

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

3年間全体について

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、老齢マウスでは若齢マウスと比較して、口腔粘膜バリアを構築する分子やコラーゲンなどのマトリックス構成タンパク質の発現が低下していた。また、老齢マウスにおいてはケモカイン遺伝子の著しい亢進が認められた。一方、無菌状態のマウスでは SPF マウスと比較して、顕著な免疫関連遺伝子の低下がみられた。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の感染により、歯肉上皮細胞の老化が促進されるとともに、粘膜バリアの低下が誘導された。また、*P. gingivalis* の感染によりマスト細胞はインターロイキン-31 (IL-31) を産生し、歯肉粘膜バリアを破壊することで、歯周病原細菌の感染を悪化させることを明らかにした。III 型インターフェロンの一種である IL-29 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微生物をはじめとする外来抗原の生体侵襲を亢進して、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考えられた。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することができるものと考えられる。現在、上皮バリア機能を回復・促進する化合物の三択を行っている。これらと並行して、歯周病・糖尿病・認知症の三者を結びつける分子の役割についてマウスモデルで解析する準備を進めている。

2019年度について

1. 老齢マウス、および歯周病患者における粘膜バリア動態の解析に関する研究
(古市、松下)

加齢における口腔粘膜バリア関連因子の発現変化をヒト歯肉上皮細胞培養系で検討した。過酸化水素で処理したヒト歯肉上皮細胞において SA- β Gal、p16、p23、p53 の発現が上昇し、老化細胞の特徴を示した。また、高継代数のヒト歯肉上皮細胞においても先

の老化マーカーが上昇することを確認した。これらの老化細胞における、バリア機能関連分子 (Claudin-1,2,10, Occludin, E-cadherin, Filaggrin) の発現変化を PCR 法で調べたところ、Claudin-1,2, Occludin, Filaggrin の発現上昇さらに Claudin-10 の有意な発現低下を認めた。老化誘導細胞の TEER (経上皮電気抵抗) は有意な低下を認めた。以上の結果から、老化を誘導した歯肉上皮細胞では、上皮バリア機能が低下し、物質の透過性が亢進する可能性が示された。今後、歯周病モデルマウス (in vivo) を用いて解析する予定である。

2. 歯周病原菌とバリア破綻の関連性 (多田、松下)

本年度は、マスト細胞において慢性歯周炎の原因菌の一種である *Fusobacterium nucleatum* が誘導する細胞外トラップ (mast cell extracellular traps; MCETs) と慢性歯周炎の病態形成の関連性について検討した。ヒトマスト細胞株 HMC-1 に歯周病原細菌 *F. nucleatum* を感染したところ、同細胞から網状構造を示す MCETs 産生が観察された。この MCETs は、マスト細胞からマクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor; MIF) を強く誘導した。MCETs における MIF 発現は、*F. nucleatum* LPS により caspase-1, -4, -5 が活性化されることによって活性化された。さらに、MCETs 刺激マクロファージでは、IL-1 β , IL-6 ならびに IL-8 の産生が誘導された。感染の初期バリアとして働く MCETs が、歯周炎症の惹起に関与することが明らかとなった。

3. 糖尿病、高脂血症と粘膜バリア破綻の関連性に関する研究 (四釜)

ヒト口腔粘膜由来初代培養上皮細胞 (HGK) における IL-29 処理の TLR 発現に及ぼす影響および IL-29 前処理の IL-6, IL-8, IFN- β 発現増強メカニズムについて解析した。IL-29 は、ウイルス核酸を認識する TLR である TLR3, TLR9、および菌体成分の認識に関与する TLR2 の発現を亢進した。HGK において、RIG-I agonist の一つである 5' triphosphate hairpin (3p-hp)RNA 刺激により IL-6, IL-8, IFN- β が産生された。また、ウイルス RNA を模した 3p-RNA 刺激による NF- κ B のリン酸化は、IL-29 前処理により増強された。さらに、IFN- β 産生に関与する転写因子の一つである Interferon regulatory factor (IRF) 3 のリン酸化についても IL-29 前処理で増強した。

4. 歯周病・糖尿病・認知症の因果関係を明らかにするためのマウスモデルの開発 (里)

認知症や糖尿病が及ぼす歯肉および口腔粘膜におけるバリアタンパク質の発現および口腔細菌層の動態について解析を行うための、糖尿病モデルマウスおよび認知症モデルマウスを準備している段階である。糖尿病モデルマウスとしては食欲抑制ホルモンであるレプチンを欠損して肥満、糖尿病を呈する ob/ob マウス、認知症モデルマウスとしては、家族性変異型 APP がノックインされて内因性プロモーターで発現が制御されている APP KI マウス、さらにそれらの掛け合わせマウスを準備している。本年度は ob/ob マウス

スト APP KI マウスの掛け合わせると寿命が短くなることが判明した。またその脳内においてグリア細胞の変容が認められた(shinohara, Sato, et al. FASEB J, 2020)。現在、ob/ob マウスと APPKI マウスの掛け合わせより、得られたマウスの加齢を進め、継続して交配し実験に必要な n 数の確保を行っている。

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

里 直行 国立長寿医療研究センター 部長

多田 浩之 東北大学 講師

古市 保志 北海道医療大学 教授

研究期間 2017年4月1日～2019年3月31日

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、高脂血症、認知症等）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

3年間全体について

1. 老齢マウス、および歯周病患者における粘膜バリア動態の解析に関する研究

（古市、松下）

31ヶ月齢および6週齢の C57BL/6NCrS1 マウスの下顎を μ CT 撮影し、歯槽骨の吸収を観察した。C57BL/6ncrs1c の 20 月齢の雌のマウス（n = 3）（国立長寿医療研究センターエイジングファーム、日本、大府）を炭酸ガスにて屠殺後直ちに歯肉を採取し、

tRNA を回収した。その後 RNasy Micro Kit (QIAGEN) を使用して tRNA の濃縮を行なった。その後、タカラバイオ (日本、滋賀) に Agilent Expression Array 解析 (SurePrint G3 Mouse GE 8×60k v2 Microarray) を委託した。RNA の品質を検定後、tRNA (100ng) を用いて Cy3 標識 cRNA を作成、その後 0.6ug の cRNA を用いてハイブリダイゼーションを行なった。ついで、同マウスの下顎骨を採取し、歯周組織の HE 染色と Tight junction 関連分子である Claudin-1,2,10 および E-cadherin の免疫染色を行なった。さらに、同分子を Real-Time PCR 法および Western blot 法にて解析を行った。その後加齢した細胞での接着分子の発現変化を測定する為にヒト歯肉上皮細胞 (HGEPp) を用いて *in vitro* での実験系の検討を行なった。ヒト歯肉上皮細胞 (HGEPp) を過酸化水素 (400 μ M) によって刺激後、SA- β Gal の染色によって細胞の老化を確認した。さらに同細胞の RNA を回収し、p16, p23, p53 の発現変化を RCR 法を行なって老化の評価を行った。同様に、高継代数のヒト歯肉上皮細胞 (HGEPp) と低継代数のもの老化確認を行い、前者の老化マーカーを確認した。さらに、過酸化水素による老化誘導細胞 (HGEPp) において細胞間接着因子、Claudin-1, Claudin-2, Claudin-10, Occludin, E-cadherin, Filaggrin の発現変化を Real-Time PCR 法にて確認した。また、過酸化水素による老化誘導細胞 (HGEPp) の継電気抵抗値 (TER) を計測し、バリア機能の変化の評価を行なった。

2. 歯周病原菌とバリア破綻の関連性 (多田、松下)

歯周病原細菌は慢性歯周炎の病態形成に深く関わる *P. gingivalis* と *F. nucleatum* を供試した。マスト細胞は、ヒトマスト細胞株 HMC-1 ならびにマウス骨髄細胞を IL-3 で分化誘導した bone marrow derived-mast cells (BMMCs) を供試した。歯周病原細菌をマスト細胞に感染後、IL-31 を中心とした炎症性分子の産生を ELISA 法で測定した。口腔粘膜バリア機能の解析は、ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 におけるタイトジャンクション分子発現ならびに FITC-dextran による細胞間透過性で評価した。また、マウス口腔に *P. gingivalis* を感染させる歯周病マウスモデルを用いて、感染後の歯肉における炎症性分子ならびにバリア機能を担うタイトジャンクション分子発現を解析した。さらに、歯周病原細菌の感染によりヒトマスト細胞が産生する細胞外トラップ (mast cell extracellular traps; MCETs) について、歯周病原細菌 *F. nucleatum* および HMC-1 を用いて *in vitro* の実験系で解析を行った。

3. 糖尿病、高脂血症と粘膜バリア破綻の関連性に関する研究 (四釜)

口腔粘膜由来細胞における IL-29 受容体発現解析：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)、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。

歯肉上皮細胞における STAT1 活性化に対する IL-29 の効果 : OBA-9 および HGK における IL-29 の STAT1 リン酸化に対する効果を western blotting 法を用い解析した。

HGK における RIG-I および TLRs 発現に対する IL-29 の効果 : HGK における IL-29 の RIG-I および TLRs 発現に対する効果、またこれら発現に対する STAT1 阻害剤(S14-95)の影響を real-time PCR 法および western blotting 法を用い解析した。

3p-hpRNA 誘導性 IL-6, IL-8, IFN- β 産生に対する IL-29 の増強効果 : HGK を用い、IL-29 前処理が 3p-hpRNA 刺激による NF-kB および IRF3 リン酸に及ぼす影響、また IL-6, IL-8, IFN- β 産生に及ぼす影響をそれぞれ western blotting 法および ELISA 法を用い解析した。

4. 歯周病・糖尿病・認知症の因果関係を明らかにするためのマウスモデルの開発 (里)
糖尿病合併 AD マウスである APP KI; ob/ob マウスの掛け合わせを行った。野生型マウス、APP KI マウス、ob/ob マウス、APP KI; ob/ob マウスの各マウスを作成および繁殖を行った。

2019年度について

1. 老齢マウス、および歯周病患者における粘膜バリア動態の解析に関する研究 (古市、松下)
加齢における口腔粘膜バリア関連因子の発現変化を培養細胞系で確認するために、ヒト歯肉上皮細胞の老化の確認を行った。HGEPp 細胞の過酸化水素刺激による老化誘導の実験系を確立した。その後、老化細胞における細胞間接着因子の発現変化を PCR 法で確認した。Western blot 法は現在解析中である。また、老化誘導細胞におけるバリア機能の変化を TEER にて評価した。
2. 歯周病原菌とバリア破綻の関連性 (多田、松下)
F. nucleatum 感染による HMC-1 細胞からの MCETs 産生について、細胞外 DNA 蛍光色素 SYTOX green ならびに走査型電子顕微鏡で評価した。MCETs におけるシトルリン化ヒストン H3 ならびに抗菌ペプチド hCAP-18/LL-37 発現をウェスタンブロッティング法にて、炎症性サイトカイン発現をサイトカインアレイ法で網羅的に解析した。MCETs における MIF 発現は ELISA 法で測定した。MCETs における MIF 発現に caspase-1, -4, -5 が関わる可能性について、それぞれの阻害剤である z-YVAD-fmk, z-LEVD-fmk および z-WEHD-fmk を用いた。MCETs による炎症誘導の解析には、活性型ビタミン D3 誘導體 OCT を処理したヒト単球系細胞株 THP-1 を供試し、同細胞からの IL-1 β , IL-6 ならびに IL-8 産生を ELISA 法で測定した。

3. 糖尿病、高脂血症と粘膜バリア破綻の関連性に関する研究（四釜）

HGKにおける RIG-I および TLRs 発現に対する IL-29 の効果：HGK における IL-29 の RIG-I および TLRs 発現に対する効果、またこれら発現に対する STAT1 阻害剤(S14-95) の影響を real-time PCR 法および western blotting 法を用い解析した。

3p-hpRNA 誘導性 IL-6, IL-8, IFN- β 産生に対する IL-29 の増強効果：HGK を用い、IL-29 前処理が 3p-hpRNA 刺激による NF-kB および IRF3 リン酸に及ぼす影響、また IL-6, IL-8, IFN- β 産生に及ぼす影響をそれぞれ western blotting 法および ELISA 法を用い解析した。

4. 歯周病・糖尿病・認知症の因果関係を明らかにするためのマウスモデルの開発（里）

野生型マウス、APP KI マウス、ob/ob マウス、APP KI; ob/ob マウスの各群の作成および繁殖を行った。

（倫理面への配慮）

すべての基礎研究は事前に組み替え DNA および動物実験プロトコルなどが国立長寿医療研究センターで承認された後に開始した。組み換え DNA 実験に関しては、平成 16 年 2 月に施行されたカルタヘナ法（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の確保に関する法律）を遵守し、規定に則った実験プロトコルを作成し遵守して研究をおこなった。加えて本研究のすべての動物実験は下記の国のガイドライン・法律などを遵守し、実施した。「動物の愛護および管理に関する法律」（昭和 48 年法律第 105 号）「厚生労働省の所管する動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日科発第 0601001 号厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）

また、老齢 SPF および無菌マウスを用いた実験は、オリエンタルバイオサービスの南山研究所で実施された。実施に際しては、国内法令・指針に照らして同社の倫理委員会の承認を得た後、同社の実験動物福祉規定に沿って実施された。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）。ヒト口腔粘膜切片は徳島大学口腔分子病態学分野の工藤保誠先生より提供いただいたものであり、徳島大学病院の倫理委員会で承認を受けた。

C. 研究結果

3年間全体について

1. 老齢マウス、および歯周病患者における粘膜バリア動態の解析に関する研究

（古市、松下）

μ CT 解析の結果、老齢マウスは、若齢マウスと比較して根分岐部の歯槽骨が有意に吸収されていた。マイクロアレイ解析の結果、老齢マウスにおいて Tight Junction を構成

する分子である Claudin-2, -10 の発現が低下していた。歯周組織の染色の結果、老齢マウスの付着上皮は若齢マウスのそれより重層化し、根尖側へ移動する傾向が観察された。また、若齢マウスと比較して Claudin-2, -10 の発現量が少なく、また発現部位に違いがみられた。しかし、Real-Time PCR 法および Western blot 法による解析は Claudin-2,10 のマイクロアレイの結果を反映しなかった。その為ヒト正常歯肉上皮細胞

(HGEPP) を用いて実験の検討を行なった。ヒト正常歯肉上皮細胞は過酸化水素刺激によって老化誘導を認めた。さらに老化誘導細胞では細胞間接着因子の有意な発現上昇と発現低下がみられ、かつ TEER の低下が認められた。

2. 歯周病原菌とバリア破綻の関連性 (多田、松下)

P. gingivalis による歯周炎マウスモデルを用いた実験を実施した。口腔に *P. gingivalis* を感染させると歯肉における IL-31 mRNA 発現が著明に亢進することを発見した。それに対して、マスト細胞欠損マウスでは、*P. gingivalis* 感染による歯肉の IL-31 mRNA 発現に変化はみられなかったことから、*P. gingivalis* による歯肉の IL-31 発現上昇にはマスト細胞が関わる可能性が示唆された。

次に、*P. gingivalis* の感染によりマスト細胞から IL-31 が産生されるメカニズムについて、HMC-1 ならびに BMBCs に *P. gingivalis* W83 株を感染させた結果、これらマスト細胞は多量の IL-31 を産生することを発見した。*P. gingivalis* はシステインプロテアーゼであるジンジパインを産生することで、宿主細胞に多様な病原性を示すことが明らかにされている。そこで、*P. gingivalis* によるマスト細胞の IL-31 産生誘導が、ジンジパインにより担われる可能性を検討した。ジンジパインを欠損する *P. gingivalis* を用いて検討したところ、マスト細胞の IL-31 産生は完全に消失したことから、*P. gingivalis* が産生するジンジパインがマスト細胞の IL-31 産生を誘導することが明らかとなった。

口腔の粘膜は、上皮細胞による角質層とタイトジャンクションの二つのバリアによって病原微生物の侵入を阻止しており、クローディン-1 は歯肉におけるタイトジャンクションを構成する重要な役割を担っている。そこで、*P. gingivalis* の感染によりマスト細胞から産生された IL-31 が、歯肉粘膜バリアを破綻させる可能性について検討した。その結果、IL-31 は歯肉上皮細胞のクローディン-1 発現を抑制し、バリア機能を低下させることを証明した。さらに、歯周病原細菌 *F. nucleatum* 感染によるマスト細胞からの MCETs 産生について検討した。その結果、*F. nucleatum* 感染により HMC-1 細胞は MCETs を産生することを見出した。同 MCETs には多量のマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) が結合し、MCETs-MIF 複合体はマクロファージから多量の炎症性サイトカイン産生を誘導することが明らかとなった。

3. 糖尿病、高脂血症と粘膜バリア破綻の関連性に関する研究 (四釜)

口腔粘膜由来細胞における IL-29 受容体発現解析：IL-10R2 は実験に供試した全ての細

胞でその発現を確認する事ができたが、IL-28Ra は上皮系細胞にのみ発現しており、表皮由来より口腔粘膜由来の上皮細胞の方がその発現レベルは高い値を示した。

歯肉上皮細胞における STAT1 活性化に対する IL-29 の効果：OBA-9 および HGK において、IL-29 は濃度依存的に STAT1 をリン酸化した。

HGK における RIG-I および TLRs 発現に対する IL-29 の効果：IL-29 は濃度依存的に RIG-I および TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 の遺伝子発現を誘導した。IL-29 は濃度依存的に RIG-I および TLR2, TLR3, TLR9 のタンパク発現を誘導した。IL-29 による RIG-I タンパク発現上昇は S14-95 処理により著しく抑制された。

3p-hpRNA 誘導性 IL-6, IL-8, IFN- β 産生に対する IL-29 の増強効果：HGK において、3p-hpRNA 濃度依存的に IL-6, IL-8, IFN- β 産生が誘導された。3p-RNA 刺激による NF- κ B および IRF3 のリン酸化が IL-29 前処理により増強された。3p-RNA 刺激による IL-6, IL-8, および IFN- β 産生が IL-29 前処理により増強された。

4. 歯周病・糖尿病・認知症の因果関係を明らかにするためのマウスモデルの開発（里）

ob/ob マウスと APP KI マウスの掛け合わせると寿命が短くなることが判明した。またその脳内においてグリア細胞の変容が認められた。現在、ob/ob マウスと APP KI マウスの掛け合わせより、得られたマウスの加齢を進め、継続して交配し実験に必要な n 数の確保を行っている。

2019年度について

1. 老齢マウス、および歯周病患者における粘膜バリア動態の解析に関する研究 (古市、松下)

ヒト正常歯肉上皮細胞 (HGEPp) を使用した細胞培養系の確立と老化細胞におけるバリア機能の変化を確認した。歯肉上皮細胞は 400 μ M の過酸化水素刺激によって SA- β Gal の発現上昇かつ p16,21,53 の発現上昇によって老化誘導を認めた。さらに、老化誘導細胞では細胞間接着因子である Claudin-1,2 Occludin, Filaggrin の有意な発現上昇と、E-cadherin の有意な発現低下を認めた。さらに老化誘導細胞の TEER (経上皮電気抵抗) の低下も確認された。

2. 歯周病原菌とバリア破綻の関連性 (多田、松下)

歯周病原細菌 *F. nucleatum* 感染によるマスト細胞からの MCETs 産生について検討した。その結果、*F. nucleatum* 感染により HMC-1 細胞は MCETs を産生することを見出した。同 MCETs には多量のマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) が結合し、MCETs-MIF 複合体はマクロファージから多量の炎症性サイトカイン産生を誘導した。

3. 糖尿病、高脂血症と粘膜バリア破綻の関連性に関する研究（四釜）

HGK における RIG-I および TLRs 発現に対する IL-29 の効果 : IL-29 は濃度依存的に RIG-I および TLR2, TLR3, TLR4, TLR9 の遺伝子発現を誘導した。IL-29 は濃度依存的に RIG-I および TLR2, TLR3, TLR9 のタンパク発現を誘導した。IL-29 による RIG-I タンパク発現上昇は S14-95 処理により著しく抑制された。

3p-hpRNA 誘導性 IL-6, IL-8, IFN- β 産生に対する IL-29 の増強効果 : HGK において、3p-hpRNA 濃度依存的に IL-6, IL-8, IFN- β 産生が誘導された。3p-RNA 刺激による NF- κ B および IRF3 のリン酸化が IL-29 前処理により増強された。3p-RNA 刺激による IL-6, IL-8, および IFN- β 産生が IL-29 前処理により増強された。

4. 歯周病・糖尿病・認知症の因果関係を明らかにするためのマウスモデルの開発（里）

認知症や糖尿病が及ぼす歯肉および口腔粘膜におけるバリアタンパク質の発現および口腔細菌層の動態について解析を行うための、糖尿病モデルマウスおよび認知症モデルマウスを準備している段階である。糖尿病モデルマウスとしては食欲抑制ホルモンであるレプチンを欠損して肥満、糖尿病を呈する **ob/ob** マウス、認知症モデルマウスとしては、家族性変異型 APP がノックインされて内因性プロモーターで発現が制御されている APP KI マウス、さらにそれらの掛け合わせマウスを準備している。本年度は **ob/ob** マウスと APP KI マウスの掛け合わせと寿命が短くなることが判明した。またその脳内においてグリア細胞の変容が認められた (shinohara, Sato, et al. FASEB J, 2020)。現在、**ob/ob** マウスと APP KI マウスの掛け合わせより、得られたマウスの加齢を進め、継続して交配し実験に必要な n 数の確保を行っている。

D. 考察と結論

老齢マウスでは付着上皮の根尖側移動と重層化の様子が観察され、その様子は歯周炎の治癒形態と類似していた。この長い上皮性の付着は通常の付着上皮と違い、炎症を起こした際には歯周ポケット形成が再発しやすい危うい治癒形態である。そのため加齢変化によって同様の状態が生じることにより、加齢に伴って歯周病を発病し易い可能性が考えられる。また、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か可能性がある。老化誘導細胞では、**Claudin-1,2**, **Occludin** や **Filaggrin** の発現上昇と **Claudin-10** と **E-cadherin** の発現低下が mRNA レベルで確認された。これらの結果は老化マウスの口腔粘膜の変化と一致しない点もある。しかし、TEER の低下が確認されたことより、いずれにしても老化による細胞間接着因子の発現変化がバリア機能の低下を起こしていると考えられる。今後は細胞間接着因子それぞれの機能において検討することで老化におけるバリア機能低下のメカニズムを探る予定である。老化によってマウス口腔粘膜における **Tight junction** 関連分子の発現低下が

認められた。さらに、老化細胞においても細胞間接着因子の発現低下と TEER の低下が確認された。これらの分子の変化は粘膜バリア機能の低下を引き起こし、歯周病原毒素の侵入を容易にしたり、歯肉溝滲出液の増加をきたしたりすることで、歯周病の病態悪化に関与する可能性があることが考えられる。現在、これらのバリア低下を抑制する化合物を探索中である。

細菌感染も粘膜バリアを低下させる重要な要因となりえる。本研究の結果から、歯周病原細菌の感染により、マスト細胞は IL-31 や細胞外トラップ等、炎症性分子の産生を促進させ、歯肉上皮細胞のバリア機能維持に破綻を来すことが明らかとなった。歯肉粘膜バリア破綻は歯周炎の慢性化病態の形成に深く関与することが推測され、加えて歯周病における慢性炎症の存在は他臓器における炎症性疾患の増悪にもつながる。今後、歯周病における炎症遷延化の制御を目的としたマスト細胞の制御も歯周病の治療に有用である可能性が考えられた。

ウイルスに関する研究は非常に幅広く行われているが、口腔粘膜における抗ウイルス能の増強、賦活作用に着目した検討はほとんど行われていない。歯科領域疾患の中で、ウイルス感染に起因する疾患の予防、治療法開発は臨床上非常に重要であると考えられる。本研究結果により、IL-29 タンパクで口腔粘膜を賦活することにより、RIG-I 等のウイルス核酸受容体発現を誘導する事で、抗ウイルス能を増強出来る可能性が示唆された。今後、これら知見を基にした新規予防・治療戦略を構築する予定である。

本研究が目的とする認知症や糖尿病が及ぼす歯肉および口腔粘膜におけるバリアタンパク質の発現および口腔細菌層の動態について解明するための、モデルマウス（糖尿病モデルマウス、認知症モデルマウス、それらの合併マウス）を作成している。ob/ob マウスと APP KI マウスの掛け合わせマウスは寿命が短くなり、脳内のグリア細胞が変容することから、これらのマウスの口腔細菌を調べることによって、脳内の変化および寿命への影響への相関が明らかとなる可能性がある。マウスの解析のため時間を要しているが、今後も継続して本研究を進めることが重要であると考えられる。

本研究の結果から、歯周病の発症には、組織の老化が重要な因子となることが明らかとなった。口腔粘膜の老化は、宿主の加齢変化とともに口腔細菌の刺激によって促進される。また、その顕著な変化として粘膜のタイトジャンクションの低下が観察された。今後、その役割をマウスモデルで更に研究するとともに、その回復に有効な創薬の効果検証を引き続き行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2017年度

- 1) 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.
- 2) 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.
- 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.
- 4) Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M, Ferdous T, Abdullah M, Mitani 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.
- 5) 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.

2018年度

- 1) Suma S, Watanabe Y, Hirano H, Kimura A, Edahiro A, Awata S, Yamashita Y, Matsushita K, Arai H, Sakurai T.
Factors affecting the appetites of persons with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.
Geriatr Gerontol Int, 18(8):1236-1243, 2018.
- 2) Tada H, Nishioka T, Takase A, Numazaki K, Bando K, Matsushita K.
Porphyromonas gingivalis induces the production of IL-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier.
Cell Microbiol, 21(3):e12972, 2019.

2019年度

- 1) Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K
Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice.
Aging (Albany N.Y.), 11(19):8329-8346, 2019.

- 2) Ukita M, Matsushita K, Tamura M, Yamaguchi T
Histone H3K9 methylation is involved in temporomandibular joint osteoarthritis.
Int J Mol Med, Feb;45(2):607-614, 2020.
2. 学会発表
2017年度
- 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) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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

- 9) 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
- 1 0) 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 1) 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 2) 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
- 2 0 1 8 年度
- 1) Yamada K, Matsushita K, wang J, Kanekura T
Induction of Keratin 1 and keratin 10 Expression by Topical Glucose in a Mouse Model of Atopic Dermatitis and in Keratinocyte Culture: A Possible Role of Glucose in Skin Barrier Repair.
International Investigative Dermatology 2018, May 16-19, 2018, Florida, USA.
- 2) Ukita M, Matsushita K, Tamura M, Yamaguchi T
Histone methylation involved in temporomandibular joint osteoarthritis.
29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting, September 2-5, 2018, Queenstown, New Zealand.
- 3) Ukita M, Matsushita K, Tamura M, Yamaguchi T
Histone methylation involved in temporomandibular joint osteoarthritis in aged mice.
The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, Nov 17, 2018, Sapporo, Japan
- 4) 浮田万由美、松下健二、田村正人、山口泰彦
ヒストンメチル化は変形性顎関節症に関与する.
第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018 年 9 月 7 日, 福岡
- 5) 多田浩之、沼崎研人、西岡貴志、松下健二、菅原俊二
P. gingivalis 感染によりマスト細胞から産生された IL-31 は claudin-1 発現抑制を介して歯肉上皮バリア破綻を誘導する.
第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018 年 9 月 7 日, 福岡
- 6) 石山莉奈、松下健二、根本英二、多田浩之
Fusobacterium nucleatum によるマスト細胞からの extracellular traps 産生誘導.
第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018 年 10 月 25~26 日, 大阪

- 7) 米満由奈帆、松下健二、根本英二、多田浩之
Neutrophil extracellular traps によるヒト血管内皮細胞の ICAM-1 発現誘導.
第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018 年 10 月 25~26 日, 大阪
- 8) 四釜洋介、黒澤実愛、山田 (古川) 匡恵、松下健二
口腔粘膜における IL-29 の抗真菌および抗ウイルス作用: 臨床応用の可能性.
第 61 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2018 年 10 月 26 日, 大阪
- 9) 多田浩之、西岡貴志、根本英二、松下健二
Porphyromonas gingivalis によるマスト細胞由来 interleukin-31 を介した歯肉上皮細胞
の claudin-1 ダウンレギュレーション作用.
第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2018 年 11 月 1~2 日, 京都
- 1 0) 庵原耕一郎、松下健二、中島美砂子
ナノバブルの辺縁性歯周炎治療への応用.
第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2018 年 11 月 1~2 日, 京都
- 1 1) 四釜洋介、黒澤実愛、松下健二
IL-29 は口腔粘膜上皮細胞において RIG-I 発現誘導を介し抗ウイルス活性を増強す
る.
第 24 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2018 年 12 月 1 日, 横浜
- 1 2) 多田浩之、西岡貴志、松下健二
歯周病原細菌によるヒトマスト細胞からの細胞外トラップ産生と炎症誘導.
第 24 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2018 年 12 月 1 日, 横浜
- 2 0 1 9 年度
- 1) Kurosawa M, Furukawa M, Matsushita K, Shikama Y.
Senescence-associated T-lymphocytes accumulate in the submandibular glands of aged
mice.
97th IADR General Session, June 20, 2019, Vancouver, BC, Canada.
- 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, Nov 29, 2019, Brisbane, Australia.
- 3) 四釜洋介、黒澤実愛、古川匡恵、松下健二
エストロゲンの欠乏は唾液腺上皮細胞に CXCL13 産生を誘導し、老化関連 T 細胞
集積を促進する.
第 42 回日本基礎老化学会大会, 2019 年 6 月 7 日, 仙台
- 4) 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
免疫老化及び細胞老化による唾液腺への SA-T 細胞集積メカニズムの解析.
第 38 回分子病理学研究会, 2019 年 7 月 19~20 日, 兵庫

- 5) 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介
 唾液腺上皮の細胞老化及び免疫老化が唾液腺機能に与える影響:老齢マウスおよびモデルマウスを用いた解析.
 第 28 回日本シェーグレン症候群学会学術集会, 2019 年 9 月 13~14 日, 徳島
- 6) 古川匡恵、松田一成、黒澤実愛、青木優、四釜洋介、松下健二
 歯肉線維芽細胞および老齢マウスの歯肉における細胞老化の解析.
 第 61 回歯科基礎医学会学術大会, 2019 年 10 月 14 日, 東京
- 7) 多田浩之、西岡貴志、松下健二、菅原俊二
Fusobacterium nucleatum 感染によりマスト細胞が産生する細胞外トラップは、MIF 依存的に炎症を誘導する.
 第 61 回歯科基礎医学会, 2019 年 10 月 12 日~14 日, 東京
- 8) 古川匡恵、松田一成、黒澤実愛、青木優、四釜洋介、松下健二
 老齢マウス歯肉組織における遺伝子発現の網羅的解析.
 第 62 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2019 年 10 月 25 日, 北九州
- 9) Giri S, Takada A, Furukawa M, Matsushita K, Furuichi Y.
 Comparative expression of junctional proteins in young and senescence induced gingival epithelial cells.
 第 62 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2019 年 10 月 25 日, 北九州
- 10) Tada H, Matsushita K, Sugawara S
 Cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis* induces the production of IL-31 by mast cells, resulting in downregulation of claudin-1 in gingival epithelial cells.
 第 48 回日本免疫学会学術集会, 2019 年 12 月 12 日, 浜松

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