

マウス抜歯モデルにおける視床下部 SIRT1 発現の解析（19-43）

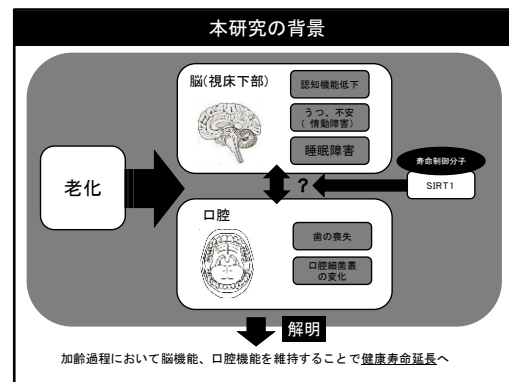
主任研究者 山田（古川）匡恵 国立長寿医療研究センター  
口腔疾患研究部（流動研究員）

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、歯牙破折などあらゆる原因で喪失し、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<sup>+</sup>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**（右図）。そこで本研究は、歯の喪失による咬合不調和が脳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を1～6ヶ月飼育し、**視床下部および海馬を中心として解析することで、咀嚼とSIRT1をはじめとした老化関連分子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、両マウスにおける行動観察を行い、歯の喪失がマウスの行動に及ぼす影響についても検討した。



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）

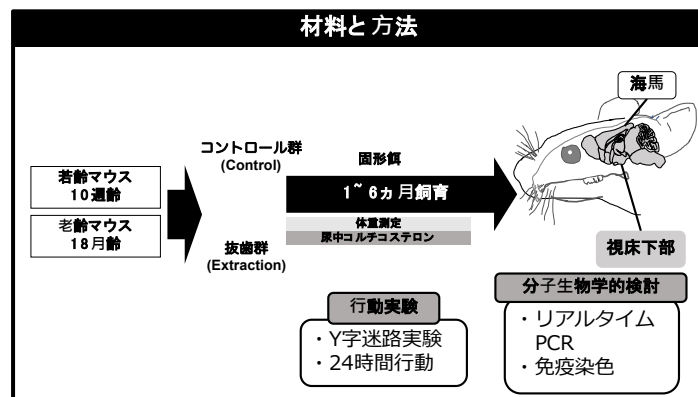
研究期間 2019年4月1日～2021年3月31日

#### A. 研究目的

本研究は、歯の喪失による自律神経系の変化とくにオーラルフレイルによって惹起されるうつ病や睡眠障害に関してのメカニズム、そして老化・寿命制御に関わる遺伝子 SIRT1 との因果関係について明らかにする。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ことが目的である。このことを明らかにすることにより、超高齢社会に移行する日本において、老化と寿命に果たす老化機構の意義と将来展望を考察でき、自分の歯を残す重要性を啓発することが可能となる。

#### 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）飼育した（右図）。飼育中は1週間おきに体重を測定し、食餌量、生存率、行動実験を検討した。飼育終了後、視床下部、海馬、脳、血液、尿、口腔粘膜スワブ、フンをそれぞれ回収した。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、回収した口腔粘膜スワブから菌叢解析を行う。血液や尿からは、ストレスホルモン等の解析を行なった。

#### （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した。

実験に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）

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ことにした。

## ②抜歯に関して(右図)

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)にて上顎第一臼歯を抜歯した。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,

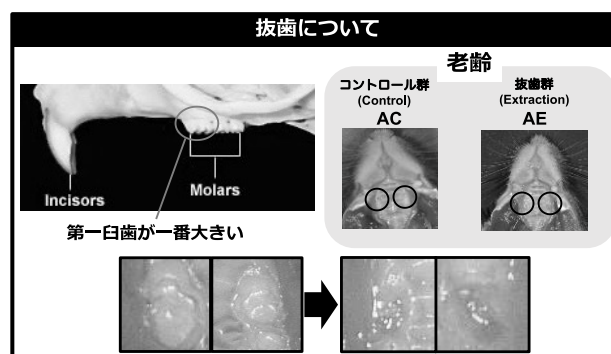
2014)、抜歯に伴う多少の出血は想定されるが、通法に従い抜歯を行った。

## 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かった。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、通常飼育した。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ことにした。

## 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。そこで、視床下部やその他臓器の採取においては上記の三種混合麻酔を3倍量で行い、Refinementにつとめた。



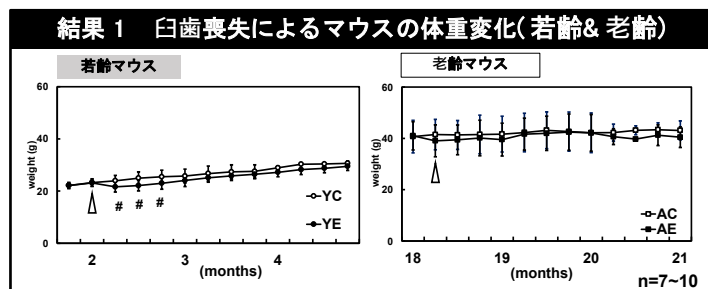
## C. 研究結果

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、1~6ヶ月(老齢は1~3ヶ月)間検討した。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。

以下、研究結果について各項目に分け、個別に記載した。

### 【体重変化】

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。(結果 1) 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つただけでなく、また実験期間を通して体重の増加は見られなかつた。



### 【生存率】

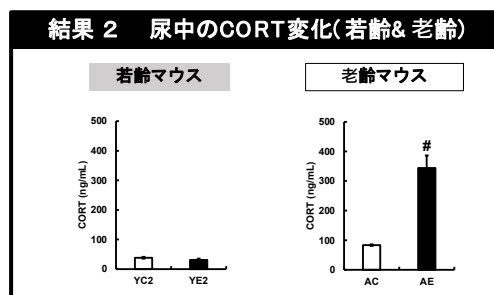
マウスの生存率は、若齢では、YC 群において 100%、YE 群では、88.5%だった。老齢マウスでの生存率はAC 群でも 84.7%、AE 群で 60%であった。抜歯群では、抜歯後の侵襲で亡くなるものはいたが、その後の飼育中に食餌が取れなくて亡くなることはなかつた。

### 【食餌量について】

食餌量は、抜歯 (YE,AE) 群において抜歯直後 1 週間程度は減少するものの、期間を通して大きく変動することではなかつた。

### 【尿中コルチコステロンについて】

尿中のコルチコステロンは、コルチゾール、コルチゾンと同様に副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドの一種であり、その分泌はストレスとの関連性が高く、尿中濃度の測定で非侵襲手法によるストレス度測定に有効なバイオマーカーとして注目されている。抜歯 1 ヶ月後のマウスの尿で尿中コルチコステロンを検討した。(結果 2) コルチコステロンは、若齢では変化が見られなかつたが、老齢マウスにおいて、抜歯により有意に上昇した。



### 【行動実験について】

行動実験は、Y 迷路実験、24 時間行動観察、ロータロッドの 3 つを行った。

#### Y 迷路実験

Y 迷路実験は Y 字型の迷路の中で、マウスが探索行動を行い、自発的に異なるアームへ入る性質を利用した試験で、認知機能の検討に用いられる。

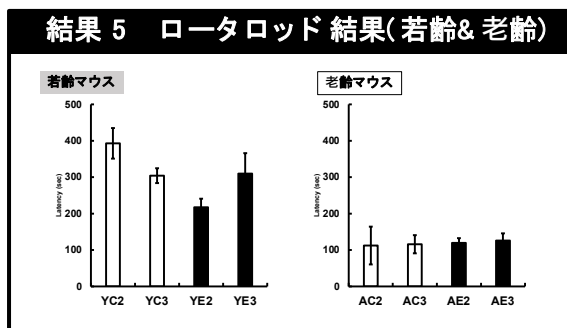
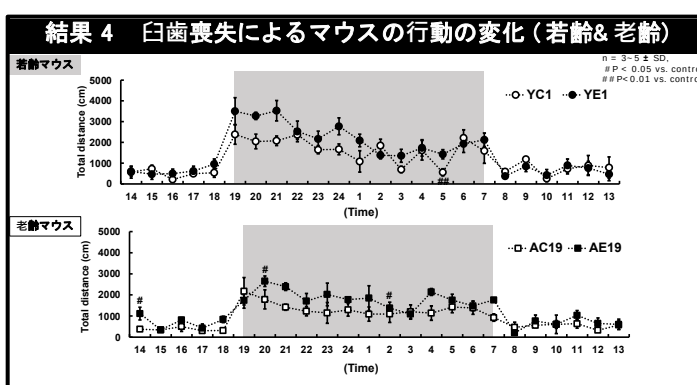
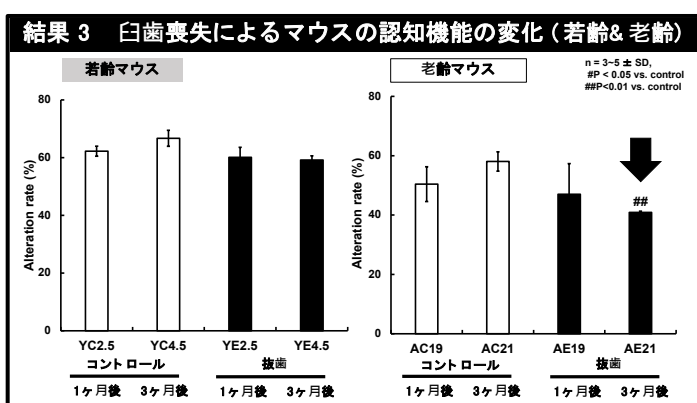
Y 迷路実験でのワーキングメモリーを結果 3 に示す。若齢マウスは抜歯をしても認知機能には影響はなかったが、老齢マウスでは、AC 群と比較して AE 群で有意に認知機能の低下が起こった（結果 3）。

## 24 時間行動観察

ホームゲージモニタリングを使用してマウスの 24 時間の行動観察を行った（結果 4）。行動パターンを解析した結果、抜歯群は若齢 (YE)・老齢 (AE) とも夜間の活動量が増加する傾向が見られ、それは老齢マウスにおいて顕著だった。

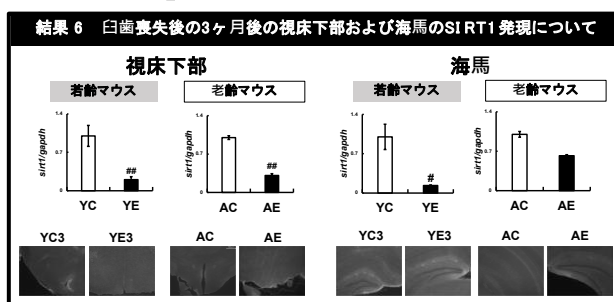
## ロータロッド

ロータロッドでマウスの運動協調性や疲労耐性の評価を行った（結果 5）。若齢では歯の喪失により、やや潜伏時間が減る傾向にあったが、大きな差は見られなかった。老齢では、抜歯による影響はみられなかったが、若齢と老齢で比較すると老化により潜伏時間が有意に低下する傾向が見られた。



## 【視床下部および海馬における SIRT1 発現について】

視床下部および海馬における SIRT1 発現について Realtime-PCR、および免疫染色の結果を示す（結果 6）。SIRT1 mRNA 発現に関して、若齢・老齢ともに 3 ヶ月目を示す。YE、AE 群において YC、AC 群と比較して有意に低下した。



## 【その他の老化関連分子の海馬および視床下部における mRNA 発現について】

＜海馬＞海馬における老齢マウスの Realtime-PCR の結果を示す（結果 7）。若齢群は、表に示す。AE 群では、細胞老化マーカーである p16、ミクログリアマーカーの Iba1、アストロサイトの老化マーカーである GFAP の発現増加が見られた。一方、脳由来神経栄養因子である BDNF と神経細胞のマーカー NeuN、神経活動の指標となる c-fos の発現低下が観察された。

＜視床下部＞視床下部における老齢マウスの遺伝子発現の変化を示す。p16、GFAP、Iba1 の増加、BDNF の低下が見られた（結果 8）。

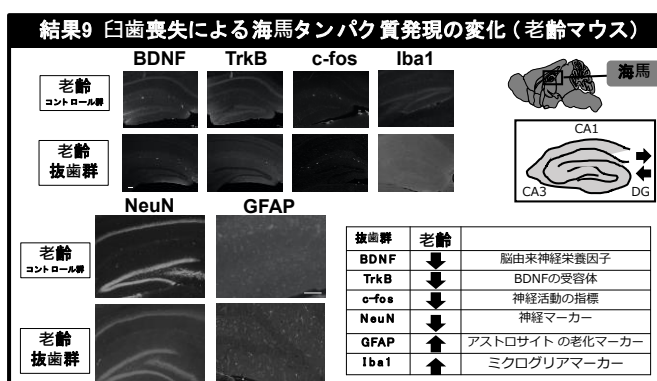
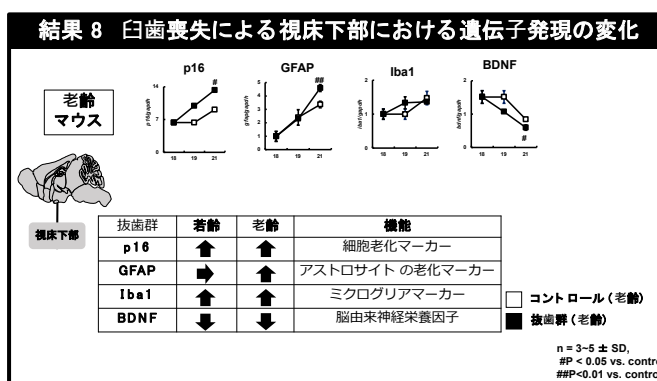
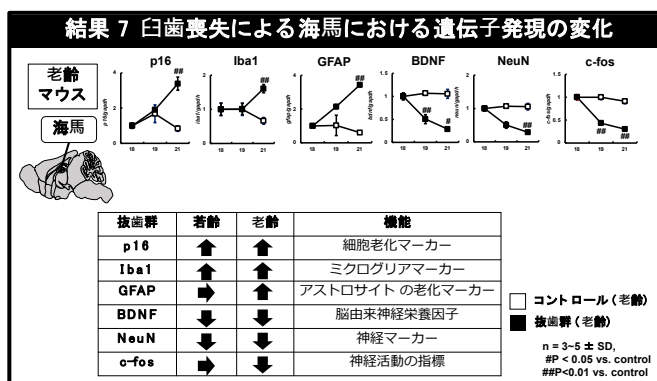
## 【その他の老化関連分子の海馬における免疫染色について】

老齢マウスの海馬における各分子の免疫染色パターンを示す。老齢の抜歯群の海馬において、BDNF とその受容体である TrkB、c-fos、NeuN の発現低下が見られるとともに、GFAP と Iba1 の発現増加が観察された（結果 9）。

若齢マウスの海馬においても老齢マウスと同様の結果が得られた（結果は示さず）。

## 口腔細菌叢および血液サンプルについて

サンプルは回収したが、解析費用が不足しているため解析には至らなかった。



## D. 考察と結論

本研究において、臼歯の抜歯により咀嚼が困難になったマウスは、体重や生命維持には異常をきたさないものの、海馬および視床下部において老化関連分子の増加とともに神経細胞の減少や神経炎症が惹起されている可能性が考えられた。

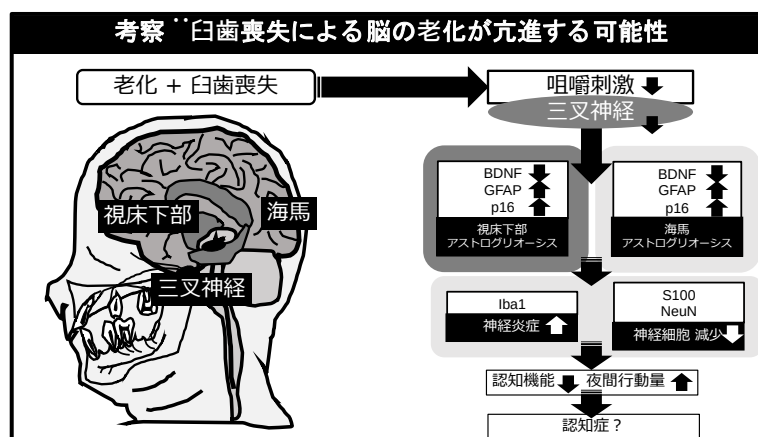
他の脳関連分子についての検討結果では、視床下部および海馬において p16 の増加、BDNF の低下、また GFAP の増加が mRNA レベルおよび免疫染色で確認できた。



これは、脳血管栄養因子である BDNF の低下により、脳への栄養供給が減少した結果、GFAP が上昇していることからアストロサイトが視床下部および海馬において増生し、アストログリオーシスであったことが示唆される。この現象には、p16 の上昇が関与している可能性が考えられた（右図）。

行動実験の結果においても、認知機能の低下および夜間活動量の増加が見られた。尿中コルチコステロン値は、老齢マウスにおいて抜歯群で上昇していた。

これらの結果により、特に老化した個体においては



咀嚼をすることが視床下部および海馬の老化を制御するために重要であることが示唆された。また、咀嚼による口腔内への刺激が感覚受容器により受容され、三叉神経を介して上位中枢から入力されることから、抜歯による三叉神経への入力が増加することで、海馬や視床下部でのアストログリオーシスが起きている可能性が示唆された。

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、今後は咀嚼の重要性についてさらに検討し発表する予定である。本研究の結果から、若年期からの軟食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、歯の喪失が、脳、特に視床下部および海馬への老化に繋がることを明らかにし、咀嚼の重要性、欠損補綴の重要性についてエビデンスを持って啓発できる世界初の研究であるといえる。

#### E. 健康危険情報

2019 年度 なし

2020 年度 なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

2019 年度

1) Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, J Inflamm Res, 30;13:275-283, Matsushita K, Yamada-Furukawa M, et al. (査読：有)

2) High concentration of glucose induces filaggrin-1 expression through by

AP-1 in human skin keratinocyte cultures, J Derma Sci, 98(2):137-140, Furukawa M, et al. (査読：有)

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)

## 2020 年度

1) Effect of green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro, J Oral bioscience, 63(1)58-65, Furukawa M, Wang J, Kurosawa M, Ogiso N, Shikama Y, Kanekura T, Matsushita K. (査読：有)

2) Chemokines Up-Regulated in Epithelial Cells Control Senescence-Associated T Cell Accumulation in Salivary Glands of Aged and Sjögren's Syndrome Model Mice, Int J Mol Sci, 25;22(5):2302, Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M et al. (査読：有)

## 2. 学会発表

### 2019 年度

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、東京都.

### 2020 年度

1) 歯牙の喪失および軟食が視床下部に及ぼす影響～若齡・老齡マウスにおけるおよび解析～、山田(古川) 匡恵、黒澤 実愛、松下 健二、第 20 回抗加齡医学会総会、2020 年 9 月 25-27 日、東京都. 優秀演題賞受賞.

2) プロポリスは高齢者の口腔粘膜炎症の治療に有望である～in vitro および in vivo における解析～、山田(古川) 匡恵、黒澤 実愛、松下 健二、第 20 回抗加齡医学会総会、2020 年 9 月 25-27 日、東京都.



3) 黒澤 実愛、山田(古川) 匡恵、松下 健二、加齢による口腔乾燥症の病態形成における老化関連 T 細胞の関与第 20 回抗加齢医学会総会、2020、東京都.

4) Sarita Giri, Ayuko Takada, Masae Furukawa, Kenji Matsushita, Yasushi Furuichi, 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大会、2020、web 開催.

5) Sarita Giri, Ayuko Takada, Masae Furukawa, Kenji Matsushita, Yasushi Furuichi, Concentration dependent effect of hydrogen peroxide to induce cellular senescence in gingival epithelial cells and reversal of senescence by fisetin, 第 39 回北海道医療大学歯学会春季学会大会、2021、オンライン開催.

#### 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