

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

老化に伴う口腔粘膜バリア破綻を基軸とした  
歯周病病因論の新展開とその制御法の探索（29－25）

主任研究者 松下 健二 国立長寿医療研究センター 部長

研究要旨

歯周病は最終的に歯の脱落を来す疾患であり、高齢者の QOL の低下とともに低栄養の要因であるため、フレイルに影響を及ぼす重要な要素となりえる。また近年、我が国では高齢者の歯周病罹患率は増加傾向にあるため、その対策は重要な施策の一つとなっている。本研究では、歯周組織の加齢変化、細菌感染、糖尿病、高脂血症等による口腔粘膜バリアの変化が歯周病病態に及ぼす影響について検討した。その結果、高齢マウスでは若齢マウスと比較して、Claudin-2 および Claudin-10 といった口腔粘膜バリアを構築する分子の発現が低下していた。また、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の感染により、歯肉上皮細胞培養系において Claudin の発現低下がみられた。さらに、口腔上皮細胞が発現する IL-29 受容体が口腔内へのウイルス感染を制御する可能性が示唆された。これらの粘膜バリア機能に関連する分子の発現低下は、歯周病を始めとする高齢者の口腔粘膜疾患の発症や進行を亢進する可能性がある。加えて、これらの分子の発現等を増強することにより、高齢者の口腔粘膜疾患の発症が抑制できると考えられる。

主任研究者

松下 健二 国立長寿医療研究センター 部長

分担研究者

四釜 洋介 国立長寿医療研究センター 室長

多田 浩之 東北大学 講師

古市 保志 北海道医療大学 教授

A. 研究目的

歯周病は最終的に歯の脱落を来す疾患であり、高齢者の QOL の低下とともに低栄養の要因であるため、フレイルに影響を及ぼす重要な要素となりえる。また近年、我が国では高齢者の歯周病罹患率は増加傾向にあるため、その対策は重要な施策の一つとなっている

(第二次健康日本 21 および口腔保険推進に関する法律等)。申請者はこれまで、細菌学的アプローチおよび老齢マウスによる解析結果から、老化に伴う口腔粘膜や自然免疫系の変化が歯周病の発症要因となり得ることを明らかにしてきた。本研究では、これまでの研究成果を踏まえ、歯周組織の加齢変化、細菌感染、糖尿病、高脂血症等による口腔粘膜バリアの変化が歯周病病態に及ぼす影響を明らかにするとともに、口腔粘膜バリアの保持・修復を基盤とした、新しい歯周病予防・治療薬の開発を目指す。具体的には、①口腔粘膜バリア破綻による歯周病発症機序について、細菌学的、免疫学的観点および全身疾患（糖尿病および高脂血症等）との関連から解析する (in vitro, in vivo)。合わせて、②口腔バリアの修復に効果のある新規歯周病治療薬の探索を行う。

## B. 研究方法

### 1. 高齢マウスにおける粘膜バリア関連分子の発現動態

老齢マウス (20 月齢) と若齢マウス (6 週齢) の歯肉の total RNA を採取し、microarray 法にて解析を行った。また、同歯肉サンプルの組織切片を作成した後、各種接着因子関連タンパク質 (Claudin, Filaggrin, E-cadherin, Occludin) の抗体を用いて、免疫染色を行なった。

### 2. 歯周病原細菌による IL-31 発現誘導と粘膜バリア機能への影響

慢性歯周炎の主要な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の感染による肥満細胞からのインターロイキン-31 (IL-31) 産生機構について検討を行なった。具体的には、歯周病原性細菌: *P. gingivalis* W83 株、ATCC33277 株ならびにジンジパイン欠損株を tryptic soy 培地にて嫌気培養後、ヒト歯肉上皮細胞株 HMC-1 細胞に添加した。その後、細胞および上清中の IL-31 発現レベルを ELISA および RT-PCR 法で解析した。加えて、同培養系における Claudin-1 の発現レベルを解析するとともに、上皮間透過性の変化をデキストランの透過を指標に検討した。

### 3. 口腔粘膜上皮における IL-29 受容体発現とウイルス感染との関連

不死化歯肉上皮細胞 (OBA-9)、不死化表皮角化細胞 (HaCaT)、ヒト歯肉初代線維芽細胞 (HGF)、ヒト歯肉初代上皮細胞 (HGK)、ヒト表皮初代上皮細胞 (HEK)、および不死化肺線維芽細胞 (HFL-III) を用い、IL-10R2 および IL-28Ra mRNA 発現レベルを半定量 PCR、real-time PCR を用い解析した。

(倫理面への配慮)

細菌の使用は、国立大学法人東北大学研究用微生物安全管理規程により定める審査および承認を経て、同大の P2 実験室において実施した (承認番号 2014 歯研微-001)。

## C. 研究結果

### 1. 高齢マウスにおける粘膜バリア関連分子の発現動態

高齢マウス（20月齢）と若齢マウス（6週齢）の歯肉の total RNA を採取し、microarray 法にて解析を行った結果、バリア機能関連分子である Claudin-2 と Claudin-10 において高齢マウスで発現低下の傾向が見られた。同サンプルの組織切片に免疫染色を行なった結果、発現部位の局在変化が観察された。現在、老化上皮細胞を用いた実験系を確立し、in vitro において各分子の発現変化を検討している。

### 2. 歯周病原細菌による IL-31 発現誘導と粘膜バリア機能への影響

慢性歯周炎の主要な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の感染による肥満細胞からのインターロイキン-31 (IL-31) 産生機構について検討を行った。その結果、ヒト肥満細胞に *P. gingivalis* を感染させたことで、IL-31 が著明に産生されることを見出した。さらに、肥満細胞からの IL-31 産生作用は、*P. gingivalis* が産生するプロテアーゼであるジンジパインにより誘導されることが明らかとなった。ヒト歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を感染させると、ジンジパイン依存的にタイトジャンクション構成分子である claudin-1 発現が亢進した。Claudin-1 発現誘導は、同歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* 感染肥満細胞の培養上清で刺激すると抑制された。しかしながら、IL-31 中和抗体を添加すると抑制されなかったことから、*P. gingivalis* 感染により肥満細胞から産生された IL-31 は歯肉上皮細胞の claudin-1 発現誘導を抑制させることが示唆された。

### 3. 口腔粘膜上皮における IL-29 受容体発現とウイルス感染との関連

糖尿病患者は健常者と比較し、易感染性である事が知られている。当該年度は主に、ウイルス感染防御に関与するタンパクである IL-29 の口腔粘膜上皮細胞 (OBA-9) およびヒト口腔粘膜初代培養細胞に対する影響を解析した。その結果、両細胞を IL-29 処理することによりウイルス核酸に対する受容体である RIG-I や IFI-16 発現がタンパクレベルで上昇したが、IL-6 や IL-8, CXCL10 などの炎症性サイトカインやケモカイン産生量はほぼ変化がなかった。これら結果より、IL-29 が口腔粘膜における抗ウイルス活性を有する可能性が示唆された。

## D. 考察と結論

老化によってマウスの口腔粘膜における Tight junction 関連分子である Claudin-2 と Claudin-10 の発現低下が認められた。これら分子の変化は粘膜バリア機能の低下を引き起こしたりすることで、歯周病の病態悪化に関与する可能性がある。今後、正常上皮細胞の検討実験を行いこれら分子の発現低下による、上皮透過性の亢進が確認されれば加齢による細胞のバリア破綻が歯周病と関連する可能性が高まる。さらに上皮バリアタンパクが老化によるメチル化等で起こるものなのかの解析を行うことで歯周病患者における解析の手がかりとなり、歯周病病因論の新たな展開とその予防へと繋がる可能性が高い。

アトピー性皮膚炎、クローン病や潰瘍性大腸炎等、皮膚・粘膜バリアの破綻が病態形成に関わる疾患では、IL-31 発現が上昇することが示唆されており、IL-31 産生がバリアの破綻に関わる可能性が高い。慢性歯周炎患者の歯周組織には肥満細胞が集積することが明らかにされており、肥満細胞の IL-31 産生と口腔粘膜のタイトジャンクションへの影響を解明することは、歯周病の病態形成と口腔粘膜バリア破綻の関連性を証明する重要な意義を有する。

ウイルス感染が原因となる口腔粘膜疾患はヘルペス性口内炎や扁平上皮癌等多数存在するが、それら疾患の予防法はほとんど確立されていないのが現状である。本研究により、低濃度の IL-29 (数 ng/ml) が口腔粘膜において免疫賦活能を有する事が証明できれば、副作用の少ない (それ自身が炎症惹起作用を有しない)、新しいウイルス疾患に対する予防法になると考えられ、その臨床応用へと展開できる可能性がある。

本研究の結果から、老化あるいは歯周病原細菌により口腔粘膜のバリア機能が減弱することが明らかになった。今後は、これらのバリア機能低下の機序を明らかにするとともに、その機能を回復・維持する創薬のスクリーニングも合わせて行う予定である。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 1) Yamada K, Matsushita K, Jingshu W, Kanekura T

Topical Glucose Induces Claudin-1 and Filaggrin Expression in a Mouse Model of Atopic Dermatitis and in Keratinocyte Culture, Exerting Anti-inflammatory Effects by Repairing Skin Barrier Function.

**Acta Derm Venereol**, 98(1):19-25, 2018. doi: 10.2340/00015555-2807. PMID: 28967978.

##### 2) Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M, Ferdous T, Abdullah M, Mitan A, Michikawa M, Matsushita K

Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice.

**npj Aging and Mechanisms of Disease** 3, Article number:15, 2017, doi:10.1038/s41514-017-0015-x.

##### 3) Takada A, Matsushita K, Horioka S, Furuichi Y, Sumi Y.

Bactericidal effects of 310 nm ultraviolet lightemitting diode irradiation on oral bacteria.

**BMC Oral Health**, 6;17(1):96, 2017. doi: 10.1186/s12903-017-0382-5. PMID: 28587675.

##### 4) Tada H, Suzuki R, Nemoto E, Shimauchi H, Matsushita K, Takada H.

Increases in IL-33 production by fimbriae and lipopeptide from Porphyromonas gingivalis in

mouse bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 2.

**Biomed Res**, 38(3):189-195, 2017. doi: 10.2220/biomedres.38.189.

- 5) Tada H, Shimizu T, Matsushita K, Takada H.

*Porphyromonas gingivalis* induced IL33 downregulates hCAP18/LL37 production in human gingival epithelial cells.

**Biomed Res**, 38(3):167-173, 2017. doi: 10.2220/biomedres.38.167. PMID: 28637951.

2. 学会発表

- 1) Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, Matsushita K, Funaki M.

Palmitate may exacerbate the pathogenesis of periodontitis.

American Academy of Periodontology 103rd Annual Meeting, Sep 9, 2017, Boston, USA.

- 2) 多田浩之、松下健二

*Fusobacterium nucleatum* による好中球の neutrophil extracellular traps 産生を介した炎症反応の増悪.

第 60 回春季日本歯周病学会学術大会, 2017 年 5 月 11 日, 福岡

- 3) 高田鮎子、王静舒、古市保志、松下健二

老齢マウスにおける細胞間接着分子発現動態の解析 —加齢関連疾患としての歯周病病態形成との関連性—

第 17 回日本抗加齢医学会総会, 2017 年 6 月 2 日, 東京

- 4) 王静舒、山田きよ子、金蔵拓郎、松下健二

皮膚バリア修復による炎症改善の可能性：高濃度グルコース局所塗布による Claudin-1 および Filaggrin の発現誘導.

第 17 回日本抗加齢医学会総会, 2017 年 6 月 2 日, 東京

- 5) 四釜洋介、新垣理恵子、大塚邦紘、石丸直澄、松下健二

糖脂質代謝異常とシェーグレン症候群の病態：Adipokine の関連性.

第 26 回日本シェーグレン症候群学会学術集会, 2017 年 9 月 8 日, 東京

- 6) 多田浩之、西岡貴志、松下健二、菅原俊二

Neutrophil extracellular traps によるヒト血管内皮細胞の Del-1 産生抑制.

第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年 9 月 16 日, 松本

- 7) 多田浩之、西岡貴志、松下健二、尾之上さくら、川原一芳

歯周病における neutrophil extracellular traps 産生と血管内皮細胞の炎症誘導.

第 23 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2017 年 12 月 1 日～12 月 2 日, 西宮

- 8) 高田鮎子、松下健二、堀岡悟、古市保志、角保徳

新しい歯周炎予防・治療法としての 310 nm UVB-LED の可能性.

日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 2017 年 12 月 16 日, 京都

- 9) 四釜洋介、松下健二  
口腔粘膜での抗ウイルス自然免疫応答における interleukin (IL)-29 の役割.  
日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 2017 年 12 月 16 日, 京都
- 1 0) 多田浩之、松下健二、根本英二  
歯周病原細菌感染による NETs 産生は血管内皮細胞における炎症反応を増悪させる.  
日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 2017 年 12 月 16 日, 京都
- 1 1) 石原裕一、石田直之、道川誠、松下健二  
実験的歯周炎はアルツハイマー病モデルマウスの病態を悪化させる.  
第 3 回日本骨免疫学会 ウィンターセミナー, 2018 年 1 月 25 日, 軽井沢
- 1 2) 須磨紫乃、渡邊裕、平野裕彦、枝広あや子、白部麻樹、本川佳子、木村藍、松下健二、  
荒井秀典、櫻井孝  
アルツハイマー型認知症 (AD) とレビー小体型認知症 (DLB) の食行動特性の比較  
検討.  
第 28 回日本老年歯科医学会学術大会, 2017 年 6 月 14 日, 名古屋

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし