

マウス抜歯モデルにおける視床下部 SIRT1 発現の解析 (19-43)

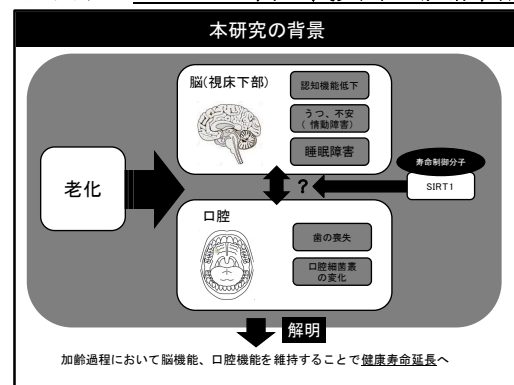
主任研究者 山田 (古川) 匡恵 国立長寿医療研究センター  
口腔疾患研究部 (流動研究員)

研究要旨

近年、咀嚼が全身に様々な影響を与えていることが示唆され、咀嚼の重要性が再認識されている。咀嚼を担う重要な器官である歯は、齲蝕や歯周病、歯牙破折などさまざまな原因で喪失し、その数は加齢に伴い減少する傾向にある。「加齢に伴うさまざまな口腔環境（歯数など）および口腔機能の変化、さらに社会的、精神的、身体的な予備能力の低下も重なり、口腔機能障害に脆弱性が増加した状態」は**オーラルフレイル**とよばれ、「うつ病」など自律神経に関わる疾患を引き起こし、**QOL**の低下の原因になると考えられている。また、歯の喪失や口腔機能低下に伴う口腔細菌叢の変化は、腸内細菌叢の解析で指摘されているようなうつ症状や睡眠障害の要因となる可能性がある。

一方、脳は哺乳類の老化・寿命を制御するうえで重要な役割を果たす臓器として認識されている。特に視床下部は老化・寿命制御の上位中枢として機能する。その中で特に **NAD+**依存性脱アセチル化酵素**サーチュイン1**（以下 **SIRT1** とする）は、睡眠の質や老化に伴う生理学的変化を制御する。また、脳内に発現する **SIRT1** が抑うつ状態や不安の形成に深く関わっていることも報告されている。しかし、視床下部の **SIRT1** が歯の喪失や口腔細菌叢の変化とどのような関係にあるかは未だ明らかになっていない。

そこで本研究は、歯の喪失による咬合不調和が視床下部に与える影響について同一の飼育環境で生育した若齢および老齢マウスの抜歯群と非抜歯群の視床下部を中心として解析し、咀嚼と **SIRT1** との因果関係を明らかにすることを、免疫組織化学的および分子生物学的に解析した。加えて、両マウスにおける口腔常在細菌叢の変化が視床下部や同部の **SIRT1** 発現等に及ぼす影響についても検討した（右上図）。



主任研究者

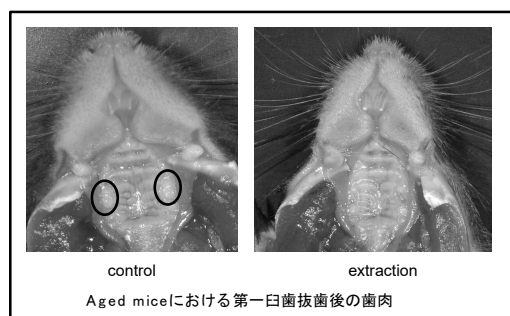
山田（古川）匡恵 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部（流動研究員）

#### A. 研究目的

本研究は、歯の喪失による視床下部への影響について同一の飼育環境で生育した若齢および老齢マウスの抜歯群と非抜歯群の視床下部を中心として解析し、歯の喪失とSIRT1との因果関係を明らかにすることを、免疫組織学的および分子生物学的に解析する。加えて、両マウスにおける口腔常在細菌叢の変化が視床下部や同部のSIRT1発現等に及ぼす影響についても検討する。

#### B. 研究方法

若齢・老齢マウスを抜歯、非抜歯（コントロール）群に分け、非抜歯群は麻酔のみを行い、抜歯群は麻酔下で上顎第一臼歯抜歯処置を行った後、1～6ヶ月（老齢は1～3ヶ月）飼育する（右図）。飼育中は1週間おきに体重を測定し、食餌量、生存率の観察を行う。飼育終了後、視床下部、脳、血液、尿、口腔粘膜スワブ、フンをそれぞれ回収する。回収した視床下部組織からRNAを抽出しSIRT1 mRNAやその他の老化関連遺伝子の発現レベルを解析した。また、回収したスワブから菌叢解析を行う。血液や尿からは、ストレスホルモンの解析を行なった。



（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験については、当センターの動物実験規程に則り、動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施した。また、動物実験研究を行うため、以下の4点に留意した。

##### ① マウスの匹数に関して

本実験では  $n=5$  で行う予定である。老齢マウスは特に個体のばらつきが多いため、 $n=5$  に設定したが、若齢マウスは reduction に配慮して  $n=3$  にとどめる。コントロール群は、同グループの他の研究で用いている個体を使用する予定である。

実験の老齢マウスを使用するにあたり、動物実験倫理（3Rs）の reduction（使用数削減）に最大限配慮することは重要であり、老齢マウスを使用する研究者との情報共有（実験動物管理室と相談）により実験に支障の無い範囲でマウスを共有する。

##### ② 抜歯に関して

抜歯は三種混合麻酔を行い、止血確認を行いながら抜歯をする。麻酔下（塩酸メドトミジン 0.3mg/kg+ミダゾラム 4mg/kg+酒石酸ブトルファノール 5mg/kg になるように生理食塩水で希釈し、腹腔内注射）（苦痛カテゴリーC に対する苦痛軽減、排除方法として行う）にて抜歯する。抜歯後の麻酔からの覚醒後の苦痛の軽減に関しては、文献上投薬をしたという記述は無く(Kawahata M et al. BMC Neurosci: 4;15:4, 2014)、抜歯に伴う多少の出血は想定されるが、通法に従い抜歯を行う。

### ③抜歯後の処置に関して

ラットでは歯牙の抜去後 1 週間で新生骨に置き換わるという文献(上原任,日大歯学 69:410-421,1995)もあり、マウスやラットはヒトよりターンオーバーが速いと認識しているため、投薬などの特別な処置は行わない予定である。抜去後 1 ヶ月の間 3 日毎、その後は週 1 回に定期的な体重測定を行い、通常飼育する。万が一、実験群が標準体重の 10%以上の減少や行動異常がみられた場合はエンドポイントに配慮して安楽死を選択する。

### ④抜歯後の給餌に関して

抜歯後の給餌は、文献上(穂積ら、補綴誌 45:602-611,2001)では切歯が残るため給餌には問題がないといわれている。4週間後に再度同様に麻酔し、視床下部を採取する。視床下部採取においては上記の三種混合麻酔を行い、Refinementにつとめる。

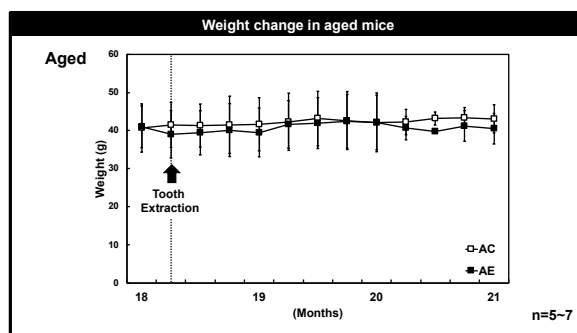
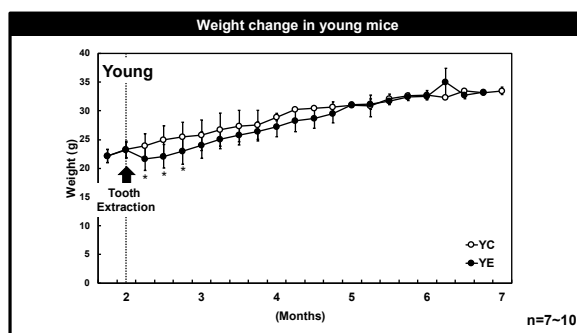
## C. 研究結果

マウスの上顎第一臼歯喪失による咬合不調和が全身に及ぼす影響について、体重変動を指標として観察した。若齢コントロール群 (YC), 若齢抜歯群 (YE), 老齢コントロール群 (AC), 老齢抜歯群 (AE) として示す。

グラフ中の YE, AE は黒、コントロール YC, AC 群は白で示す。

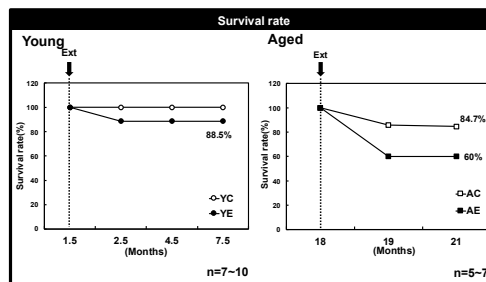
若齢マウスでは体重は YE 群において抜歯直後一時的に体重が減少するものの、その後は緩やかに増加し 1 ヶ月程度で YC 群と同程度まで増加した。(右上図) 老齢マウスでは、抜歯による侵襲は体重に影響を与えることはなかっただけでなく、また実験期間を通して体重の増加は見られなかった。

食餌量は、抜歯を含む群において抜歯直後 1 週間程度は減るものの、期間を通して大

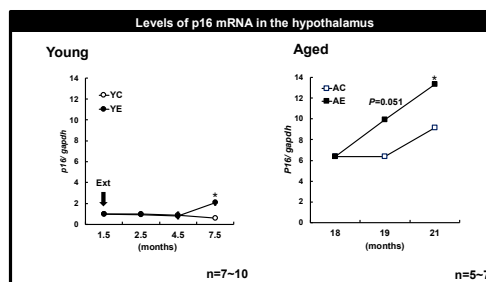


大きく変動することはなかった。

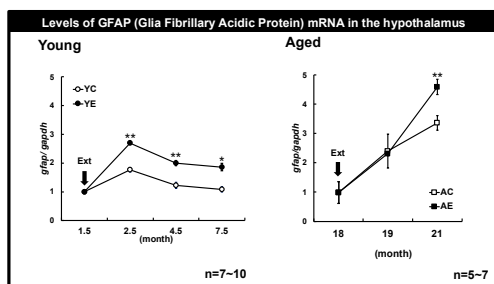
生存率について右図に示す。マウスの生存率は、若齢では、YC 群において 100%、YE 群では、88.5%だった。老齢マウスでの生存率は AC 群でも 84.7%、AE 群で 60%であった。抜歯群では、抜歯後の侵襲で亡くなるものはいしたが、その後の飼育中に食餌が取れなくて亡くなることはなかった（右図）。



Realtime-PCR における、視床下部における各種遺伝子に関する mRNA 発現を示す。老化マーカーである p16 は、若齢マウスで抜歯後 6 ヶ月に YC と比較して有意に上昇した。老齢マウスでも抜歯後に経時的に発現が上昇した（右図）。

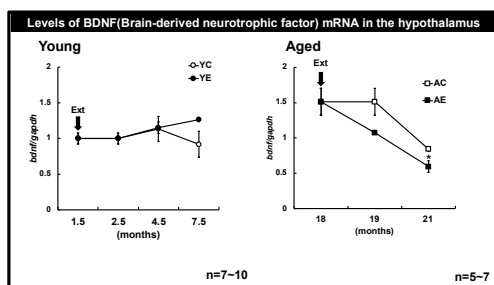


GFAP はアストロサイトの細胞骨格を構成するタンパク質で、脳の老化に伴い増加していることが報告されている。若齢マウスでは抜歯後 1 ヶ月で、視床下部 GFAP mRNA



発現レベルが増加し、その後も高いままだった。老齢群では、抜歯群で計時的に有意に増加した（左図）。

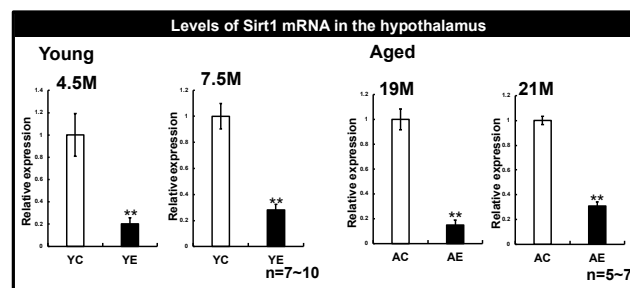
BDNF はアストロサイトへの脳血管栄養因子として、アルツハイマー病やうつ病の患者において発現が低下することが報告されている。



若齢群の視床下部では期間を通して YE 群と YC 群で変化が見られなかったが、老齢では、経時的に両群とも減少する傾向がみられたが、特に AE 群で抜歯後 3 ヶ月に有意に低下した。

SIRT1 mRNA 発現に関してはまだ検討中の

ため、若齢は 3、6 ヶ月目、老齢は 1、3 ヶ月目を示す。YE、AE 群においてコン YC、AC 群と比較して有意に低下した（右図）。



#### D. 考察と結論

本研究において、歯の喪失は、体重や生命維持には異常をきたさないものの、視床下部 SIRT1 の発現を低下させることが明らかになった。

他の脳関連分子については、視床下部において **p16 の増加、BDNF の低下、また GFAP の増加**が mRNA レベルで確認できた。これらのことにより、歯の喪失が視床下部の老化に影響を及ぼし、アストログリオシスを引き起こしていることが示唆された。

今後は尿、血液、菌叢解析等の解析を行うとともに、歯の喪失、咬合不調和による生理学的・行動学的検討も随時行う予定である。視床下部だけでなく、認知機能に関連する分子の海馬での発現を免疫染色や Realtime-PCR で解析する。

また、歯の喪失だけでなく老化による嚥下障害などにより、軟食を好む高齢者が増加していることから、泥状の餌が脳へ与える影響を検討する。若年期より咀嚼をしないことや老年期の流動食が、視床下部における SIRT1 mRNA レベルの発現を減少させ、また脳の老化を促進させることが推測できる。

本研究は、咀嚼と脳（視床下部）の老化を分子レベルで世界で初めて解明しようとする極めて独創的で意欲的な研究であり、本成果の波及効果も極めて高いと考えている。

#### E. 健康危険情報

なし

※班のすべての健康危険情報について記載すること。このため、分担項目に係る情報であっても分担研究報告ではなく、こちらに記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, J Inflamm Res, In press, Matsushita K, Yamada-Furukawa M, et al.
- 2) High concentration of glucose induces filaggrin-1 expression through by AP-1 in human skin keratinocyte cultures, J Derma Sci, 2020 Apr 14;S0923-1811(20)30135-3., Furukawa M, et al.
- 3) Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice, Aging (Albany NY), 11(19) (2019)8329-8346, Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, et al. (査読：有)

##### 2. 学会発表

- 1) Giri S, Takada A, Furukawa M, Matsushita K, Furuichi Y, Analysis of expression of tight junction molecules in young and senescence induced gingival epithelial cells in response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysachharide, 第 63 回春季日本歯周病学会学術大会, 2020, 福島市.

- 2) Furukawa M, Matsuda K, Kurosawa M, Wang J, Watanabe M, Aoki Y, Shikama Y, Matsushita K, Analysis of cellular senescence in gingival fibroblasts, 4th Meeting of IADR Asia Pacific Region, 2019, Brisbane.
- 3) 松田一成、古川匡恵、黒澤実愛、青木優、四釜洋介、松下健二、老齡マウス歯周組織における遺伝子発現の網羅的解析、老齡マウス歯周組織における遺伝子発現の網羅的解析、2019、北九州市.
- 4) 古川匡恵、松田一成、黒澤実愛、青木優、四釜洋介、松下健二、歯肉線維芽細胞の老化解析、第 61 回歯科基礎医学会、2019、東京

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