

学位論文

大動脈血管内皮細胞への炎症性刺激による  
老化関連因子の検討

田井 康寛

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座  
(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

Examination of aging-related factors from the aortic endothelial  
cell by inflammatory stimulation.

Yasuhiro Tai

Oral Health Science, Department of Oral Health Promotion, Oral Science Course,  
Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine,  
(Chief Academic Adviser: Professor Nobuo Yoshinari)

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

## 要旨

現在、我が国は超高齢社会であり、高齢者の健康寿命をいかに延長できるか問題となっており、生物学的老化メカニズムの解明が最重要課題となっている。加齢は心臓血管疾患 (Cardiovascular Disease: CVD) に対する最も有力な危険因子であるが、その原因疾患である動脈硬化症と加齢を結びつけるメカニズムはまだ十分に解明されていない。また、加齢は歯周病の発症と進行においても関与することが報告されている。

本研究は、歯周病から動脈硬化症を悪化させる機序に細胞老化が関与していると仮定し、細胞老化を起こした状態で歯周病由来の炎症性刺激に曝露させることで、老化の関与を解明することを目的とした。

ヒト大動脈血管内皮細胞 (Human Aortic Endothelial Cells: HAECs) を継代培養することで細胞老化を誘導し、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 菌由来の LPS を添加して、老化関連疾患である歯周病と動脈硬化症の基盤病態に関与する因子の発現量を real-time PCR 法及び ELISA 法にて検討した。

その結果、IL-6, HGF, HMGB1, IL-8, CXCL5, MMP-2 の産生量が有意に増加した。一方、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, IL-17, MMP-3, MMP-9, MMP-12 の産生量に明らかな差は認められなかった。

以上の結果から、歯周病と動脈硬化症の基盤病態においては、老化を起こした細胞に歯周病由来の炎症性刺激が加わることによって放出される様々な SASP 因子が関与し、SASP によって引き起こされる生物学的老化が両疾患を悪化させる機序において重要な役割を果たす可能性が示唆された。本研究のさらなる発展は、老化関連疾患に対する新たな治療方法を確立できる可能性を秘めていると考えられる。

## 緒言

我が国では、超高齢社会という面からすべての分野において適応、改良、改善が求められている。歯科界にとっても高齢者が増加していることは、慢性全身疾患に罹患した歯科疾患罹患患者の増加を意味し、日常臨床においても安全に対応できるよう求められている。そこで、今後は従来の口腔領域における研究を発展させ、全身的な健康科学・生活科学を目指した研究を行っていく必要がある。

歯周病は、心臓血管疾患(Cardiovascular Disease: CVD)、糖尿病、誤嚥性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、肥満等の生活習慣病に代表される慢性全身疾患のリスク因子として疫学研究を中心に報告されており、これらの疾患との関連機序の解明に関する研究が進んでいる。さらに、それらの機序から疾病相関に基づく新たな治療法の創生が望まれる。

この中で、CVD は高血圧症、不整脈、大動脈瘤、虚血性心疾患、脳梗塞などの心臓血管系に影響を与える多くの疾患の総称で、日本では循環器系の疾患群に相当する。すなわち、死因第 2 位である心疾患と、第 4 位の脳血管疾患と合わせると死因第 1 位の悪性新生物に匹敵する死亡割合で、日本人の死因の面からも重要である。

CVD の本態は、動脈壁が肥厚することによる弾性の低下、あるいは硬化による動脈硬化症に起因しており、その発症は加齢と共に増加し、80 歳以上の高齢者では癌以上の罹患率を示している。このため、加齢によって起こる生物学的老化が動脈硬化症の進展に大きく寄与していると考えられている<sup>1)</sup>。一方、歯周病も種々の環境因子が病態を複雑化する生活習慣病としての側面をもち、その発症率も加齢に伴い増加していく<sup>2)</sup>。

現在まで、歯周病から動脈硬化症に影響する機序として、(1)歯周病原細菌、あるいは細菌産生物による血管内皮細胞に対する直接的障害作用<sup>3)</sup>、(2)細菌あるいは細菌産生物による IL-6, TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカイン刺激による血管内皮細胞に対する間接的障害作用<sup>3)</sup>、(3)LPS や IL-6, TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインの刺激により肝臓から産生される C 反応性タンパクや血清アミロイド A(SAA)タンパク等の急性期タンパクによる間接的障害作用<sup>3)</sup>の 3 つの経路が可能性として挙げられているが、共通のリスク因子である老化のことは考慮されてい

なかった。

そこで、本研究では両疾患のリスク因子である老化が、交絡因子となり両疾患の関連性に影響を及ぼしている可能性を検討するため、大動脈血管内皮細胞の継代培養実験を行い、老化細胞に歯周病由来の炎症性因子を暴露させ、その際に産生される老化随伴分泌表現型 (senescence-associated secretory phenotype: SASP) を測定し、老化の関与を検証することを目的とした。

## 材料及び方法

### 1. 細胞

細胞は、52歳ヒト大動脈血管内皮細胞(Human Aortic Endothelial Cells: HAECs) (Lot No: CC-2535, LONZA, NJ, USA)を購入し実験に供した。コンフルエントに達するまで培養した初代細胞, 3代継代細胞 (P3), 5代継代細胞 (P5), 8代継代細胞 (P8)を実験に供した。

### 2. SAA 刺激による接着分子および老化関連遺伝子の遺伝子発現量の測定

初代細胞の HAECs を専用の培地 (EGM-2 Bulletkit, CC-3162, LONZA, NJ, 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 10 日間の培養を行い, 50 万 cell/ml にて回収した細胞を 6well プレートに播種した。25 $\mu$ g/ml のヒト血清アミロイド蛋白 (human recombinant Serum Amyloid A: SAA) (300-13, PEPROTECH, NJ, USA)を培地に添加した実験群, 非添加の対照群に分けてそれぞれ培養し, コンフルエント確認後に細胞を Trizol<sup>®</sup>にて溶解し, 回収した細胞溶解液を NucleoSpin<sup>®</sup> RNA (740. 955. 250, タカラ, 滋賀, 日本)にて total RNA を抽出, PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix (RR036A, タカラ, 滋賀, 日本)にて逆転写を行い 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), cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16), cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21), Tumor Protein 53 (p53)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 ( $n = 6$ )。

特異的プライマー配列は, ICAM1: sense 5'- TGTATGAACTGAGCAATGTGCAAGA  
-3', antisense 5'- CACCTGGCAGCGTAGGGTAA -3', VCAM1: sense 5'-  
CGAAAGGCCAGTTGAAGGA -3', antisense 5'-  
GAGCACGAGAAGCTCAGGAGAAA -3', P16(CDKN2A): sense 5'-  
GGCACCAGAGGCAGTAACCA -3', antisense 5'-

CCTACGCATGCCTGCTTCTACA -3', P21(CDKN1A): sense 5'-  
 TCAAATCGTCCAGCGACCTTC -3', antisense 5'-  
 CATGCCCTGTCCATAGCCTCTAC -3', P53(TP53): sense 5'-  
 TCGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT -3', antisense 5'-  
 GTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTT -3', GAPDH(GAPDH): sense 5'-  
 GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3', antisense 5'- TGGTGAAGACGCCAGTGGA -  
 3' であった (図 1).

なお, real-time PCR 法は TBGreen® (RR820A, タカラ, 滋賀, 日本)によるインターカ  
 レーター法にて施行した. 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.

### 3. SAA 刺激による SASP 因子のタンパク質量の測定

P3HAECs に上記 2 の方法と同様に SAA を常時添加した群と非添加の群, および細胞回  
 収 3 時間前から SAA を添加した群の 3 群を作製し, 培養上清を回収した. 培養上清中の  
 SASP 因子のタンパク質量を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法にて定  
 量した. SASP 因子として Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 を測定した ( $n = 2$ ).

### 4. *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)由来リポ多糖刺激による SASP 因子のタンパク質量 の測定

歯周病原細菌の 1 つである *P.g.* の細胞膜に存在し, 病原性の高いリポ多糖  
 (lipopolysaccharide: LPS) (SMB00610, Sigma-Aldrich, STL, USA)が HAECs に対して  
 及ぼす影響を検討するため, 以前の報告<sup>4,6)</sup>を参考として P3HAECs をコンフルエントに達す  
 るまで培養し, *P.g.*由来 LPS (0.1 $\mu$ g/ml)を添加して, 3 時間後に培養上清を回収し SASP 因  
 子である IL-1 $\beta$  のタンパク質量を ELISA 法にて定量した( $n = 2$ ).

### 5. *P.g.*由来 LPS の濃度依存的な刺激による SASP 因子のタンパク質量の測定

濃度依存的な *P.g.*由来 LPS 刺激の SASP 因子のタンパク質量変化を検討するため、P3HAECs をコンフルエントに達するまで培養し、*P.g.*由来 LPS (0.01 $\mu$ g/ml, 0.1 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml)を添加して、3 時間後に濃度を変化させた各培養上清を回収し SASP 因子である IL-1 $\beta$  のタンパク質量を ELISA 法にて定量した( $n = 2$ ).

#### 6. *P.g.*由来 LPS の添加時間依存的な刺激による SASP 因子のタンパク質量の測定

添加時間依存的な *P.g.*由来 LPS 刺激の SASP 因子のタンパク質量変化を検討するため、P3HAECs をコンフルエントに達するまで培養し、*P.g.*由来 LPS (0.1 $\mu$ g/ml)を添加して、3, 6, 12, 24, 48 時間後に培養上清を回収し SASP 因子である IL-1 $\beta$  のタンパク質量を ELISA 法にて定量した( $n = 2$ ).

#### 7. HAECs の継代培養数が細胞の老化度合いに及ぼす影響の検討

HAECs の継代培養数による細胞の老化度合いを検討するため、P5 もしくは P8HAECs をコンフルエントに達するまで培養し、*P.g.*由来 LPS (0.1 $\mu$ g/ml)を添加して、3, 6, 12, 24, 48 時間後に培養上清を回収し SASP 因子である IL-6 のタンパク質量を ELISA 法にて定量した ( $n = 2$ ).

#### 8. HAECs の老化に対する LPS 刺激の影響

P5HAECs をコンフルエントに達するまで培養し、*P.g.*由来 LPS (0.1 $\mu$ g/ml) を添加して、3, 6, 12, 24, 48 時間後に培養上清を回収し SASP 因子のタンパク質量を ELISA 法にて定量した. SASP 因子として IL-1 $\beta$ , Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), IL-17, High Mobility Group Box-1 (HMGB1), IL-8, C-X-C Motif Chemokine Ligand 5 (CXCL5), Matrix Metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 を測定した (IL-1 $\beta$ , IL-8, CXCL5, MMP-2,  $n = 4$ ; TNF- $\alpha$ , HGF, VEGF, IL-17, HMGB1, MMP-3, MMP-9, MMP-12,  $n = 2$ ).

## 9. 統計処理

実験結果は、平均値  $\pm$  標準偏差で示した。統計処理には SPSS<sup>®</sup> for Windows (ver.16.0, 日本アイ・ビー・エム社, 東京, 日本)を使用し, 両群の平均値の差を Sstudent の  $t$  検定にて解析した.  $P < 0.05$  を有意差ありとした.



## 結果

### 1. SAA 刺激による接着分子および老化関連遺伝子の遺伝子発現量の測定

P3HAECs に対して SAA による炎症性刺激を加えることによって、老化関連遺伝子の発現量が変化するかを検討した結果、real-time PCR 法による遺伝子発現量において、接着分子である ICAM1 および VCAM1 の遺伝子発現量は有意に増加したが (図 2A)、老化関連遺伝子である p16, p21, p53 の発現量に有意な差は認められなかった (図 2B)。

### 2. SAA 刺激による SASP 因子 (IL-1 $\beta$ , IL-6)のタンパク質量測定

P3HAECs に対して SAA 刺激による老化関連遺伝子発現量の変化は認めなかったため、細胞外における SASP 因子のタンパク質量が変化するかを ELISA 法にて検討した結果、SAA 刺激により IL-6 のタンパク質量は有意に増加したが、IL-1 $\beta$  量に有意な差は認められなかった (図 2C)。

### 3. *P.g.*LPS 刺激による SASP 因子 (IL-1 $\beta$ )のタンパク質量測定

P3HAECs に対する SAA 刺激により細胞外における IL-1 $\beta$  のタンパク質量に有意な差を認めなかったため、*P.g.*由来の LPS 刺激により細胞外におけるタンパク質量が変化するかを検討した結果、LPS 刺激により IL-1 $\beta$  のタンパク質量は増加傾向を示したが、有意な差は認められなかった (図 3A)。

### 4. *P.g.*LPS 濃度変化による SASP 因子 (IL-1 $\beta$ )のタンパク質量測定

以前の報告<sup>3)</sup>をもとに検討した濃度、添加時間ではタンパク質量に有意な差を認めなかった。次に至適 LPS 濃度を検討するため、濃度 (0.1 $\mu$ g/ml)を 0.1 倍、10 倍に変化させ、IL-1 $\beta$  のタンパク質量を測定したが、変化は認められなかった (図 3B)。

### 5. *P.g.*LPS 添加時間による SASP 因子 (IL-1 $\beta$ )タンパク質量測定

*P.g.*LPS 濃度で変化が生じなかったため、LPS 曝露時間を変化して検討した。LPS 濃度は 0.1  $\mu\text{g/ml}$  に固定し、細胞回収前 3, 6, 12, 24, 48 時間に LPS を添加し、IL-18 のタンパク質量の変化を検討した。しかし、どの時間でも変化は認められなかった(図 3C)。

#### 6. HAECs 継代数による SASP 因子 (IL-6) のタンパク質量測定

継代培養による細胞老化を誘導でき、HAECs の SASP 発現量に変化するか検討した。HAECs の P5, P8 を作製し、曝露時間を変化させた LPS 刺激による IL-6 のタンパク質量測定を施行した。P5 および P8 ともに、LPS 曝露時間依存的にタンパク質量は有意に増加した(図 4)。しかし、P8 HAECs においては実験プロトコルに沿った培養ではコンフルエントになるまで細胞が増殖できず、培養液中に細胞が浮遊していることから老化による細胞死が生じている可能性が示唆された。そのため、コンフルエントが確認でき、かつ P8 と同様に SASP 因子である IL-6 タンパク質量の上昇を認めた P5HAECs においても継代培養による細胞老化が生じていると想定し、以下の実験においては P5 HAECs を使用して検討した。

#### 7. P5HAECs に対する LPS 刺激の影響

LPS 刺激により培養上清中の IL-6 のタンパク質量が増加したことより、継代培養による細胞老化が SASP の発現に影響するかを検討した。P5HAECs に対して曝露時間を変化させた LPS 刺激を行い、回収した培養上清における各種 SASP 因子の、サイトカイン (IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ , HGF, VEGF, IL-17, HMGB1), ケモカイン (IL-8, CXCL5), タンパク分解酵素 (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12)の産生量を測定した。その結果、LPS 刺激により IL-6, HGF, HMGB1, IL-8, CXCL5, MMP-2 の産生量は有意に増加した(図 5)。しかし、IL-18, TNF- $\alpha$ , VEGF, IL-17, MMP-3, MMP-9, MMP-12 の産生量に有意な差は認められなかった(図 5)。

## 考察

老化した細胞が老化関連疾患の病因であるという細胞老化仮説が報告されている<sup>7)</sup>。細胞老化とは、細胞分裂能の限界を意味し、形態、遺伝子発現、細胞機能の変化を伴う<sup>8)</sup>。慢性化した老化細胞は加齢に伴い細胞老化が蓄積しDNA損傷から、主にNF- $\kappa$ Bが活性化されることによりSASPを発現することが報告されている<sup>9-13)</sup>。SASPは組織修復にかかわる一方で、炎症反応を亢進させるという二面性をもち<sup>9)</sup>、分泌されたSASPは慢性炎症を誘導することが報告されている<sup>14)</sup>。

アテローム性動脈硬化症は、大動脈に脂質と線維性要素が蓄積することを特徴とする進行性の慢性炎症性疾患である。血管内皮に蓄積した単球はマクロファージに分化し、リポタンパク質を取り込んで泡沫細胞を形成する。泡沫細胞は時間の経過とともに粥状物質（アテロームプラーク）となり、血栓を形成して心筋梗塞や脳卒中の原因となる<sup>15)</sup>。アテローム性動脈硬化症は内皮機能障害による炎症性疾患であり、人間の老化に伴う内皮機能の低下によっても発症し、SASPが関与することが報告されている<sup>16)</sup>。

また、歯周病は、デンタルプラーク（バイオフィルム）の蓄積と宿主の炎症、免疫応答により発症、進行する局所の慢性炎症性疾患であり、歯根膜や歯槽骨を含む歯周組織の進行性の破壊を特徴とする<sup>17)</sup>。歯周病原細菌の中で、レッドコンプレックスと呼ばれる特定のグラム陰性嫌気性菌（*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*）による歯肉縁下バイオフィルムの感染は、慢性炎症を引き起こす<sup>18,19)</sup>。多くの歯周病原菌がもつLPSは、宿主のマクロファージやその他の炎症細胞を刺激し、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを誘導する。また、これらの炎症性サイトカインはマクロファージ、線維芽細胞、接合上皮細胞、好中球からのMMPの産生を促し、歯周組織のコラーゲン線維の破壊につながる<sup>20,21)</sup>。さらに、骨芽細胞上にあるReceptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)を活性化し、破骨細胞前駆細胞上にあるReceptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK)との相互作用により破骨細胞の成熟をもたらし、歯槽骨が吸収する<sup>22,23)</sup>。

動脈硬化症に対する老化の影響は、(1)血管のリモデリングによる弾性の低下、(2)血管平滑

筋細胞の減少による血管拡張, (3)加齢に伴う糖タンパク質等の増加による栄養刺激など様々な要因があるという報告がされている<sup>24)</sup>.

また, 歯周組織に対する老化の影響は, (1)骨芽細胞および破骨細胞の分化および増殖の変化と関連している可能性, (2)口腔微生物叢に対する歯周組織の細胞応答の増加と骨吸収に関与する SASP の分泌をもたらす機械的ストレス, (3)高齢者における全身性内分泌変化によるものであるという報告がある<sup>25)</sup>.

しかし, 動脈硬化症および歯周病の共通かつ独立した危険因子である老化が, 両疾患の関連性に対する交絡因子となっていることは明白ではあるが, その関与機序は未だ解明されていない.

本研究では, HAECs を継代培養することにより細胞老化を惹起させ, そこに歯周病原菌由来の LPS 刺激が加わると, HAECs から数種の SASP 因子の発現が誘導されることが示された (図 4-5).

歯周局所で産生される IL-6 は, 炎症性サイトカインとして肝臓を刺激し, 血中の血清アミロイド A(SAA)濃度を上昇させる. 本研究では HAECs に SAA 刺激を行ったところ接着分子の遺伝子発現および IL-6 のタンパク質量は有意に増加したが, 老化関連遺伝子の発現量に有意な差は認めなかった (図 2A-C). この結果は, 以前に報告されているように歯周病由来の IL-6 により SAA の産生が誘導され, 動脈硬化症を悪化させるメカニズムを支持するが<sup>26)</sup>, SAA 単独刺激のみでは細胞を老化させるに至るまでの影響を及ぼさないことが示唆された.

また, IL-6 はこれまでに HAECs を LPS で刺激することにより産生が増加することや, ICAM1 の発現を促進することが報告されている<sup>27)</sup>. さらに, 慢性の炎症刺激により血管内膜の脂肪細胞が加齢変化を起こした場合, 中大脳動脈で IL-6 の産生量が増加すると報告され<sup>28)</sup>, LPS 刺激した老齢マウスでは肝臓で炎症が増大するが, IL-6 ノックアウトマウスでは炎症は減少したという報告がある<sup>29)</sup>. よって老化細胞において炎症性刺激により IL-6 は産生されると思われる. 本研究では細胞老化を誘発した P5HAECs に対する LPS 刺激により IL-6 のタンパク質量が有意に増加しており, これまでの報告とほぼ一致していると考えられる.

IL-1β は, 老化線維芽細胞において増加するという報告<sup>30)</sup>や, HAECs を *P.g.*の線毛で刺

激することにより、発現量が増加することが報告されている<sup>31)</sup>。そこで、老化 HAECs においても炎症刺激により IL-18 産生量が増加する可能性が考えられるが、本研究において P5HAECs を LPS で刺激しても IL-18 産生量が増加しなかった。これは細胞種および刺激因子が異なるためではないかと推察する。

TNF- $\alpha$  は、HAECs に対する LPS 刺激による応答に関する報告はないが、アテローム性動脈硬化症の動脈壁にて発現することが報告されている<sup>32)</sup>。また、老化させたアジュバント関節炎誘発モデルマウスに LPS 刺激を加えると通常のマウスと比較して、著明に TNF- $\alpha$  産生量が減少するという報告がある<sup>33)</sup>。本研究において TNF- $\alpha$  のタンパク質量が増加しなかったのは、細胞種によるものではないかと推察する。

HGF は血管新生に重要な役割を示す炎症性サイトカインであり<sup>34)</sup>、動脈硬化症の悪化に対するリスク因子である<sup>35)</sup>。また、肝細胞老化に伴い産生量が増加するという報告がある<sup>36)</sup>。本研究において HGF のタンパク質量は増加しており、LPS 刺激により細胞老化を起こした P5HAECs から産生され、動脈硬化症の悪化に関与していることが考えられる。

VEGF は血管新生作用を有する成長因子であり<sup>37)</sup>、TNF- $\alpha$  によって誘導されることが知られている<sup>38)</sup>。また、VEGF は間葉系幹細胞をヘイフリック限界(細胞分裂の限界)まで培養すると発現量が減少するという報告がある<sup>39)</sup>。本研究において、HAECs を LPS 刺激しても VEGF の産生量は増加しなかった。今回の実験では TNF- $\alpha$  の産生量も変化しなかったため、VEGF の産生には細胞老化および TNF- $\alpha$  が関与したのではないかと考えられる。

IL-17 は TH17 細胞により産生されるサイトカインであり、その過剰産生は歯周炎や関節リウマチなどの免疫介在性炎症性疾患に関連していることが知られている<sup>40,41)</sup>。また、IL-17 は老齢マウスの関節で発現し、細胞老化による炎症の増強に関与しているという報告がある<sup>42)</sup>。本研究において、HAECs を LPS 刺激しても IL-17 の産生量は増加しなかった。IL-17 は IL-18, TNF- $\alpha$  が TH17 細胞に作用することで産生が促進することが報告されており<sup>43)</sup>、今回の実験では IL-18, TNF- $\alpha$  ともに変化しなかったことから、誘導タンパクの欠如により変化しなかったと考えられる。

HMGB1 は内皮透過性を亢進させることによりアテローム性動脈硬化症を進行させる炎症

性サイトカインである<sup>44)</sup>。また、老化細胞は DNA 損傷に応じて NF- $\kappa$ B シグナル伝達が誘発される結果、HMGB1 を発現し、炎症を増強するという報告がある<sup>45)</sup>。本研究において HMGB1 の産生量が有意に増加したことから、HMGB1 は炎症性刺激によって P5HAECs から産生され、動脈硬化症の悪化に関与すると考えられる。

IL-8 は血管新生に関与するケモカインであり、動脈硬化症のリスク因子の 1 つである<sup>46)</sup>。IL-8 は炎症および感染部位で産生され、高齢者で過剰に増加するという報告がある<sup>47)</sup>。また、HAECs を LPS で刺激すると産生が増加することが報告されている<sup>48)</sup>。本研究においても IL-8 のタンパク質量は有意に増加したことから、IL-8 は炎症性刺激によって P5HAECs から産生され、動脈硬化症の悪化に関与すると考えられる。

CXCL5 は NF- $\kappa$ B シグナル経路を活性化することにより炎症を増強する因子であり<sup>49)</sup>、冠状動脈のプラーク中に多く発現することが報告されている<sup>50)</sup>。また、ヒト胚盤胞において若年者 (25-37 歳) と比較し高齢者 (38-45 歳) において約 8 倍産生され、同時に検討された老齢マウス (43-53 週齢) の胚盤胞においても若齢 (3-6 週齢) マウスと比較し 3 倍発現が上昇したという報告がある<sup>51)</sup>。本研究において CXCL5 の産生量が有意に増加したことから、CXCL5 は LPS 刺激により P5HAECs で産生され、動脈硬化症の悪化に関与すると考えられる。

MMP-2 は血管新生作用に関わるプロテアーゼであり<sup>52)</sup>、アテローム性動脈硬化症において病変部位のプラーク中に多く発現することが報告されている<sup>53)</sup>。また、老化により上行大動脈において増加することが報告されている<sup>54)</sup>。本研究においても MMP-2 のタンパク質量は有意に増加したことから、MMP-2 は LPS 刺激により P5HAECs で産生され、動脈硬化症の悪化に関与していると考えられる。

MMP-3, MMP-9 も血管新生作用に関わるプロテアーゼである<sup>55)</sup>。両者とも、LPS 刺激によりヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC) で発現が増加することが報告されている<sup>55)</sup>。MMP-3 は老化した線維芽細胞様滑膜細胞において発現するという報告があり<sup>56)</sup>、MMP-9 は老化した骨髄由来間葉系幹細胞において JAK/STAT 経路の活性化により約 6 倍発現上昇するという報告がある<sup>57)</sup>。本研究においては LPS 刺激により P5HAECs で MMP-3, MMP-9 のタンパク質量は増加しなかった。これも実験に供し

た細胞種の違いが影響していると推察される。

MMP-12も血管新生作用に関わるプロテアーゼであり、アテローム性動脈硬化症において発現が増加すること<sup>58)</sup>や、老齢マウスの脳ミクログリアにおいて炎症性因子として発現し、アルツハイマー病などに代表される老化関連神経炎症を増強するという SASP 因子である<sup>59)</sup>。しかし、LPS 刺激により P5HAECs で、MMP-12 のタンパク質量は増加しなかった。その理由としてはこれも実験に供した細胞種の違いが影響していると推察される。

以上、本研究では炎症性サイトカインである IL-6, HGF, HMGB1, ケモカインである IL-8, CXCL5, タンパク質分解酵素である MMP-2 のタンパク質量が増加したが、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , VEGF, IL-17, MMP-3, MMP-9, MMP-12 のタンパク質量に有意な差は認められなかった。今後、歯周病からの炎症性刺激に特有のアテローム性動脈硬化症の老化変化を詳細に検討する必要がある。

## 結論

本研究より、継代培養による細胞老化を誘導した HAECs に対して、歯周病原菌 *P.g.*由来の LPS による炎症性刺激を加えることにより、動脈硬化症の悪化に関与する数種 SASP 因子のタンパク質量が有意に増加することが示唆された。以上の結果より、動脈硬化症の老化関連悪化機序において、歯周病由来の炎症性因子による刺激が関与することが示された。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました主指導教員である松本歯科大学大学院歯学独立研究科健康増進口腔科学講座の吉成伸夫教授に謹んで感謝の意を表します。また、本稿の遂行に際し、終始ご懇切なるご指導を賜りました大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座 田口明教授、大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座 宇田川信之教授に心より御礼申し上げます。また本研究においてご指導、ご助言を賜りました松本歯科大学歯科保存学講座 尾崎友輝助教に厚く御礼申し上げます。さらに、ご支援ご協力を賜りました松本歯科大学歯科保存学講座の皆様には感謝申し上げます。

最後に、この研究の遂行にあたり絶えず励まし支えてくれました、妻(愛)、父(直樹)、母(京子)、妹(美智代)に心から感謝致します。



## 文献

- 1) Gando Y, Murakami H, Yamamoto K, Kawakami R, Ohno H, Sawada S, Miyatake N, Miyachi M (2017) Greater Progression of Age-Related Aortic Stiffening in Adults with Poor Trunk Flexibility: A 5-Year Longitudinal Study. *Front Physiol.* 30; 8: 454.
- 2) Ar'eva G, Ar'ev A (2014) Aging and periodontal diseases (review). *Adv Gerontol.* 27(4): 771-5.
- 3) Priyamvara A, Dey A, Bandyopadhyay D, Katikineni V, Zaghlol R, Basyal B, Barssoum K, Amarin R, Bhatt D, Lavie C (2020) Periodontal Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. *Curr Atheroscler Rep.* 8; 22(7): 28
- 4) Li C, Zhang W, Frei B (2016) Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction. *Redox Biol.* 9: 104-113.
- 5) Lu Z, Zhang X, Li Y, Jin J, Huang Y (2013) TLR4 antagonist reduces early-stage atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *J Endocrinol.* 2; 216(1): 61-71.
- 6) Lin B, Wang J, Cheng L, Liang J (2013) Role of JNK and NF- $\kappa$ B pathways in *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells. *Mol Med Rep.* 8(5): 1594-600.
- 7) Moriya J, Minamino T, Tateno K, Shimizu N, Kuwabara Y, Sato Y, Saitou Y, Komuro I (2009) Long-term outcome of therapeutic neovascularization using peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. *Circ Cardiovasc Interv.* 2(3): 245-54.
- 8) Minamino T, Komuro I (2007) Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res.* 5; 100(1): 15-26.

- 9) Rodier F, Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 21; 192(4): 547-56.
- 10) Coppé J, Desprez P, Krtolica A, Campisi J (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 5; 99-118.
- 11) Freund A, Orjalo A, Desprez P, Campisi J (2010) Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 16(5): 238-46.
- 12) Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF- $\kappa$ B signaling. *Cell.* 8; 132(3): 344-362.
- 13) Birch J, Gil J (2020) Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev.* 1; 34(23-24): 1565-1576.
- 14) Yoshimoto S, Loo T, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honada K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N (2013) Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* 4; 499(7456): 97-101.
- 15) Lusis A (2000) Atherosclerosis. *Nature.* 14; 407(6801): 233-41.
- 16) Herrera M, Mingorance C, Rodríguez R, Sotomayor M (2010) Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev.* 9(2): 142-52.
- 17) Kwon T, Lamster I, Levin L (2021) Current concepts in the management of periodontitis. *Int Dent J.* 71: 462-76.
- 18) Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent Jr R (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 25(2): 134-44.
- 19) Socransky S, Haffajee A (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 38: 135-87.
- 20) Page R, Offenbacher S, Schroeder H, Seymour G, Kornman K (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000.* 14: 216-48.

- 21) Hansen B (1993) Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 64(5 Suppl): 474-84.
- 22) Taubman M, Kawai T (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 12(2): 125-35.
- 23) Taubman M, Valverde P, Han X, Kawai T (2005) Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol.* 76(11 Suppl): 2033-41.
- 24) Wang J, Bennett M (2012) Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res.* 6; 111(2): 245-59.
- 25) Hunttner E, Machado D, Oliveira R, Antunes A, Hedling E (2009) Effects of human aging on periodontal tissues. *Spec Care Dentist.* 29(4):149-55.
- 26) 高橋弘太朗 (2015) 実験的歯周炎の動脈硬化への影響. *松本歯学.* 41(2): 148-149.
- 27) Ohta M, Kihara T, Toriuchi K, Aoki H, Iwaki S, Kakita H, Yamada Y, Aoyama M (2020) IL-6 promotes cell adhesion in human endothelial cells via microRNA-126-3p suppression. *Exp Cell Res.* 15; 392(2): 112094.
- 28) Blasco M, Chauhan A, Honarpisheh P, Ahnstedt H, Aigle J, Ganesan A, Ayyaswamy S, Blixt F, Venable S, Major A, Durgan D, Haag A, Kofler J, Bryan R, McCullough L, Ganesh B (2020) Age-dependent involvement of gut mast cells and histamine in post-stroke inflammation. *J Neuroinflammation.* 19; 17(1): 160.
- 29) Gomez C, Nomellini V, Baila H, Oshima K, Kovacs E (2009) Comparison of the effects of aging and IL-6 on the hepatic inflammatory response in two models of systemic injury: scald injury versus i.p. LPS administration. *Shock.* 31(2): 178-84.
- 30) Coppé J, Patil C, Rodier F, Sun Y, Muñoz D, Goldstein J, Nelson P, Desprez P, Campisi J (2008) Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS*

Biol. 2; 6(12): 2853-68.

31) Takahashi Y, Davey M, Yumoto H, Gibson III F, Genco C (2006) Fimbria-dependent activation of pro-inflammatory molecules in *Porphyromonas gingivalis* infected human aortic endothelial cells. *Cell Microbiol.* 8(5): 738-57.

32) Rus H, Vlaicu F (1991) Tumor necrosis factor-alpha in human arterial wall with atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 89(2-3): 247-54.

33) Dimitrijević M, Stanojević S, Vujić V, Aleksić I, Pilipović I, Leposavić G (2014) Aging oppositely affects TNF- $\alpha$  and IL-10 production by macrophages from different rat strains. *Biogerontology.* 12(5): 475-86.

34) Gahda E (2002) [Function and regulation of production of hepatocyte growth factor (HGF)]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 119(5): 287-94

35) Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Aoki M, Matsushita H, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Higaki J, Ogihara T (1998) Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb.* 4(3): 128-34.

36) Hunt N, Kang S, Lockwood G, Counteur D, Cogger V (2019) Hallmarks of Aging in the Liver. *Comput Struct Biotechnol J.* 7; 17: 1151-1161.

37) Moens S, Goveia J, Stapor P, Cantelmo A, Carmeliet P (2014) The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25(4): 473-82.

38) Wang H, Han X, Wittchen E, Hartnett M (2016) TNF- $\alpha$  mediates choroidal neovascularization by upregulating VEGF expression in RPE through ROS-dependent  $\beta$ -catenin activation. *Mol Vis.* 3; 22: 116-28.

39) Ratushnyy A, Ezdakova M, Buravkova L (2020) Secretome of Senescent Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Negatively Regulates Angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 5; 21(5): 1802.

- 40) Zenobia C, Hajishengallis G (2015) Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol* 2000. 69(1): 142-59.
- 41) Awang R, Lappin D, MacPherson A, Riggio M, Robertson D, Hodge P, Ramage G, Culshaw S, Preshaw P, Taylor J, Nile C (2014) Clinical associations between IL-17 family cytokines and periodontitis and potential differential roles for IL-17A and IL-17E in periodontal immunity. *Inflamm Res*. 63(12): 1001-12.
- 42) Faust H, Zhang H, Ham J, Wolf M, Jeon O, Sadtler K, Peña A, Chung L, Maestas Jr D, Tam A, Pardoll D, Campisi J, Housseau F, Zhou D, Bingham 3ed C, Elisseeff J (2020) IL-17 and immunologically induced senescence regulate response to injury in osteoarthritis. *J Clin Invest*. 1; 130(10): 5493-5507.
- 43) Kübra B, Thomas B (2019) Th17 Cells and the IL-23/IL-17 Axis in the Pathogenesis of Periodontitis and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 10; 20(14): 3394.
- 44) Zou M, Dong H, Meng X, Cai C, Li C, Cai S (2015) Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry Plays a Role in HMGB1-Induced Vascular Endothelial Cell Hyperpermeability. *PLoS One*. 17; 10(4): e0123432.
- 45) Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K (2012) Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal*. 24(4): 835-45.
- 46) Waugh D, Wilson C (2018) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 1; 14: 6735-4.
- 47) Clark J, Peterson T (1994) Cytokine production and aging: overproduction of IL-8 in elderly males in response to lipopolysaccharide. *Mech Ageing Dev*. 16; 77(2): 127-39.
- 48) Walton K, Gugin B, Thomas M, Basseri R, Eliav D, Salomon R, Berliner J (2006) A role for neutral sphingomyelinase activation in the inhibition of LPS action by

phospholipid oxidation products. *J Lipid Res.* 47(9): 1967-74.

49) Chen C, Xu Z, Zong Y, Ou B, Shen X, Feng H, Zheng M, Zhao J, Lu A (2019) CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF- $\kappa$ B pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 21; 10(3): 178.

50) Wang X, Liu L, Du X, Gu R, Sun Z (2015) CXCL5 is associated with the increased risk of coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 26(7): 612-9.

51) Kawagoe Y, Kawashima I, Sato Y, Okamoto N, Matsubara K, Kawamura K (2020) CXCL5-CXCR2 signaling is a senescence-associated secretory phenotype in preimplantation embryos. *Aging Cell.* 19(10): e13240.

52) Alcantara M, Dass C (2013) Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by the serpin PEDF: a promising new target for metastatic cancer. *Cell Physiol Biochem.* 31(4-5): 487-94.

53) Kuzuya M, Nakamura K, Sasaki T, Cheng X, Itohara S, Iguchi A (2006) Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(5): 1120-5.

54) McNulty M, Spiers P, McGovern E, Feely J (2005) Aging is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity in the human aorta. *Am J Hypertens.* 18(4): 504-9.

55) Zhang M, Xue Y, Chen H, Meng L, Chen B, Gong H, Zhao Y, Qi R (2019) Resveratrol Inhibits MMP3 and MMP9 Expression and Secretion by Suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B/STAT3 Activation in Ox-LDL-Treated HUVECs. *Oxid Med cell Longev.* 10; 2019: 9013169.

56) Zhang Y, Zhou S, Cai W, Han G, Li J, Chen M, Li H (2020) Hypoxia/reoxygenation activates the JNK pathway and accelerates synovial senescence. *Mol Med Rep.* 22(1): 265-276.

- 57) Bai J, Wang Y, Wang J, Zhai J, He F, Zhu G (2020) Irradiation-induced senescence of bone marrow mesenchymal stem cells aggravates osteogenic differentiation dysfunction via paracrine signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1; 318(5): C1005-C1017.
- 58) Scholtes V, Johnson J, Jenkins N, Newby G, Vries J, Borst G, Kleijn D, Moll F, Pasterkamp G, Nerby A (2012) Carotid atherosclerotic plaque matrix metalloproteinase-12-positive macrophage subpopulation predicts adverse outcome after endarterectomy. *J Am Heart Assoc.* 1(6): e001040.
- 59) Liu Y, Zhang M, Hao W, Mihaljevic I, Liu X Xie K, Walter S, Fassbender K (2013) Matrix metalloproteinase-12 contributes to neuroinflammation in the aged brain. *Neurobiol Aging.* 34(4): 1231-9.

☒ 1.

ICAM1: sense 5'- TGTATGAACTGAGCAATGTGCAAGA -3',  
antisense 5'- CACCTGGCAGCGTAGGGTAA -3',

VCAM1: sense 5'- CGAAAGGCCAGTTGAAGGA -3',  
antisense 5'- GAGCACGAGAAGCTCAGGAGAAA -3',

P16(CDKN2A): sense 5'- GGCACCAGAGGCAGTAACCA -3',  
antisense 5'- CCTACGCATGCCTGCTTCTACA -3',

P21(CDKN1A): sense 5'- TCAAATCGTCCAGCGACCTTC -3',  
antisense 5'- CATGCCCTGTCCATAGCCTCTAC -3',

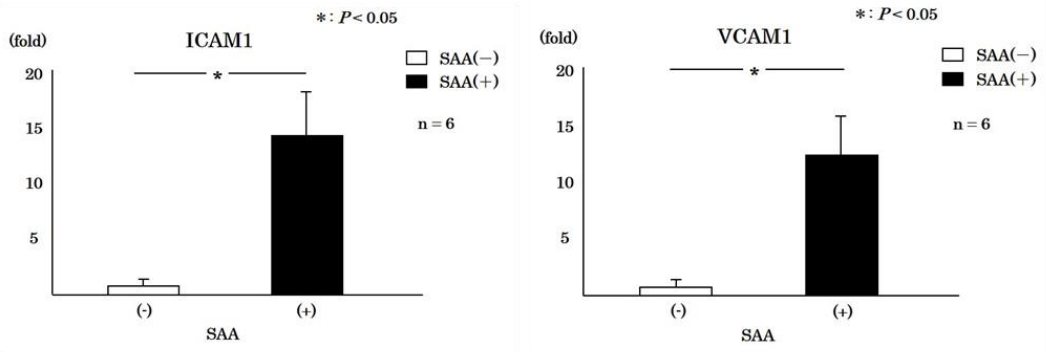
P53(TP53): sense 5'- TCGAGATGTTCCGAGAGCTGAAT -3',  
antisense 5'- GTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTT -3',

GAPDH(GAPDH): sense 5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3',  
antisense 5'- TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3',

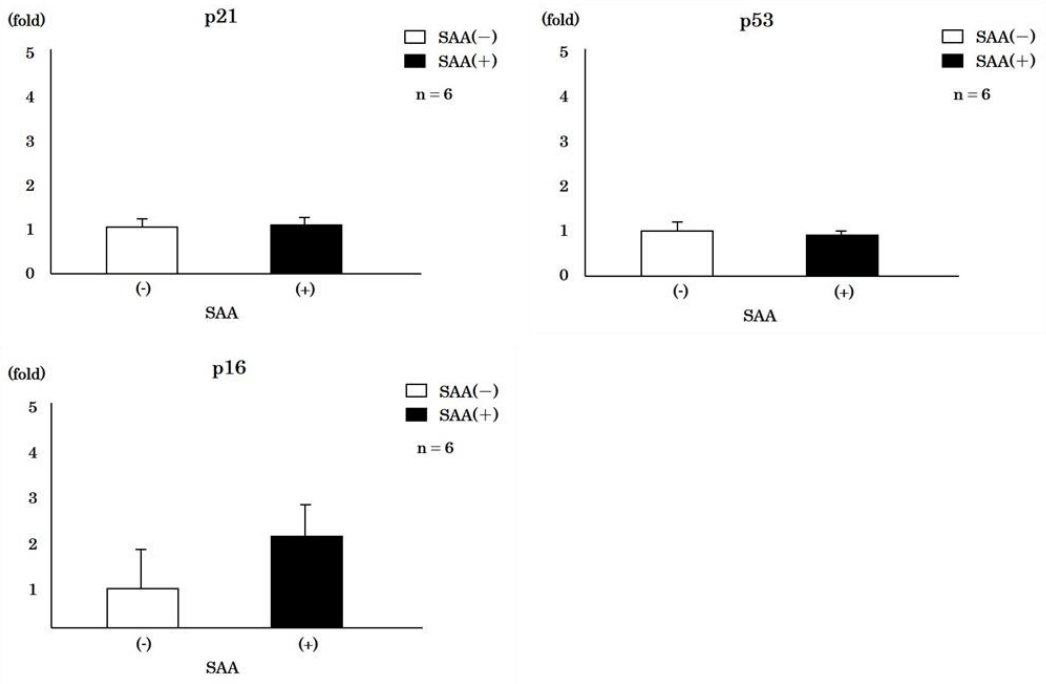


図 2.

A



B



C

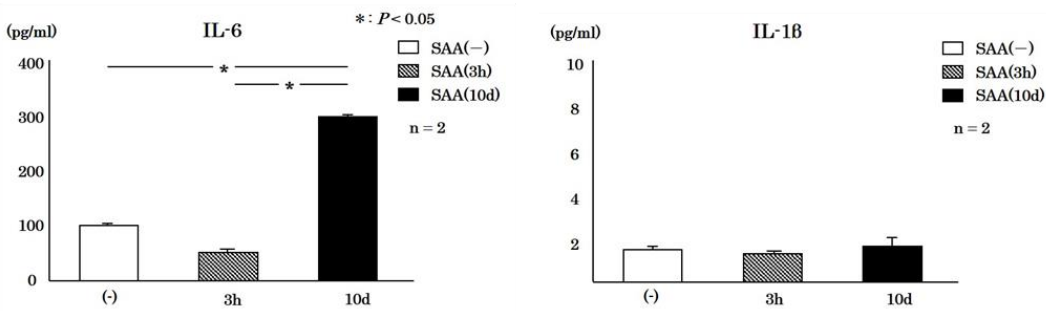
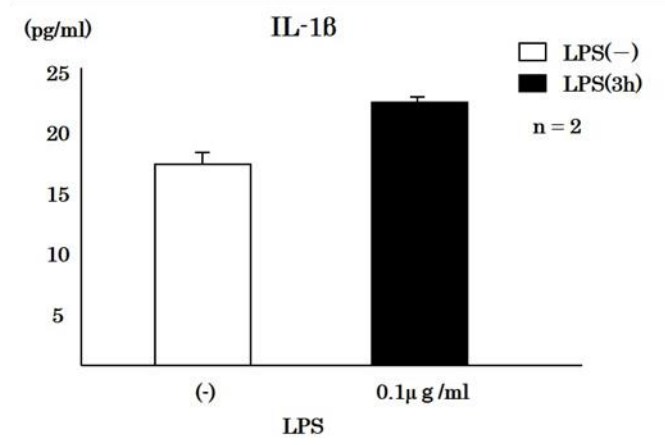
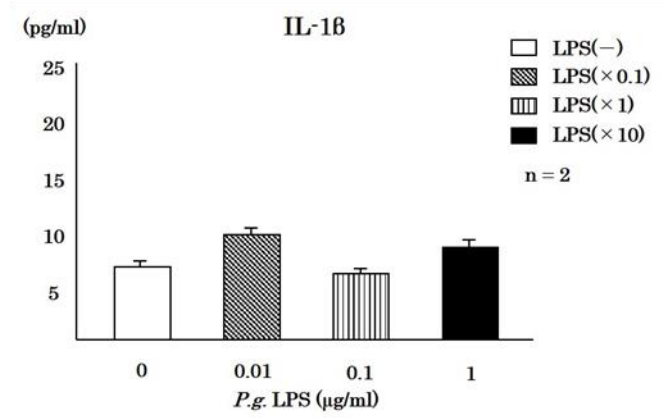


図 3.

A



B



C

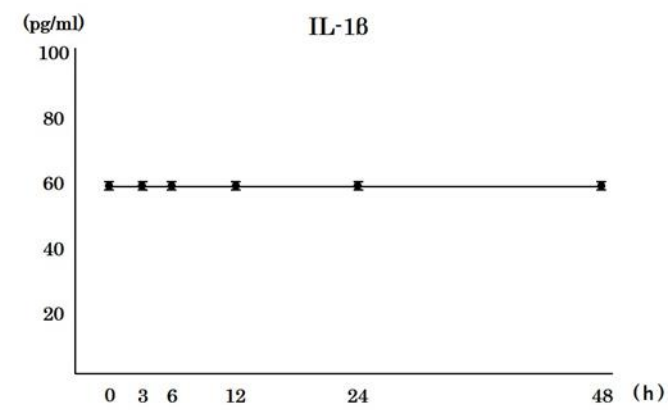


図 4.

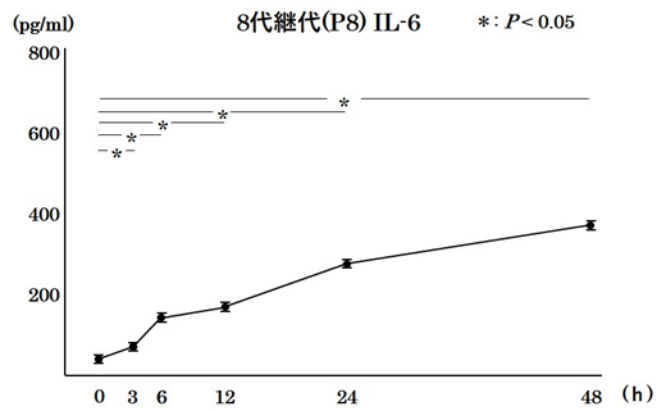
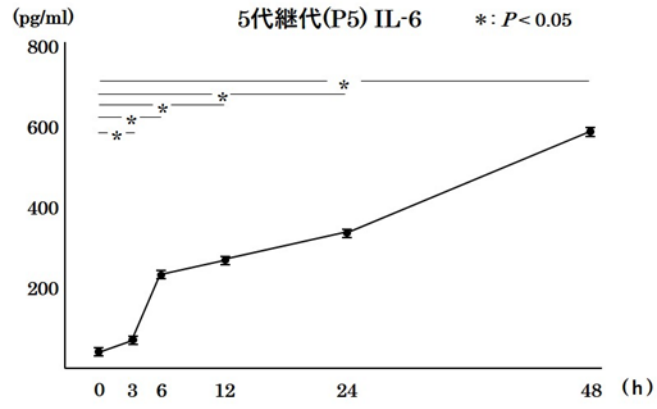
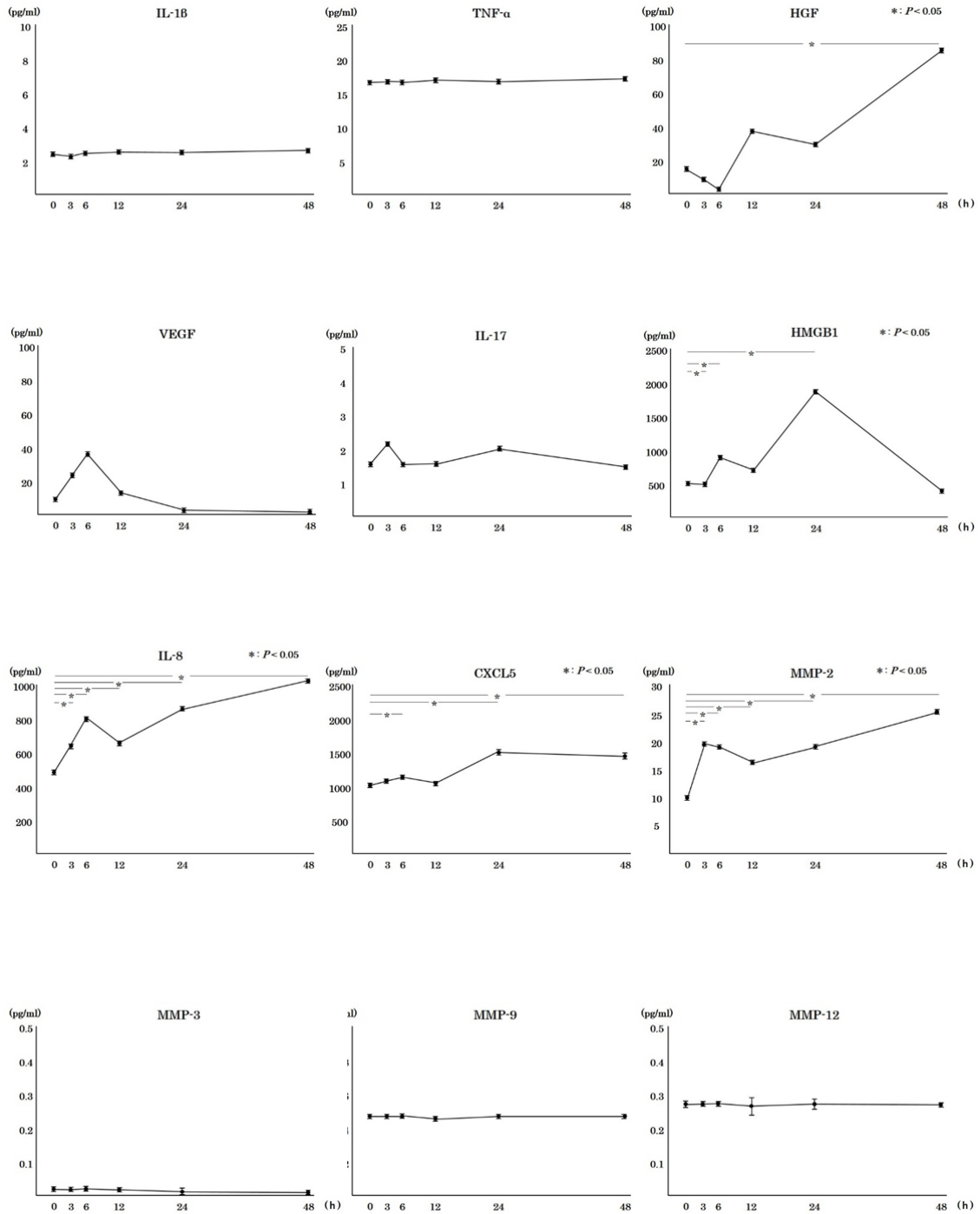


図 5.



## 図表の説明

図 1. 使用したプライマーの塩基配列

図 2. SAA 刺激による P3HAECs の遺伝子およびタンパク質量の変化

- (A) P3HAECs を SAA (25 $\mu$ g/ml) 添加培地, または SAA を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した細胞から cDNA を精製し, real-time PCR 法により接着分子の遺伝子発現量を定量した ( $n = 1$ ).
- (B) P3HAECs を SAA(25 $\mu$ g/ml) 添加培地, または SAA を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した細胞から cDNA を精製し, real-time PCR 法により老化関連遺伝子の遺伝子発現量を定量した ( $n = 1$ ).
- (C) P3HAECs を SAA (25 $\mu$ g/ml) 添加培地, または回収の 3 時間前から SAA (25 $\mu$ g/ml) を添加した培地, または SAA を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した培養上清中の IL-6, IL-18 のタンパク質量を ELISA 法にて定量した( $n = 2$ , \* $P < 0.05$ ).

図 3. LPS 刺激による HAECs のタンパク質量の変化

- (A) P3HAECs を回収の 3 時間前から LPS (0.1 $\mu$ g/ml) を添加した培地, または LPS を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した培養上清中の IL-18 のタンパク質量を ELISA 法にて定量した ( $n = 2$ ).
- (B) P3HAECs を回収の 3 時間前から LPS (0.01, 0.1, 1 $\mu$ g/ml) を添加した培地, または LPS を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した培養上清中の IL-18 のタンパク質量を ELISA 法にて定量した ( $n = 2$ ).
- (C) P3HAECs を回収の 3, 6, 12, 24, 48 時間前から LPS (0.1 $\mu$ g/ml) を添加した培地, または LPS を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した培養上清中の IL-18 のタンパク質量を ELISA 法にて定量した ( $n = 2$ ).

図 4. 細胞老化による LPS 刺激 HAECs のタンパク質量の変化

P5 もしくは P8HAECs を回収の 3, 6, 12, 24, 48 時間前から LPS (0.1 $\mu$ g/ml) を添加した培地, または LPS を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した培養上清中の IL-6 のタンパク質量を ELISA 法にて定量した ( $n = 2$ ,  $*P < 0.05$ ).

図 5. 細胞老化による LPS 刺激 P5HAECs の各種 SASP 因子タンパク質量の変化

P5HAECs を回収の 3, 6, 12, 24, 48 時間前から LPS (0.1 $\mu$ g/ml) を添加した培地, または LPS を添加していない培地でコンフルエントになるまで培養し, 回収した培養上清中の各 SASP 因子のタンパク質量を ELISA 法にて定量した (IL-1 $\beta$ , IL-8, CXCL5, MMP-2,  $n = 4$ ; TNF- $\alpha$ , HGF, VEGF, IL-17, HMGB1, MMP-3, MMP-9, MMP-12,  $n = 2$ ,  $*P < 0.05$ ).

## 本文中の略語

CVD: Cardiovascular Disease

SASP: senescence-associated secretory phenotype

HAECs: Human Aortic Endothelial Cells

SAA: human recombinant Serum Amyloid A

ICAM1: Intercellular Adhesion Molecule 1

VCAM1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

p16: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

p21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1

p53: Tumor Protein 53

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IL: Interleukin

LPS: lipopolysaccharide

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

HGF: Hepatocyte Growth Factor

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

HMGB1: High Mobility Group Box-1

CXCL5: C-X-C Motif Chemokine Ligand 5

MMP: Matrix Metalloproteinase

RANKL: Receptor Activator of NF- $\kappa$  B Ligand

RANK: Receptor Activator of NF- $\kappa$  B

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells