研究により報告されている³⁻⁶⁾。

我々は以前、ApoE^{+/+}マウスに *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) 菌を感染

させた場合に動脈硬化性病変が増加し、病変部の大きさが血清 SAA レベルに相関すること⁷⁾、マウスの歯周組織に IL-6 を注入した場合に肝臓で有意に発現している遺伝子は急性期タンパク、特に SAA 遺伝子であり、IL-6 は SAA を特異的に調節していることをマイクロアレイにて検出、血中 SAA タンパクも上昇することを報告した⁸⁾。さらに、ApoE^{-/-}マウスに、IL-6 を腹腔内投与した結果、肝臓での SAA mRNA の発現が上昇し、SAA タンパクが産生され、血中 SAA 濃度が上昇することを確認し、動脈硬化性病変が増大することを確認した。

以上の結果は、歯周組織中の細菌、細菌産生物、あるいは歯周組織で産生されたサイトカインが血中に移行して肝臓に到達し、肝細胞を刺激して SAA の産生上昇をきたし、動脈硬化症の悪化に関与していることを示している。しかし、これらの実験では、歯周組織局所の炎症状態を長期間持続させることができていないため、慢性疾患である歯周炎の状態を正確に再現できてはいない。

そこで、本研究では局所の低レベル慢性炎症疾患としての歯周病が、動脈硬化症に影響する機序を解明する一助として、ApoE^{-/-}マウスの歯周組織に IL-6 を 12 週間にわたり隔日投与して、歯周組織局所からの IL-6 刺激により、肝臓から産生される SAA が心臓血管疾患の原因となる動脈硬化症の発症、増大に直接関与しているか否かを検討し、歯周病と動脈硬化症の関連に関する SAA の関与を検索することを目的とした。

実験材料及び方法

1. 実験動物

ApoE^{-/-}マウスは、Jackson Laboratory (USA) より 2 ペア供与を受け、松本歯科大学ハイテクセンターの動物実験室にて飼育、繁殖した。本研究では 24 匹の雄性マウスを実験に供した。動物は、室温 20~22°C、湿度 50~60%、12 時間の明暗周期（午前 6 時から午後 6 時）の Specific Pathogen Free 環境下にて飼育した。なお本研究は、「研究機関等における動物実験等に関する基本指針」（平成 18 年告知）に基づいて、「松本歯科大学動物実験室運営委員会」による実験計画の審議と承認（承認番号 131-08）をもって実施した。さらに、平成 16 年 2 月に施行された「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性に関する法律」に基づいて実施し、「松本歯科大学遺伝子組換え生物等安全管理委員会」による実験計画の審議と承認（承認番号 08-34）を得て実施した。

動物を 2 群（各群 12 匹）に分け、IL-6 群では生後 8 週から、0.1% ウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin: BSA) (A7030-10G, SIGMA, USA) 含有リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline: PBS) (10010-23, Life Technologies, USA) に溶解した 25 ng/ μ l の recombinant mouse IL-6 (406-ML, R&D, USA) を 10 μ l, 隔日毎に週 3 回、下顎臼歯部頰側歯肉に両側交互に（歯周組織局所では 4 日に 1 回）全身麻酔下にて 33G の注射針を用いて投与した（図 1）。もう一方の PBS 群には、0.1% BSA 含有 PBS を同様に投与した。食餌は普通食（4.5%: 脂肪, 0.0169%: コレステロール, LabDiet, USA）で飲料水とともに両群に自由摂取させた。投与開始から 6, 12 週経過後に、各群 6 匹ずつイソフルレン (ISOFUL[®], DS ファーマアニマルヘルス株式会社, 日本) を使用し、全身麻酔下で、血液採取後、安楽死させ、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（163-20145, 和光純薬工業株式会社, 日本）にて灌流固定後、心臓を含めた大動脈と、下顎骨を摘出した（図 2）。

2. 血清 SAA 濃度

IL-6群では、IL-6投与開始後1, 2, 3, 4, 5, 6, 20, 21, 41, 42, 62, 63, 83, 84日後の各マウスより、イソフルレン (ISOFUL[®], DSファーマアニマルヘルス株式会社, 日本) を使用し、全身麻酔下で外側尾静脈から25G翼状針(SV-25DLK, テルモ, 日本) を使用して血液を0.5ml採取した。PBS群では、42(6週), 84(12週)日後に同様に血液を採取した。採取した血

液は、4°Cで一晩放置した後、4°C、20分、2,000rpmで遠心分離して、血清を採取、-30°Cで保存した。

上記の方法で回収した血清中 SAA 濃度を ELISA 法にて測定した。すなわち、Mouse SAA ELISA Kit (KMA0021, Life Technologies, USA) を使用し、測定機器は Powerscan® HT (DS ファーマバイオメディカル株式会社, 日本), および KC4 ソフトウェア (ver. 3.4, DS ファーマバイオメディカル株式会社, 日本) を使用して測定した。

3. 下顎骨の μ CT 撮影

実験動物用 3D マイクロX線 CT (μ CT)(R_mCT, 株式会社リガク, 日本) を用いて、摘出した下顎骨を撮影(管電圧 80 kV, 管電流 160 μ A)し、i-view(ver.1.68, 株式会社モリタ製作所, 日本) を応用して、咬合平面を水平に設定して再スライスを行い、根尖を観察できる前頭断の画像を得た。これらの画像上で、注入部位周囲である下顎第 1 臼歯 (M1) 近心根, M1 遠心根, 第 2 臼歯 (M2) 近心根の頬側のセメントエナメル境 (cemento-enamel junction: CEJ) から歯槽骨頂 (alveolar bone crest: ABC) までの距離と歯根中央部の頬側歯槽骨の幅を測定した (図 3)。

4. 大動脈の脂肪沈着

摘出した大動脈を 24 時間、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて固定後、大動脈の内腔を開き、PBS にて洗浄、Sudan IV 染色液を適法に従って調整し、6 分間染色後、80% エタノールで 5 分間分別を行った。Sudan IV にて染色された大動脈は、実体顕微鏡 (LEICA S8 APO, Leica Microsystems, Germany) にて観察した。大動脈内腔の脂質沈着程度は、Image J (ver. 1.48, NIH, USA) を使用して、血管内腔表面積全体に対する染色部位の割合 (脂質沈着 (染色部位) 面積/大動脈内腔面積 \times 100) にて算出した。

5. 大動脈基始部の脂肪沈着

心臓付き大動脈組織を凍結包埋剤 (SCEM, SECTION-LAB, 日本) で包埋、クライオスタット (CM-1800, Leica Biosystems, Germany) を用いて、心臓に近い上行大動脈面において 7 μ m 厚の連続切片を作製した。大動脈基始部の脂肪沈着部位を解析するため、Sudan

IV 染色液にて 6 分間染色したのち、80%エタノールで 5 分間分別を行った。Sudan IV にて染色された近位大動脈は、光学顕微鏡 (IX70, OLYMPUS, 日本) にて観察した。大動脈内腔の脂質沈着程度は、Image J (ver. 1.48, NIH, USA) を使用して、脂質沈着面積 (μm^2) を算出した。

6. 免疫組織化学染色

凍結連続切片を使用し、SAA レセプターの 1 つである Toll-like Receptor 2 (TLR2) の局在を検索するために、100 倍希釈した抗 TLR2 抗体 (13-9021-82, eBioscience, USA) を 4°C で 12 時間処理後、チラミド増感システム (NEL700A001KT, Perkin Elmer, USA) を用いて増感を行い、Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3468, DAKO, USA) を用いて 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) を基質として発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行い、PHOTOSHOP CS3 (Adobe, USA) を用いて大動脈内皮細胞の TLR2 陽性細胞の割合 (大動脈弁の TLR2 陽性内皮細胞の長さの総和 / 大動脈弁の全ての内皮細胞の長さの総和 $\times 100$) を算出した。また、動脈硬化症の進行に関わる Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1) の局在を検索するために、100 倍希釈した抗 MCP1 抗体 (ab7202, abcam, USA) にて 4°C で 12 時間処理後、ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(Rat) (424351, 株式会社ニチレイバイオサイエンス, 日本東京), Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3468, DAKO, USA) を用いて DAB 染色を行い、ヘマトキシリンにて核染色を行った。光学顕微鏡 (IX70, OLYMPUS, 日本) にて観察し、Image J (ver. 1.48, NIH, USA) を使用して、MCP1 陽性部位の面積 (μm^2) を算出した。

7. *in vitro* 血管内皮細胞に対する SAA 刺激

ヒト大動脈血管内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells: HAECs) は、LONZA (USA) より購入し、培地 (EGM-2 Bulletkit, CC-3162, LONZA, USA) を用いて 10cm ディッシュにてコンフルエントに達するまで培養を行い、6well プレートに継代した。さらにコンフルエントに達した後、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度で human recombinant SAA (300-13, PEPROTECH, USA) を添加し、24 時間経過後に細胞を溶解し、回収した。また、SAA 受容体としての TLR2 の効果を解析するために、SAA 刺激 16 時間前に中和抗体として抗 TLR2 抗体 (MAB2616, R&D, USA) を添加 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) し、SAA 刺激 24 時間後に細胞を溶解し、回収した。

8. HAECs 発現 mRNA

回収した細胞溶解液を NucleoSpin® RNAII (740.955.05, MACHEREY-NAGEL, Germany) にて total RNA を抽出し, Primescript® RT-PCR Kit (RR014A, タカラ, 日本) にて逆転写, cDNA を合成した. この cDNA を鋳型とし Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM1), MCP1 の mRNA 検出, 定量化を real-time PCR 法にて施行した. また, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準とし, 相対発現量を算出した. 特異的プライマーは Primer3 (ver.0.4.0, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) を使用し, 作成した. 特異的プライマー配列は, ICAM1: sense 5'- CAAGGCCTCAGTCAGTGTGA -3', antisense 5'- CCTCTGGCTTCGTCAGAATC -3', VCAM1: sense 5'- AAAATGCCTGGGAAGATGGT -3', antisense 5'- GGTGCTGCAAGTCAATGAGA -3', MCP1: sense 5'- GACAAGTTTATGCCCCCTGA -3', antisense 5'- GAAGAATCGGCACTTGATCC -3', glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) : sense 5'- GTCAGTGGTGGACCTGACCT -3', antisense 5'- TCGCTGTTGAAGTCAGAGGA -3'であった. なお, real-time PCR はサイバーグリーン法を選択し, POWER SYBR® GREEN PCR MASTER MIX (436759, Life Technologies, USA) を使用した. 検出には, AB 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, USA) と 7500 system software (ver.1.3, Life Technologies, USA) を使用した.

9.統計解析

実験結果の統計学的解析は, SPSS for Windows® (ver. 16.0, SPSS Inc, USA) を使用し, P 値は $P < 0.05$ を*, $P < 0.01$ を**として示し, $P < 0.05$ より有意とした.

結果

1.動物の体重変化

IL-6 群, PBS 群ともに経時的な体重増加がみられ, 両群の成長に有意な差は認められなかった (図 4).

2.血清 SAA 濃度

血清 SAA 濃度は, PBS 群では, 6, 12 週ともに投与開始前と有意な差は認められなかった. 一方, IL-6 群では, 歯周組織に投与 1 日後急速に上昇し, 低下したが, 投与開始前と比較し, 有意に上昇した状態を全実験期間中持続していた. (図 5).

3.下顎骨の歯槽骨吸収

IL-6 群は PBS 群と比較し, 投与後 6 週の第 1 臼歯 (M1) 遠心根と第 2 臼歯 (M2) 近心根においてセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離が有意に増加し ($P < 0.05$) (図 6A), 12 週においては, IL-6 群の距離が長く, また, 第 1 臼歯近心根と第 2 臼歯近心根の歯根中央部の頰側歯槽骨の厚みは有意に減少した ($P < 0.01$) (図 6B).

4.大動脈内腔脂肪沈着

IL-6 群, PBS 群ともに 6 週では, 大動脈内腔に Susan IV 染色に染まる脂肪沈着は観察されなかった (図 7(A)). 一方, 12 週では, IL-6 群で脂肪沈着部位が増加し (図 7(A)), 脂肪沈着率も PBS 群と比較し, 有意に増加した ($P < 0.05$) (図 7(B)).

5.大動脈基始部の脂肪沈着

IL-6 群, PBS 群ともに, 6 週では大動脈基始部内腔の脂肪沈着は認められなかった (図 8(A)). 一方, 12 週では両群ともに, 脂肪沈着部位が増加し (図 8(A)), IL-6 群では PBS 群と比較し, 脂肪沈着率が有意に増加した ($P < 0.05$) (図 8(B)).

6.大動脈基始部の TLR2 発現程度, 部位

IL-6 群, PBS 群ともに, 血管内皮細胞とマクロファージに散在性に陽性細胞が認められた (図 9(A)). 大動脈内皮細胞における陽性細胞率は, PBS 群と比較し, IL-6 群で有意に増加した ($P < 0.05$). また, IL-6 群, PBS 群ともに経時的に増加を認めた. (図 9(B)).

7.大動脈基始部の MCP1 発現程度, 部位

IL-6 群, PBS 群ともに血管内皮細胞とマクロファージに陽性細胞が認められ, 経時的な病変部の増大とともに病変部での MCP1 の発現部位の増加を認めた (図 10(A)). IL-6 群では, PBS 群と比較し 6 週, 12 週ともに, MCP1 発現面積が増加した ($P < 0.05$) (図 10(B)).

8.HAECs における ICAM1, VCAM1, MCP1 mRNA 発現

HAECs に SAA 刺激を 24 時間施行した結果, ICAM1, VCAM1, MCP1 の mRNA 発現が, 刺激前と比較して有意に上昇した. また, SAA 刺激前に抗 TLR2 抗体を添加することにより, ICAM1 は 35 %, VCAM1 は 37 %, MCP1 は 44 %程度に mRNA 発現が抑制された (図 11).

考察

CVD は、アメリカ合衆国、ヨーロッパ諸国、日本、さらには、開発途上国でも死因の主な原因である。この CVD は、動脈硬化症に起因して発症することが多い。実際、動脈硬化症の悪化が、結果的に、CVD の発症、悪化につながる事が報告されている^{9,10}。この動脈硬化症の危険因子には、古典的なものとして高脂血症、高血圧、糖尿病、老化、喫煙、肥満が関与していることが報告されてきた¹¹、しかし、これらの因子が関与しない場合でも発症しうることが報告されており¹²、現在では、慢性炎症がより重要な危険因子として認知されている¹。動脈硬化症の初期病変である脂肪線条には、単球由来のマクロファージ、T リンパ球の炎症性細胞が浸潤している。これらの細胞の活性により炎症反応が持続し、IL-6、TNF- α などのサイトカインが産生され、脂肪線条部位にさらなる炎症性細胞の浸潤が起こり、動脈硬化病変はより複雑な病態を形成し、脆弱性を増していく¹³。以上から、炎症、免疫応答は、動脈硬化症の初期からすべての段階に関与するといえる¹⁴。

一方、歯周病も口腔内細菌により誘発される局所の慢性炎症性疾患である。すなわち、歯肉に、口腔内細菌が感染して発症し、好中球、感作、活性化したマクロファージやリンパ球の過剰反応により硬軟両組織が破壊される¹⁵。マクロファージは、プラーク中の細菌の表面抗原、リポ多糖などに応答し、さまざまな炎症誘発性サイトカイン（IL-6、IL-1 β 、TNF- α など）を分泌し、これらのサイトカインが宿主応答を修飾する。なかでも IL-6 は、単球/マクロファージ、線維芽細胞、リンパ球などの様々な細胞により産生、分泌され、歯周病における主要なサイトカインの 1 つである。重度の歯周病患者では血清 IL-6 濃度が上昇し^{16,17}、歯周病治療によりその濃度が減少することが報告されている^{18,19}。

この 15 年間、多くの臨床疫学研究により歯周病と動脈硬化症に関連性のあることが報告されており³⁻⁶、両疾患の関連機序に関しては、歯周病患者における炎症性マーカーの上昇の関与^{20,21}、特に急性炎症反応性タンパク質である C 反応性タンパク（CRP）や SAA の血中濃度の増加が、アテローム性動脈硬化症と相関性を示した疫学研究が報告されている^{22,23}。しかし、これらのタンパク質が CVD の病因となっているのか、ただ単に炎症状態を示すマーカーであるのかは依然として結論はでない。

我々は以前、ApoE^{+/+}マウスに *P.g.*菌を感染させ、動脈硬化病変に対する影響を検索した。その結果、注入後に動脈硬化病変が増加し、病変部の大きさが血清 SAA レベルに相関していることを報告した⁷。次に、複雑な両疾患の関連機序を単純化し、関連しやすい因子から解

明するために、動脈硬化病変非感受性の ddY マウスの歯周組織に歯周病の代表的なサイトカインである IL-6 を注入した結果、肝臓で特異的に発現している遺伝子は、急性期タンパク、特に SAA 遺伝子であり、IL-6 は SAA mRNA を特異的に発現増加していることをマイクロアレイにて検出し、血中 SAA の上昇も確認した⁸⁾。さらに、ApoE^{-/-}マウスに、IL-6 を腹腔内投与した結果、IL-6 刺激により同様に肝臓で SAA が産生され、血中 SAA 濃度が上昇し、動脈硬化病変が増大することを確認した。しかし、これらの研究は短期間の IL-6 投与の影響であり、慢性疾患である歯周病の病態を再現していない。

そこで、本研究では歯周病、すなわち局所の低レベル慢性炎症状態が動脈硬化症に影響する機序を解明する一助として、ApoE^{-/-}マウスの口腔内に IL-6 を週 3 回、12 週間継続投与して、慢性炎症状態を作成し、その後の肝臓から産生される SAA の動脈硬化症への影響を検討した。

本研究では、すべての動物に普通食を与え飼育した。また、マウスは動脈硬化病変に対して感受性が低く、病変が出来にくいので、動脈硬化病変を起こしやすい ApoE^{-/-}、雄マウスを実験に供した^{9, 24)}。

血中 SAA 濃度は、過去の研究結果と同様に IL-6 投与後急速に上昇し、降下したが、投与開始前の濃度まで回復する前に次の投与を施行したので、投与前と比較し、全実験期間を通じて有意に上昇していた。このことから、擬似的な慢性炎症状態を再現することができたと考えている。

SAA は、脊椎動物における主要な急性期タンパクの 1 つであり²⁷⁾、急性炎症刺激に応答して 100~1,000 倍に増加する²⁷⁻²⁹⁾。また、肥満やメタボリックシンドロームのように発現レベルが低くても、心臓血管疾患イベントの予知因子となることが報告されている^{30, 31)}。この機序としては、マクロファージおよび内皮細胞と high density lipoprotein (HDL) との結合の促進³²⁾、マクロファージからコレステロールを放出させる HDL の機能を抑制³³⁾、単球の走化能と接着能の亢進³⁴⁾などが報告されている。

SAA の動脈硬化症発症への直接的経路を検索した報告としては、Dong ら²⁵⁾が ApoE^{-/-}マウスにマウス SAA レンチウイルスを感染させ、SAA 高発現マウスを作成した研究がある。その結果、動脈硬化病変部位が増大し、血中 SAA、IL-6、TNF- α 濃度の上昇、病変部位へのマクロファージの浸潤、血管内皮細胞における接着因子 (VCAM1) の発現上昇を確認している。しかし、De Beer ら²⁶⁾ は普通食を与えた 50 週齢の ApoE^{-/-} SAA^{-/-}ダブルノックアウトマウスの動脈硬化病変は、ApoE^{-/-}マウスと比較し、動脈硬化病変の大きさに変化がなく、さらに、

雄性 ApoE^{-/-} SAA^{-/-}ダブルノックアウトマウスにおいては高脂肪食を与えても、ApoE^{-/-}と比較し、動脈硬化病変の大きさに変化がないため、SAA はアテローム性動脈硬化症に影響を与えないと報告しており、SAA の動脈硬化症への詳細な作用機序については未だ不明のままである。

本研究の大動脈内腔の脂肪沈着率は、Dong ら²⁵⁾の SAA レンチウイルスを感染させた ApoE^{-/-}マウスと比較すると 1/10 程度ではあるが、IL-6 群 12 週において、脂肪沈着率が有意に増加していた。この脂肪沈着率の増加原因として考えられる SAA の関与をさらに詳細に検討するために、SAA レセプターの発現と、動脈硬化症の進行に関わる MCP1 を免疫組織学的に検索した。SAA のレセプターに関して多くの報告があり³⁵⁻⁴⁹⁾、CD36³⁵⁾、ABCA1³⁶⁻³⁸⁾、ABCA7³⁷⁾、SCRB1^{38, 39)}、TLR2⁴⁰⁾、TLR4⁴¹⁾、CST3⁴²⁾、FPR2⁴³⁻⁴⁶⁾、AGER⁴⁷⁾、OmpA2⁴⁸⁾などがこれまで SAA のレセプターとして報告されている。このうち、CD36、TLR2、TLR4 は、動脈硬化症を促進する SAA レセプターとして報告されており、ABCA1、SCRB1、CST3、AGER は動脈硬化症を抑制する SAA レセプターとして報告されている。以前の我々の研究において、HAECs に SAA を添加後、SAA のレセプターの 1 つである TLR2 の mRNA 発現が著明であったことから、本研究では、TLR2 に注目した。その結果、IL-6 群においては、血管内膜に TLR2 の発現が増加した。また、経時的な病変部の増大とともに MCP1 の発現も増加したことから、*in vitro*で HAECs を用いた SAA 刺激実験を施行した。動脈硬化症の病巢中に、マクロファージやリンパ球が集積することが報告されており⁵¹⁾、Huang ら⁵⁰⁾は、病巢中で HDL や Apolipoprotein A-I (ApoA1) が myeloperoxidase (MPO) により酸化され、血管内皮細胞の VCAM1 の発現上昇、マクロファージの ATP-binding cassette transporter (ABCA1) 依存性コレステロール排出能の低下を引き起こし、動脈硬化症を進行させることを報告している。しかし、MPO による HDL や ApoA1 の酸化は、内皮細胞の反応ではないため、本研究では単球を内皮細胞に強固に接着させる ICAM1、VCAM1、単球を血管内皮下へ浸潤させる MCP1 の発現を解析した。その結果、SAA 刺激により、ICAM1、VCAM1、MCP1 の発現が上昇するが、刺激前に抗 TLR2 抗体を添加することにより、発現が抑制された。これらのことから、IL-6 刺激により肝臓で産生された SAA が、血管内皮細胞上の SAA 受容体の 1 つである TLR2 に結合し、動脈硬化症の進行に関わる接着因子 (ICAM1、VCAM1) と単球走化因子 (MCP1) を発現させ、単球が血管内皮下に浸潤しやすくすることにより、増悪因子として関与する可能性が示された。また、病変部の増大とともに MCP1 の発現が増加することから、経時的に単球の浸潤も増加し、動脈硬化症が増大することも推察され

る. すなわち, 局所の低レベル慢性炎症状態と動脈硬化症をつなぐ 1 つの経路が示唆されたと考えている. すなわち, SAA が TLR2 を介して血管内皮細胞に刺激を与え, 上述の報告のごとく血管内皮細胞における接着因子の発現が上昇し, 病変部位への単球の浸潤を起こしたのかもしれない.

本研究により, 歯周病のような低レベル慢性炎症状態が, 動脈硬化病変に影響を与える機序の 1 つとして, IL-6 誘導性 SAA による機序が確認された. SAA が影響する機序については, TLR2 以外のレセプターの発現, 血管内皮細胞への作用について詳細に検討する必要がある. 今後, 老年疾患でもある動脈硬化症において, SAA とその受容体を介した動脈硬化症と生物学的老化の関係, 詳細なメカニズムの解明も検討する必要がある.

結論

本研究では, 歯周病に代表される局所の低レベル慢性炎症状態が動脈硬化症に影響する機序を解明する一助として, 動脈硬化症易形成性マウスの歯周組織に IL-6 を注入し, 肝臓からの SAA の産生を上昇させ, 動脈硬化症への影響を検討した. さらに, HAECs に SAA 刺激を加え, 接着因子, 単球走化因子の発現を解析した. その結果, SAA が TLR2 を介して, 動脈硬化症の発症, 進展に重要な役割を果たしていることが示された. すなわち, 局所の低レベル慢性炎症状態と動脈硬化症をつなぐ 1 つの経路が示唆された.

謝辞

本論文を作成するにあたり, 主指導教員の吉成伸夫教授から, 丁寧かつ熱心なご指導を賜りました. ここに感謝の意を表します. そして, 多くのご指導を下さりました副指導教員の宇田川信之教授, 小笠原正教授, 日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた歯科保存学講座の皆様, 心からの感謝の意を表します.

参考文献

- 1) Ross R (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-26.
- 2) Li Li L, Messas E, Batista EL Jr, Levine RA and Amar S (2002) Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. *Circulation* 105:861-7.
- 3) Mattila KJ, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV and Hietaniemi KL (1993) Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 103:205-11.
- 4) Mattila KJ1, Valle MS, Nieminen MS, Valtonen VV, Hietaniemi KL. (1993) Dental infections and coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 103: 205–11.
- 5) Beck J1, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. (1996) Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 67: 1123–37.
- 6) Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DRJ, Papapanou PN and Sacco RL (2003) Relationship between periodontal disease, tooth loss and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke* 34:2120-5.
- 7) Champagne C, Yoshinari N, Oetjen J, Riché E, Beck J and Offenbacher S (2009) Gender Differences in Systemic Inflammation and Atheroma Formation Following Porphyromonas gingivalis Infection in Heterozygous Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J Periodont Res* 44:569-77.
- 8) 尾藤 睦 (2006) 歯周組織より注入した Interleukin-6 によるマウス肝臓での遺伝子発現. *愛院大歯誌* 44:51-62.
- 9) Nichols TC, Fischer TH, Deliargyris EN and Baldwin AS Jr (2001) Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis and atherogenesis. *Ann Periodontol* 6:20-9.
- 10) Isidori AM, Giannetta E, Pozza C, Bonifacio V and Isidori A (2005) Androgens, cardiovascular disease and osteoporosis. *J Endocrinol Invest* 28 (Suppl. 10):73-9.
- 11) Ellis JL1, Campos-Outcalt D.(1994)Cardiovascular disease risk factors in native

Americans: a literature review. *Am J Prev Med* 10:295-307

12) O'Connor S, Taylor C, Cambell LA, Epstein S and Libby P (2001) Potential infectious etiologies of atherosclerosis: a multifactorial perspective. *Emerg Infect Dis* 7:780-8.

13) Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-9.

14) Libby P, Ridker PM and Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-43.

15) Kornman KS, Page RC and Tonetti MS (1997) The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology* 2000 14:33-53.

16) Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM and van der Velden U (2000) Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 71:1528-34.

17) Sun XJ, Meng HX, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen ZB, Feng XH, Lu RF and Ren XY (2009) Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* 44:311-6.

18) D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, Suvan J, Brett PM, Ready D and Tonetti MS (2004) Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 83:156-60.

19) Elter JR, Hinderliter AL, Offenbacher S, Beck JD, Caughey M, Brodala N and Madianos PN (2006) The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. *Am Heart J* 151:47.e1-47.e6.

20) Slade GD, Ghezzi EM, Heiss G, Beck JD, Riche E and Offenbacher S (2003) Relationship between periodontal disease and C-reactive protein among adults in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Arch Intern Med* 163:1172-9.

21) Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ and Willmann DE (1997) Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol* 107:347-52.

22) Erren M, Reinecke H, Junker R, Fobker M, Schulte H, Schurek JO, Kropf J,

- Kerber S, Breithardt G, Assmann G and Cullen P (1999) Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2355-63.
- 23) Schillinger M, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, Nikowitsch R, Timmel E, Kickinger B, Minar C, Pones M, Lalouschek W, Rumpold H, Maurer G, Wagner O, Minar E. *Circulation*. (2005) Inflammation and Carotid Artery—Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS). *Circulation* 111: 2203-9.
- 24) Zhang SH, Reddick RL, Burkey B and Maeda N (1994) Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for Apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* 94:937-45.
- 25) Dong Z, Wu T, Qin W, An C, Wang Z, Zhang M, Zhang Y, Zhang C and An F (2011) Serum Amyloid A Directly Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Molmed* 17: 1357-64.
- 26) De Beer MC, Wroblewski JM, Noffsinger VP, Rateri DL, Howatt DA, Balakrishnan A, Ji A, Shridas P, Thompson JC, van der Westhuyzen DR, Tannock LR, Daugherty A, Webb NR, De Beer FC. (2014) Deficiency of endogenous acute phase serum amyloid A does not affect atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 255-61.
- 27) Uhlir CM and Whitehead AS (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 265:501-23.
- 28) Malle E and De Beer FC (1996) Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest* 26:427-35.
- 29) Malle E, Steinmetz A and Raynes JG (1993) Serum amyloid A (SAA) : an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis* 102:131-46.
- 30) Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hultén LM, Hiukka A and Taskinen MR (2003) Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 166:387-94.
- 31) Tamakoshi K, Yatsuya H, Kondo T, Hori Y, Ishikawa M, Zhang H, Murata C, Otsuka R, Zhu S and Toyoshima H (2003) The metabolic syndrome is associated with elevated circulating C-reactive protein in healthy reference range, a systemic

- low-grade inflammatory state. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:443-9.
- 32) Hayat S and Raynes JG (2000) Acute phase serum amyloid A protein increases high density lipoprotein binding to human peripheral blood mononuclear cells and an endothelial cell line. *Scand J Immunol* 51:141-6.
- 33) Artl A, Marsche G, Pussinen P, Knipping G, Sattler W and Malle E (2002) Impaired capacity of acute-phase high density lipoprotein particles to deliver cholesteryl ester to the human HUH-7 hepatoma cell line. *Int J Biochem Cell Biol* 34:370-81.
- 34) Badolato R, Wang JM, Stornello SL, Ponzi AN, Duse M and Musso T (2000) Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis and enhancement of anti-Candida activity. *J Leukoc Biol* 67:381-6.
- 35) Baranova IN, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Kurlander R, Chen Z, Fu D, Arias IM, Csako G, Patterson AP and Eggerman TL (2010) CD36 is a novel serum amyloid A (SAA) receptor mediating SAA binding and SAA induced signaling in human and rodent cells. *J Biol Chem* 285:8492-506.
- 36) Stonik JA, Remaley AT, Demosky SJ, Neufeld EB, Bocharov A and Brewer HB (2004) Serum Amyloid a promotes ABCA1-dependent and ABCA1-independent lipid efflux from cells. *Biochem Biophys Res Commun* 321:936-41.
- 37) Abe-Dohmae S, Kato KH, Kumon Y, Hu W, Ishigami H, Iwamoto N, Okazaki M, Wu CA, Tsujita M, Ueda K and Yokoyama S (2006) Serum amyloid A generates high density lipoprotein with cellular lipid in an ABCA1- or ABCA7-dependent manner. *J Lipid Res* 47:1542-50.
- 38) van der Westhuyzen DR, Cai L, de Beer MC and de Beer FC (2005) Serum Amyloid A Promotes Cholesterol Efflux Mediated by Scavenger Receptor B-I. *J Biol Chem* 280:35890-5.
- 39) Baranova IN, Vishnyakova TG, Bocharov AV, Kurlander R, Chen Z, Kimelman ML, Remaley AT, Csako G, Thomas F, Eggerman TL and Patterson AP (2005) Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated

protein kinases. *J Biol Chem* 280:8031-40.

40) Cheng N, He R, Tian J, Ye PP and Ye RD (2008) Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol* 181:22-6.

41) Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, Monteiro HP, Russo M and Campa A (2008) Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J Leukoc Biol* 83:1174-80.

42) Bokarewa M, Abrahamson M, Levshin N, Egesten A, Grubb A, Dahlberg L and Tarkowski A (2007) Cystatin C binds serum amyloid A, downregulating its cytokine-generating properties. *J Rheumatol* 34:1293-301.

43) Su SB, Gong W, Gao JL, Shen W, Murphy PM, Oppenheim JJ and Wang JM (1999) A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med* 189:395-402.

44) Lee HY, Kim MK, Park KS, Bae YH, Yun J, Park JI, Kwak JY and Bae YS (2005) Serum amyloid A stimulates matrix-metalloproteinase-9 upregulation via formyl peptide receptor like-1-mediated signaling in human monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 330:989-98.

45) Björkman L, Karlsson J, Karlsson A, Rabiet MJ, Boulay F, Fu H, Bylund J and Dahlgren C (2008) Serum amyloid A mediates human neutrophil production of reactive oxygen species through a receptor independent of formyl peptide receptor like-1. *J Leukoc Biol* 83:245-53.

46) Lee HY, Kim SD, Shim JW, Lee SY, Lee H, Cho KH, Yun J and Bae YS (2008) Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes. *J Immunol* 181:4332-9.

47) Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D and Kindy M (2000) Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med* 6:643-51.

48) Shah C, Hari-Dass R and Raynes JG (2006) Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 108:1751-7.

49) Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K and Silverstein RL (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor

CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 105:1049-56.

50) Ying Huang, Joseph A DiDonato, Bruce S Levison, Dave Schmitt, Lin Li, Yuping Wu, Jennifer Buffa, Timothy Kim, Gary S Gerstenecker, Xiaodong Gu, Chandra S Kadiyala, Zeneng Wang, Miranda K Culley, Jennie E Hazen, Anthony J DiDonato, Xiaoming Fu, Stela Z Berisha, Daoquan Peng, Truc T Nguyen, Shaohong Liang, Chia-Chi Chuang, Leslie Cho, Edward F Plow, Paul L Fox, Valentin Gogonea, W H Wilson Tang, John S Parks, Edward A Fisher, Jonathan D Smith, Stanley L Hazen (2014) An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *nature medicine* 20: 2 193-203.

51) A. M. Gown, T. Tsukada, R. Ross (1986) Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 125: 191–207.

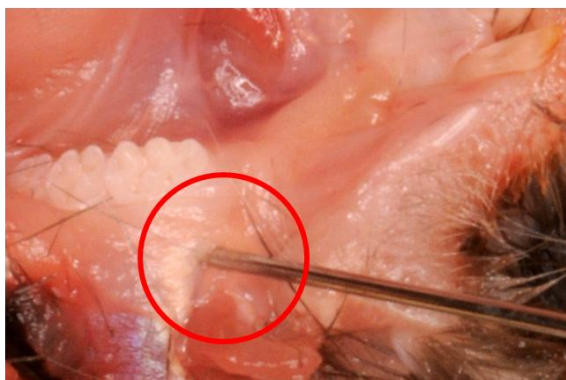


图 1. IL-6, PBS 投与部位

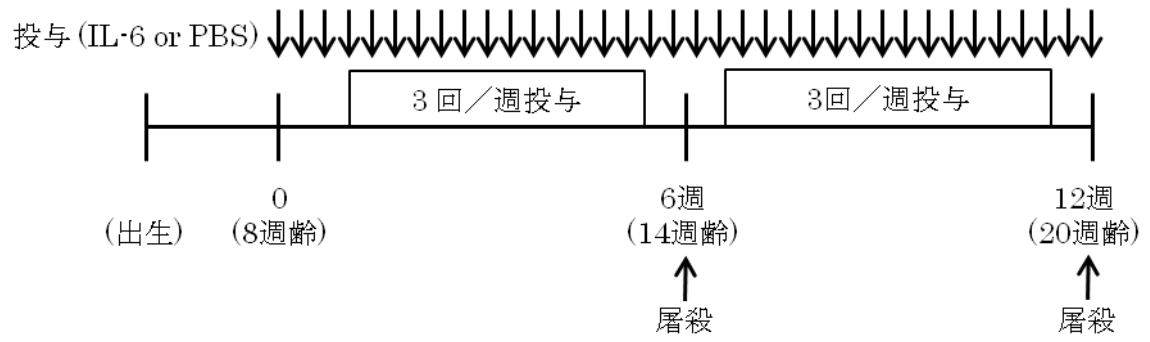


図 2. 実験スケジュール

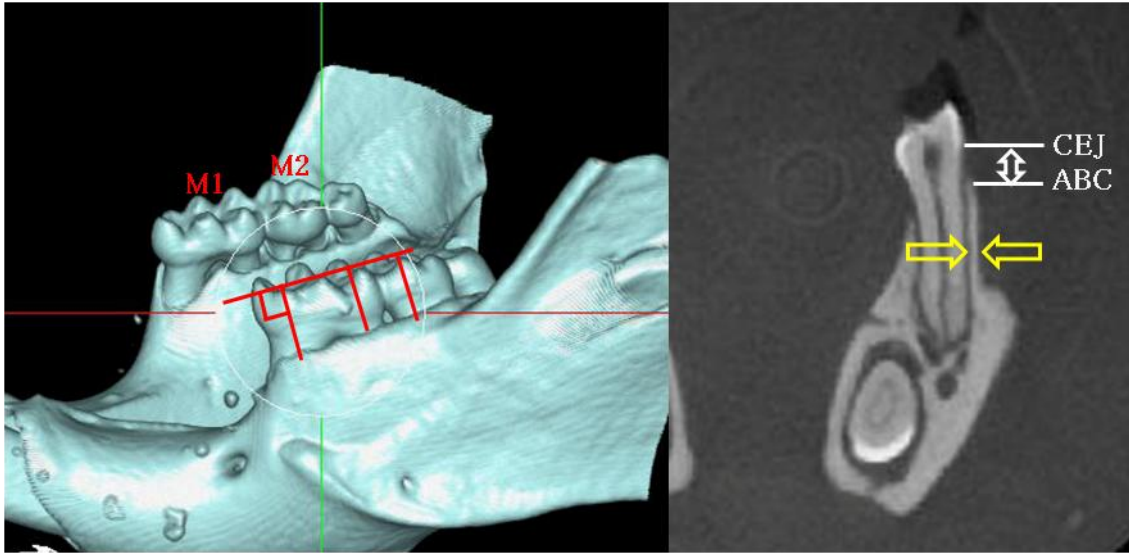


図 3. 投与部位周辺の歯槽骨吸収量 (CEJ-ABC)と 歯槽骨幅 (黄色矢印間) の測定部位

CEJ: セメントエナメル境

ABC: 歯槽骨頂

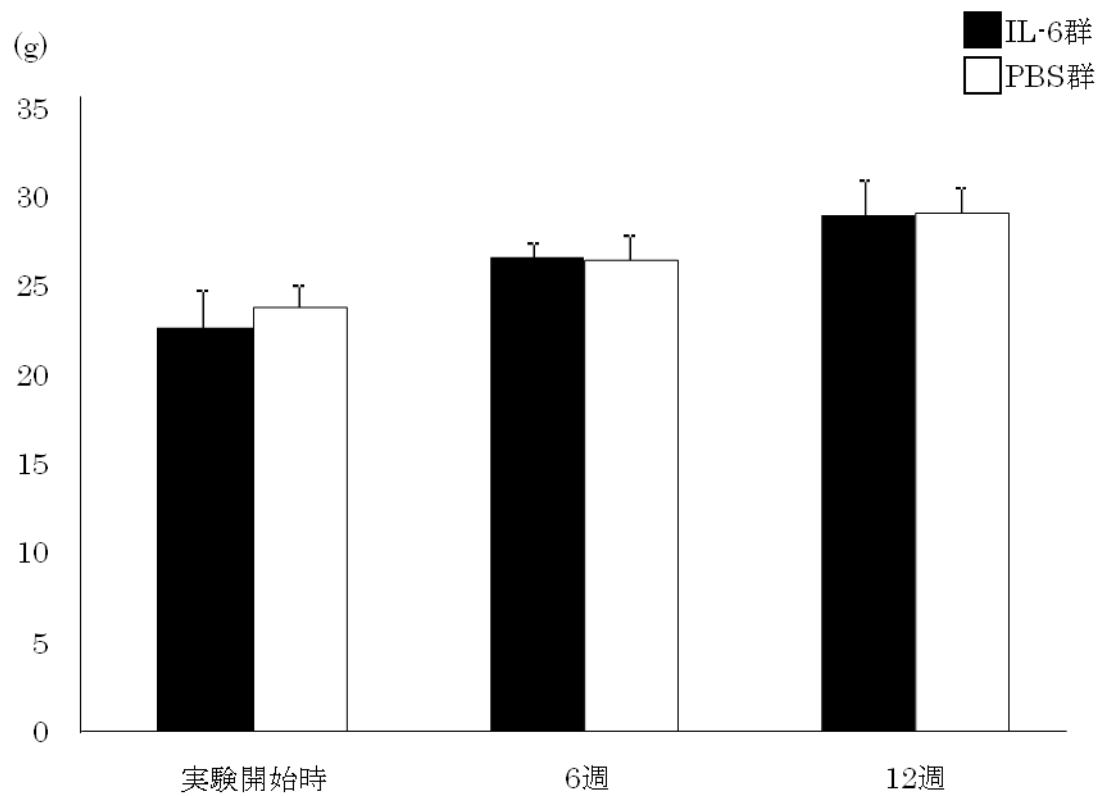


図 4. 動物の体重

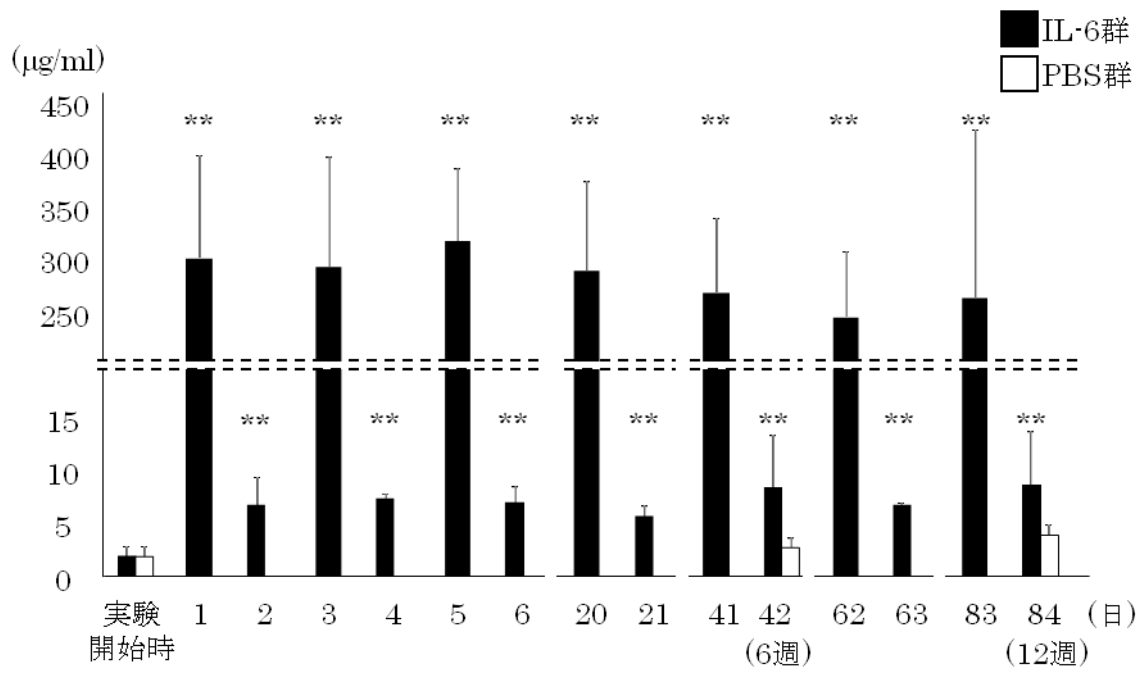


図 5. 血清 SAA 濃度

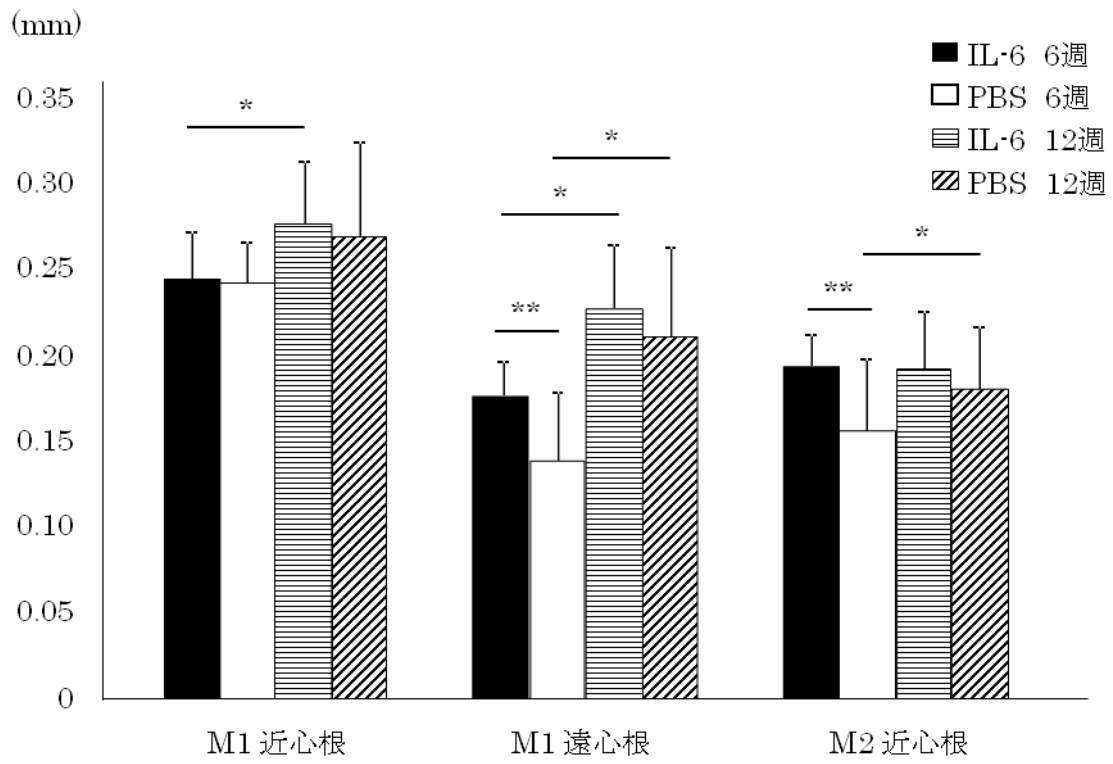


図 6(A). 投与部位周辺の歯槽骨吸収 (CEJ-ABC)

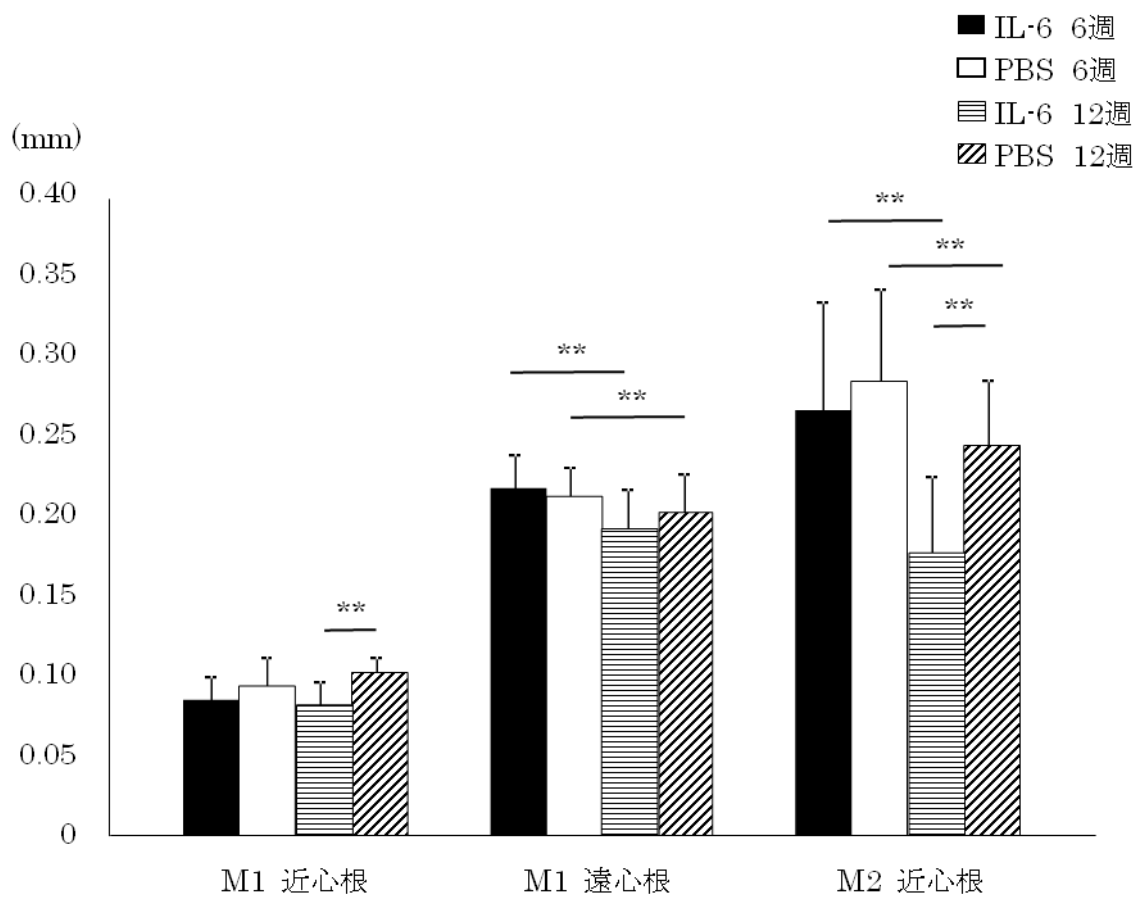


図 6(B). 投与部位周辺の歯槽骨幅 (歯根中央部頰側)

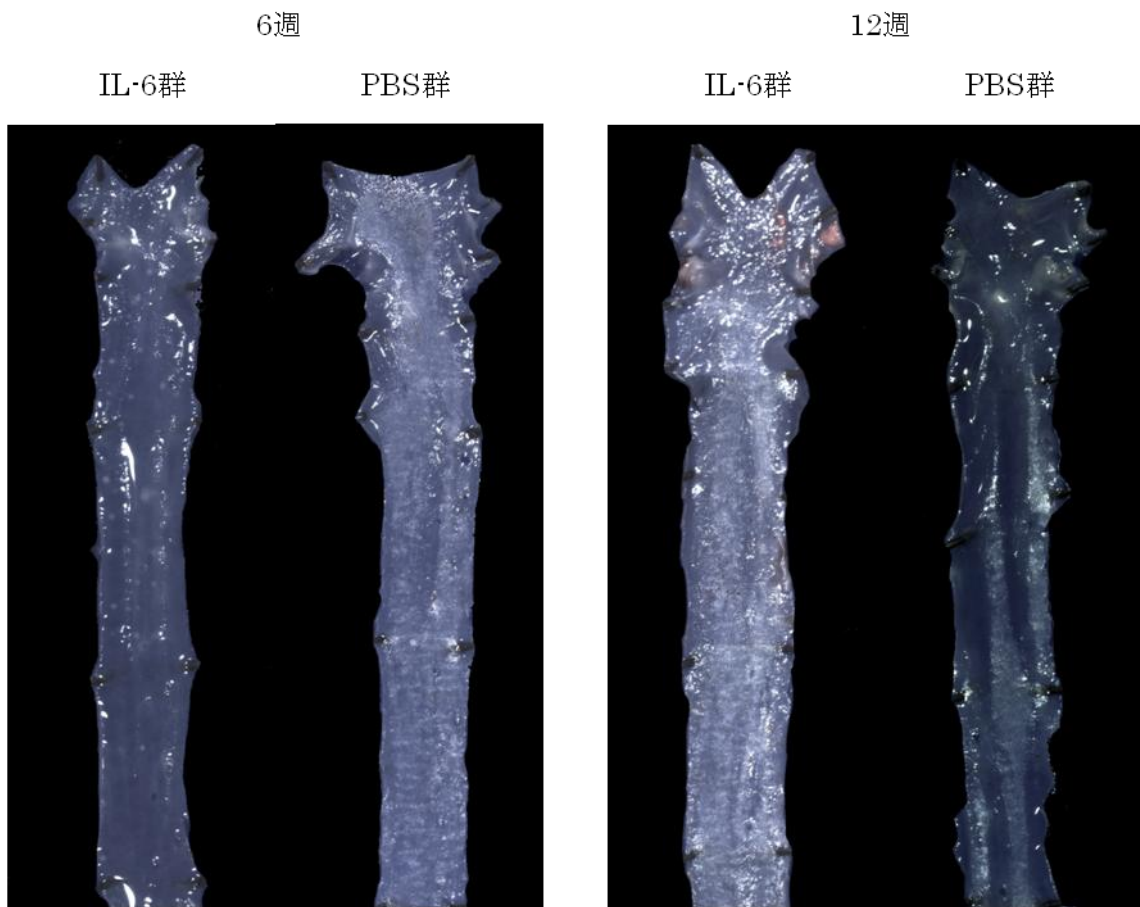


図 7 (A). 大動脈内腔の脂肪沈着写真 (Sudan IV 染色)

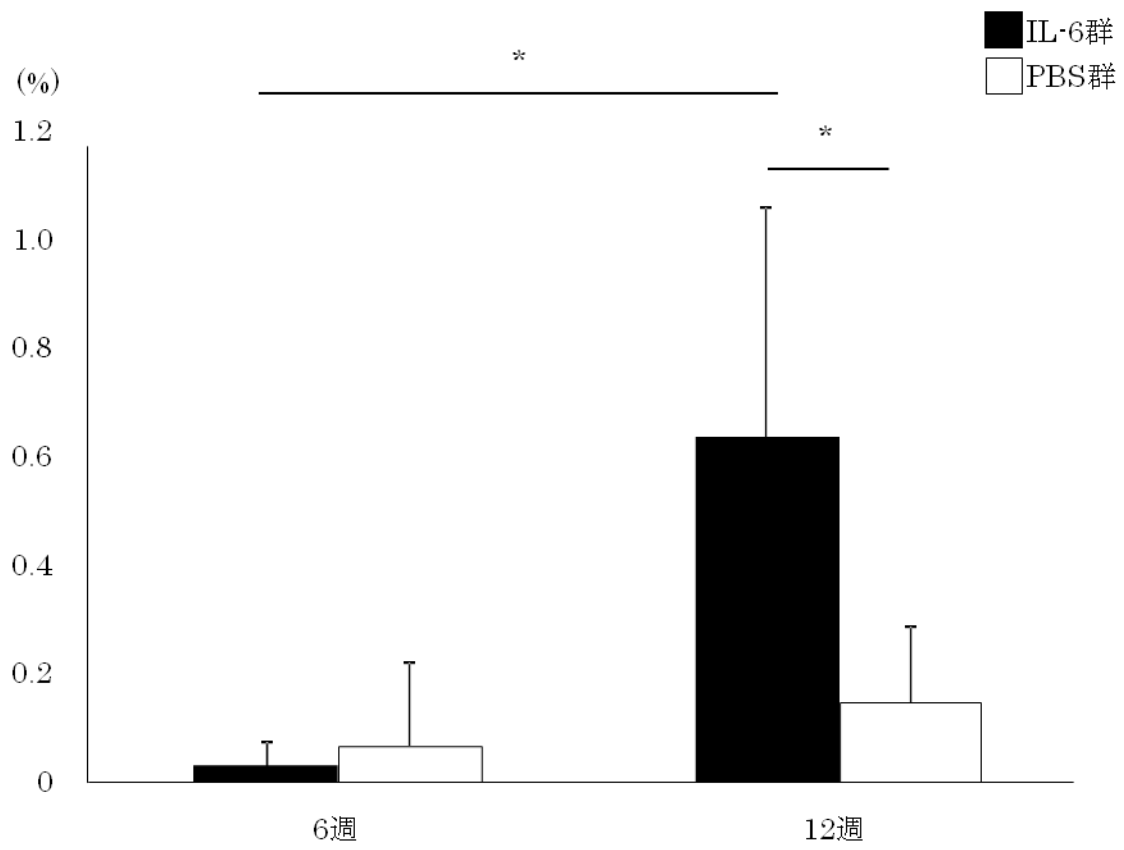


図 7 (B). 大動脈内腔の脂肪沈着率

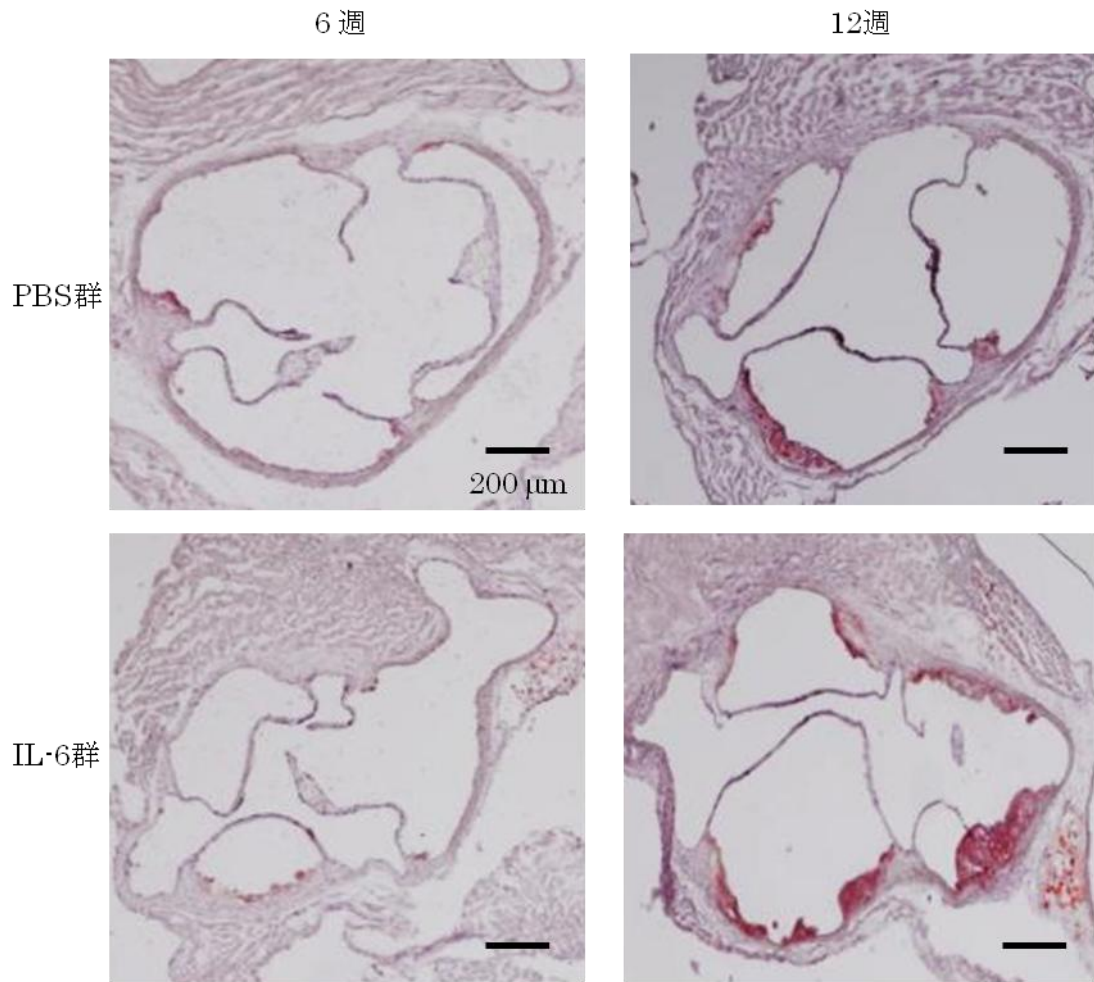


図 8(A). 大動脈基始部の脂肪沈着 (SudanIV 染色)

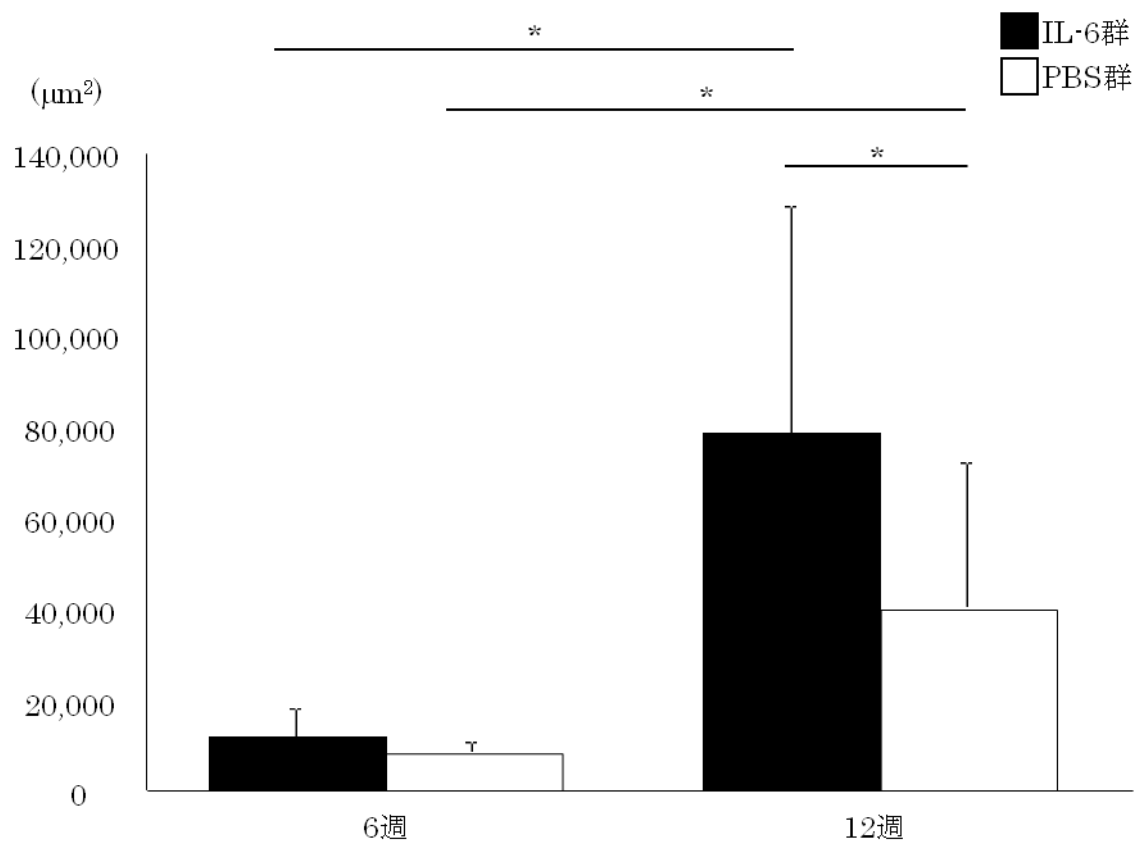


図 8(B). 大動脈基始部の脂肪沈着面積

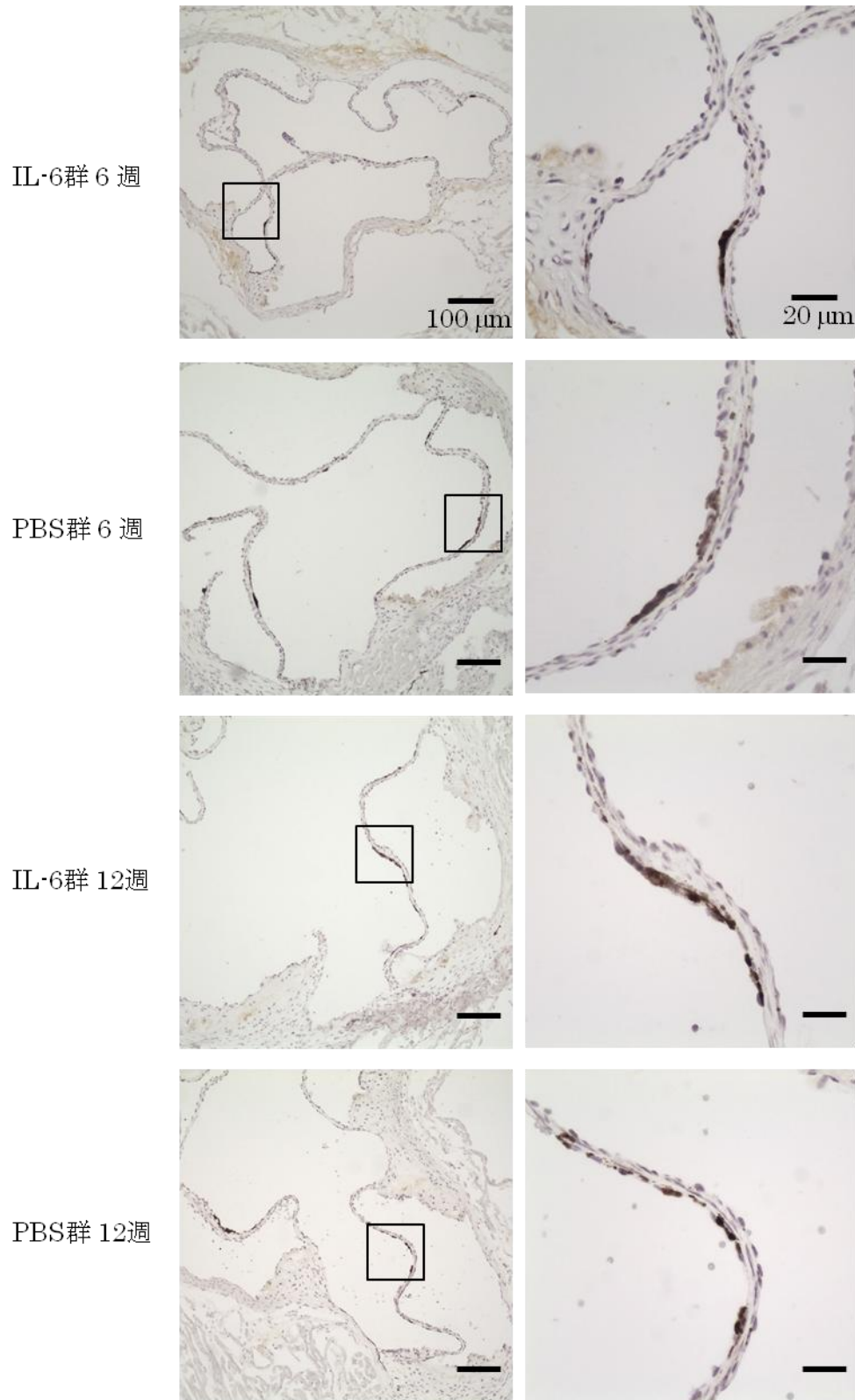


図 9(A). 大動脈基始部の TLR2 発現部位

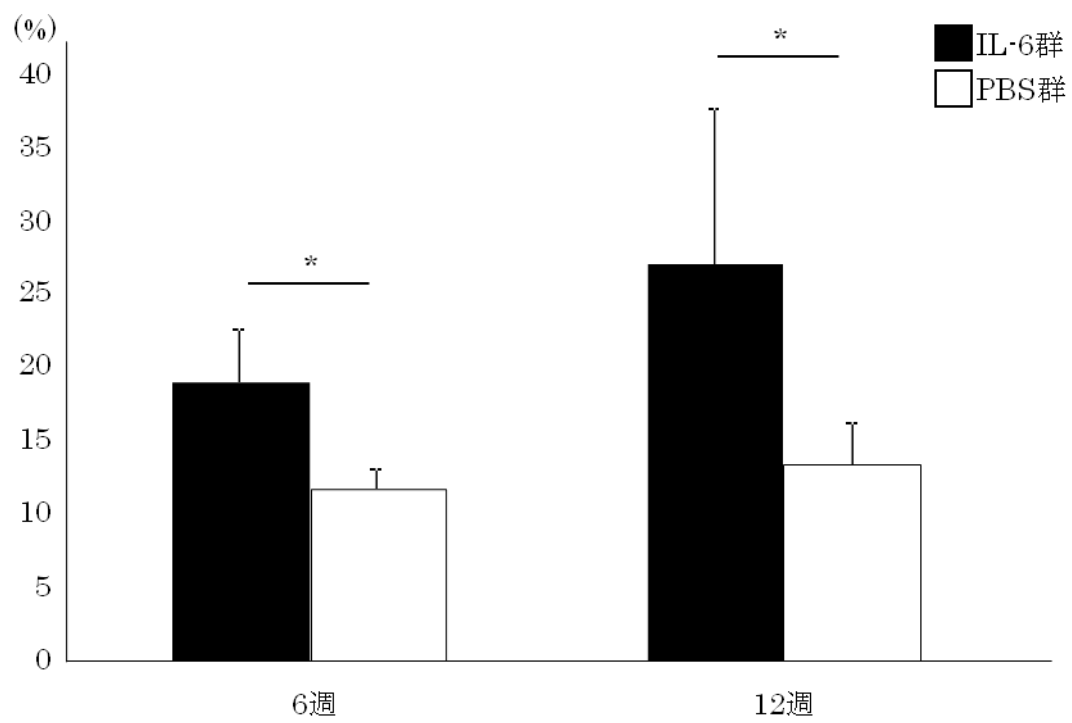


図 9(B). 大動脈基始部の TLR2 陽性部位率

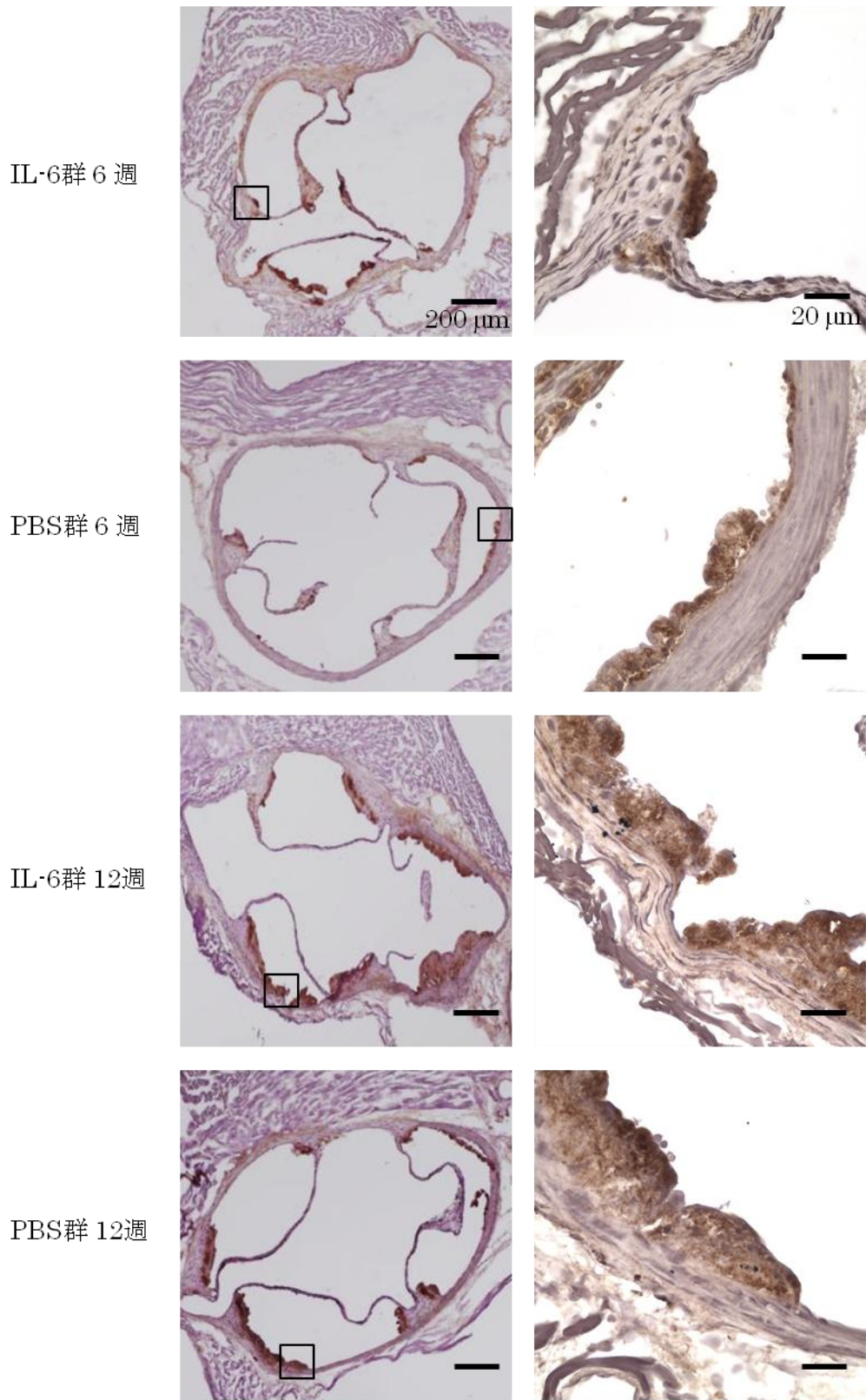


図 10(A). 大動脈基始部の MCP1 発現

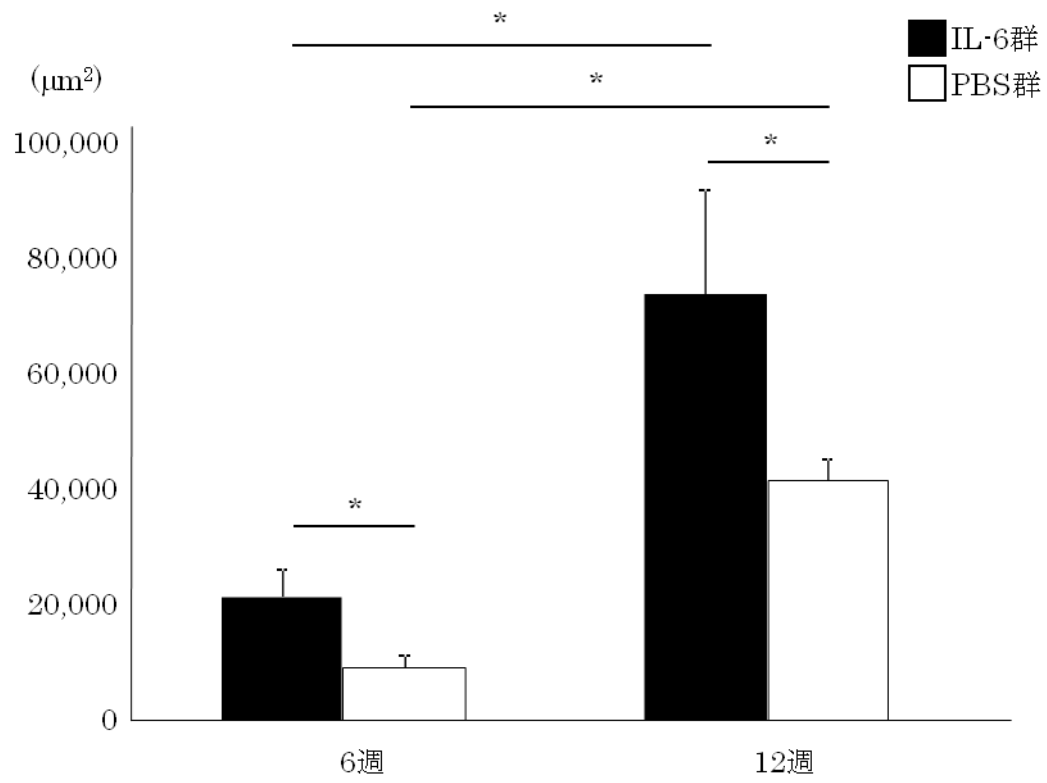


図 10(B). 大動脈基始部の MCP1 発現面積

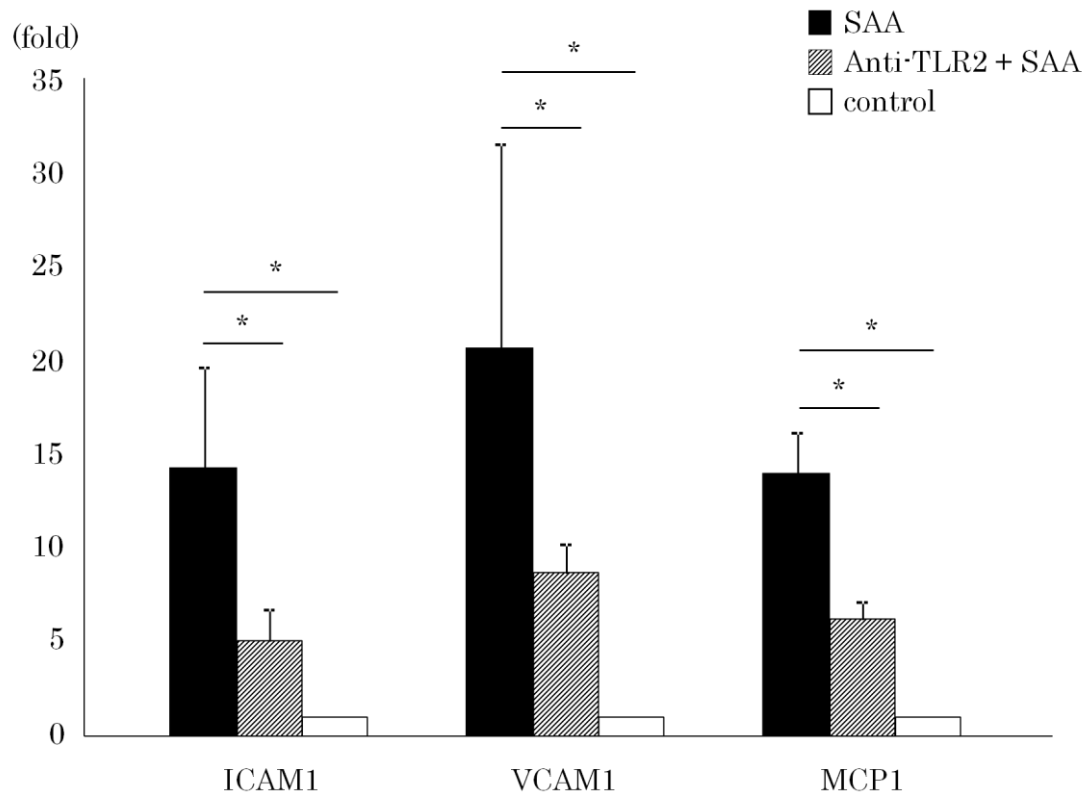


図 11. HAECs における ICAM1, VCAM1, MCP1mRNA の発現

図表の説明

図 1. IL-6, PBS 投与部位

全身麻酔下で、33G の注射針を用いて PBS 群には 0.1% BSA 含有 PBS を, IL-6 群には, 25ng/ μ l の recombinant mouse IL-6 を, 下顎臼歯部頰側に 10 μ l 注入した.

図 2. 実験スケジュール

8 週齢の雄性 ApoE^{+/+}マウスを 24 匹使用し, 各々 IL-6 群, PBS 群に分けた. 投与は 8 週齢に達した日から, 隔日で行い, 投与開始後, 各群 6, 12 週経過後に 6 匹ずつ屠殺した.

図 3. 投与部位周辺の歯槽骨吸収量と歯槽骨幅の測定部位

注射部位周辺の歯槽骨の測定部位を示す. M1 近心根, M1 遠心根, M2 近心根の根尖を観察できる位置 (赤線) の前頭断面の画像を用いて各々の CEJ から ABC までの距離 (白矢印), 前頭断面から歯根中央部頰側の歯槽骨幅 (黄矢印) を測定した.

図 4. 動物の体重

PBS 群, IL-6 群における体重変化を示す (各群: n=6). グラフは平均値 \pm 標準偏差で示す.

図 5. 血清 SAA 濃度

ELISA 法による血清 SAA 濃度の測定結果を示す (各群: n=3). グラフは平均値 \pm 標準偏差で示す (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, kruskal-wallis test, 実験開始時と比較).

図 6. 投与部位周辺の歯槽骨吸収, 歯槽骨幅

(A): 投与部位周辺の歯槽骨吸収 (CEJ-ABC)

摘出した下顎骨を μ CTにて撮影後, M1 近心根, M1 遠心根, M2 近心根の頰側の歯槽骨吸収 (CEJ から ABC) を測定した結果を示す (各群: n=12). グラフは平均値 \pm 標準偏差で示す (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, Wilcoxon rank sum test).

(B): 投与部位周辺の歯槽骨幅 (歯根中央部頰側)

M1 近心根, M1 遠心根, M2 近心根の歯根の頰側歯槽骨幅を測定した結果を示す (各

群: n=12). グラフは平均値±標準偏差で示す (**: $P < 0.01$, Wilcoxon rank sum test).

図 7. 大動脈内腔の脂肪沈着

(A): 大動脈内腔の脂肪沈着写真 (Sudan IV 染色)

各群の 6 週, 12 週の大動脈の内腔を示す.

(B): 大動脈内腔の脂肪沈着率

大動脈内腔の脂質沈着程度を, 血管内腔表面積全体に対する染色部位の割合 (脂質沈着面積/大動脈内腔面積×100) にて算出した結果を示す (各群: n=6). グラフは平均値±標準偏差で示す (*: $P < 0.05$, Mann-Whitney test).

図 8. 大動脈基始部の脂肪沈着

(A): 大動脈基始部の脂肪沈着 (SudanIV 染色)

大動脈基始部の Sudan IV 染色像を示す. IL-6 群, PBS 群ともに, 6 週では染色部位は認められなかった. 一方, 12 週では両群ともに, 染色部位が増加し, IL-6 群では PBS 投与群と比較し, 染色部位が増加した.

(B): 大動脈基始部の脂肪沈着面積

大動脈基始部内腔の脂質沈着面積を算出した結果を示す (各群: n=3). グラフは平均値±標準偏差で示す (*: $P < 0.05$, Mann-Whitney test).

図 9. 大動脈基始部の TLR2 発現

(A): 大動脈基始部の TLR2 発現部位

大動脈基始部における, TLR2 の免疫染色結果を示す. 両群ともに, 血管内皮細胞とマクロファージに散在性に染色部位を認めた.

(B): 大動脈基始部の TLR2 陽性部位率

大動脈基始部の TLR2 陽性部位の割合 (大動脈弁の TLR2 陽性内皮細胞の長さの総和/大動脈弁の全ての内皮細胞の長さの総和×100) を算出した結果を示す (各群: n=3). グラフは平均値±標準偏差で示す (*: $P < 0.05$, Mann-Whitney test).

図 10. 大動脈基始部の MCP1 発現

(A): 大動脈基始部の MCP1 発現部位

大動脈基始部における, MCP1 の免疫染色を行った結果を示す. IL-6 群では, 6 週, 12 週ともに, PBS 群と比較し, 病変部の染色部位が増加しており, 経時的な病変部の増大とともに染色部位も増加した.

(B): 大動脈基始部の MCP1 陽性部位面積

大動脈基始部の MCP1 陽性部位の面積を算出した結果を示す (各群: n=3). グラフは平均値±標準偏差で示す (*: $P < 0.05$, Mann-Whitney test).

図 11. HAECs における ICAM1, VCAM1, MCP1 mRNA 発現

SAA 刺激 HAECs における ICAM1, VCAM1, MCP1 の mRNA 発現結果を示す (各群: n=3). グラフは平均値±標準偏差で示す (*: $P < 0.05$, Wilcoxon rank sum test).