

歯周組織脆弱化の制御を基盤とした新しい歯周病制御法の開発（20-13）

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（第二次健康日本 21 および口腔保健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、認知症等による歯周組織の脆弱化が歯周病病態に及ぼす影響を明らかにするとともに、歯周組織の保持・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歯肉脆弱化機序の解明と歯肉粘膜修復剤の探索、②老齢マウスおよび歯周病患者における歯肉粘膜動態の解析、③歯周病原菌と血管破綻の関連性、④糖尿病、高脂血症と歯肉粘膜破綻の関連性、について解析を行うことにしている。本年度は、研究遂行のための予備実験を中心に研究を実施した。その結果、老齢マウス歯肉における老化関連因子の発現動態や炎症細胞の浸潤状況が明らかにするとともに、その制御因子の候補を特定できた。また、老化上皮細胞におけるバリア機能低下機序の一端を明らかにした。歯肉上皮における抗ウイルス分子としての IL-29 の役割について明らかにした。さらに、歯周病原細菌が BBB のバリア機能低下を誘導する機序を明らかにした。

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

本研究では、老化等に伴う歯周組織の脆弱化、特に口腔粘膜バリア破綻とその機序を解明するとともに、その制御を基盤とした新しい歯周病制御法を開発することを最終目的とする。具体的には、①歯肉粘膜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歯肉粘膜の修復に効果のある新規歯周病治療薬の探索を行う。最終年度までに、歯肉粘膜の修復および強化に資する化合物を1つ以上明らかにすること、またそのための口腔健康維持の方法を提案することを目標とする。

歯周病の発症と進行には加齢変化あるいは老化が関連していることが示唆されてきた（Ebersole JL et al. *Periodontol* 2000. 2(1):54-75, 2016）が、その科学的根拠あるいは分子基盤はほとんど明らかにされていない。本研究は、老化による歯周病の発症病理を理解し、それを制御することを目指す極めて新規性の高い研究である。また、歯周病原細菌が歯周組織の老化に及ぼす影響も不明なままであることから、細菌感染・感染症と粘膜老化の関連性を明らかにする点も独創的である。加えて、糖尿病や高脂血症と歯周病との相互関係は広く認知されているが、炎症の波及といった観点でしか研究が進んでいないため、両者の関係を物質の透過や病原物質の侵入等に影響を及ぼす歯肉粘膜脆弱化の観点から両者の関係を明らかにしようとする点で斬新である。また、当センターで飼育している老齢マウス等を用いることにより、それらの関連性を詳細に、かつ総合的に理解することができる。

本研究班は、研究計画を遂行する上で必要十分なメンバー構成であり、それぞれの専門性を駆使し、それぞれの課題を効率的に推進することができる。加えて、日頃より連携・協力して研究を行ってきた気心の知れたメンバーであるので、密に連絡を取りながら確実に成果を上げることができると考えている。

## B. 研究方法

### （1）全体計画

本研究では、以下の4つの項目について研究を行うことにしている。

①老化を誘導した歯肉上皮細胞を用いて、バリア機能の低下や免疫機構の変化を検討する。また、加齢マウス歯周炎モデルにおける歯肉上皮の変化を若齢マウスのそれと比較検討する。さらに、歯周炎患者のサンプルを用いて加齢によるバリア機能変化の解析を行う（松下、古市）。

②口腔粘膜上皮細胞およびマウスマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞を用い、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) の菌体成分および CpG DNA 刺激による炎症反応およびバリアタンパク発現を *in vitro* で解析する（四釜）。

③ *P.g* 感染によるヒト血管内皮細胞ならびにヒト脳毛細血管内皮細胞のバリア破綻機構について、本菌を培養細胞に感染させる *in vitro* 培養系を用いた解析を行う（多田）。

④粘膜機能の保持・修復に重要な因子の発現を制御できる化合物を探索し、創薬の候補を見出す（松下）。

## （２）年度別計画

令和２年度

1. 老化誘導歯肉上皮細胞モデルを用いて LPS 刺激による細胞接着因子の発現変化のタンパク質レベルをウエスタンブロッティング法にて、接着因子のバリア機能を TER（径上皮電気抵抗）測定によって検索した。さらに LPS 刺激に伴う免疫機構関連のサイトカイン等の変化を ELISA によって調べた（松下、古市）。
2. ヒト口腔粘膜初代培養細胞を用い、*P.g* LPS または *P.g* 乾燥死菌体と CpG DNA 共刺激による IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  発現を real-time PCR 法および ELISA 法により解析した。また、共刺激だけでなく前刺激等も検討した（四釜）。
3. ヒト毛細血管内皮細胞株 hCMEC/D3 に *P.g* を感染後、同細胞のバリア機能への影響について、タイトジャンクション分子の claudin 発現ならびに経内皮電気抵抗（TEER）を解析した（多田）。
4. 既存の低分子化合物ライブラリを用いて、歯肉上皮細胞のバリア機能を改善できる化合物候補を探索した（松下）。

## （倫理面への配慮）

すべての基礎研究は、事前に組み換え 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

### ① 歯肉脆弱化機序の解明と歯肉粘膜修復剤の探索

歯肉脆弱化の基盤となる歯肉の老化分子の発現や免疫細胞の動態の解析を、老齢マウスを用いて解析を行った。その結果、老齢マウス歯肉粘膜および粘膜下組織において各種老化関連分子（SA- $\beta$ -gal、p16、p21）や炎症関連分子（IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等）の発現増強とともに、Type I、IV Collagen 発現低下や MMP-3 の発現増強が確認された。これらの発現変化は *in vitro* で実験的に老化を誘導した歯肉線維芽細胞においても観察された。

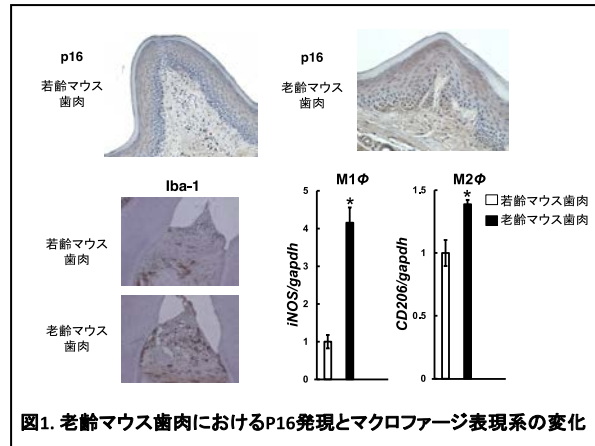


図1. 老齢マウス歯肉におけるP16発現とマクロファージ表現系の変化

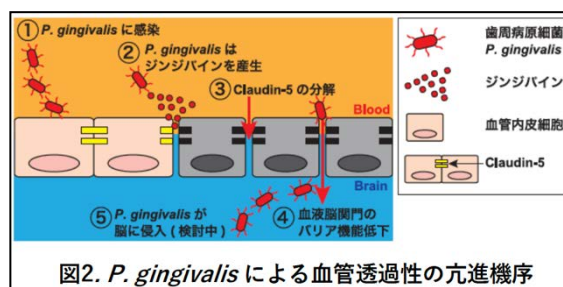
さらに、老齢マウスの歯肉において、M1 マクロファージの増加と M2 マクロファージの減少といった M1/M2 マクロファージのバランスの変化が観察された（図1）。以上の結果から、老齢マウスの歯肉において慢性炎症の亢進と組織治癒の低下に繋がる可能性がある分子発現の変化が見られることが明らかとなった。また、老化細胞消去剤 ABT263 によって歯肉線維芽細胞培養系における老化関連分子および炎症関連分子の発現低下が認められたことから、老化細胞消去剤が歯肉脆弱化を予防する創薬として有望である可能性が示唆された。以上の結果を論文にまとめ、*Journal of Periodontal Research* に投稿中である。また、糖代謝系を制御する化合物である糖アルコール類の老化関連因子や炎症関連因子の発現に対する作用を歯肉線維芽細胞および歯肉上皮細胞培養系で検討中である。

### ② 老齢マウスおよび歯周病患者における歯肉粘膜動態の解析

老化を誘導した歯肉上皮細胞を用いて、バリア機能の低下や免疫機構の変化を検討した。老化誘導後のヒト歯肉上皮細胞（HGEPp）に *Porphyromonas gingivalis* (Pg) LPS で作用後の継電気抵抗値（TER）を計測した。結果、LPS 刺激群（コントロール、老化誘導）と老化誘導群は電気抵抗値が低下し、バリア機能が低下した。さらに、LPS 刺激によって通常細胞では低下を示したのに対し、老化誘導細胞は Claudin-1 の mRNA 発現が上昇した。Claudin-2 においては、LPS 刺激によって、若齢細胞、老化誘導細胞ともに mRNA 発現上昇を示した。E-cadherin は LPS 刺激によって、若齢細胞、老化誘導細胞ともに mRNA 発現低下を示した。Connexin も同様に、LPS 刺激によって、若齢細胞、老化誘導細胞ともに mRNA 発現低下を示した。さらに、TNF- $\alpha$  は LPS 刺激によって、若齢、老化誘導細胞ともに発現が上昇し、老化細胞群がより大きな上昇を示した。現在、モデルマウスを用いた実験の準備を行っている。

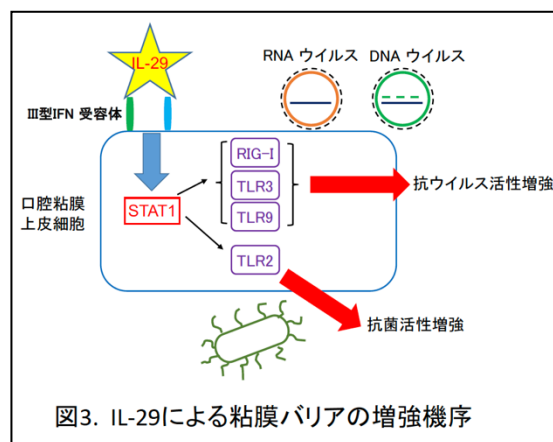
### ③ 歯周病原菌と血管破綻の関連性

歯周病原菌 *P. gingivalis* (*P.g*) による血液脳関門 (BBB) のバリア破綻機構について、ヒト脳毛細血管内皮細胞 hCMEC/D3 細胞株 (D3) における *in vitro* 実験系にて検討した。*P.g* 感染は D3 の BBB バリアを担う主要なタイトジャンクション (TJ) 分子 claudin-5 タンパク発現を著明に低下させた。同作用は、*P.g* 凍結乾燥全菌体でも確認されたのに対して、リジン特異的ジンジパイン (Kgp) 欠損 *P.g* 株でみられず、精製 Kgp がヒトリコンビナント claudin-5 を分解したことから、ジンジパイン K によるタンパク分解作用であることを証明した。さらに、*P.g* は claudin5 と同様に BBB バリアを担う occludin, ZO-1 ならびに ZO-2 発現も著明に低下させることを見出した。他方、*P.g* 感染により BBB バリア機能が低下することを経内皮細胞電気抵抗試験 (TEER) で明らかにしており、同現象が TJ 発現低下に依存する可能性について検討を進めている。図 2 にこれまでの結果から想定される機序を示す。



### ④ 糖尿病、高脂血症と歯肉粘膜破綻の関連性

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おり、その原因の一つが粘膜バリア破綻であると考えられる。我々は III 型 interferon (IFN) の一つである interleukin (IL) -29 がヒト歯肉上皮細胞 (*in vitro*) において、pattern recognition receptors (PRRs) 発現を誘導する事により、抗ウイルス能を増強する作用を持つ事を見出した。今回、ヒト歯肉切片を用い、上皮組織における、IL-29 受容体



(IFN- $\lambda$ 1) 発現を免疫組織化学染色により検討した結果、歯肉上皮表層にその陽性細胞が存在する事を確認した。さらに近年、I 型 IFN は上皮細胞において新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の受容体である ACE2 発現を誘導する事が報告されているが (Cell. 2020;181:1016)、我々の実験結果から、IL-29 は ACE2 発現にほぼ影響しない事を明らかにした。図 3 に想定される IL-29 による粘膜バリアの増強機序を示す。

## D. 考察と結論

老化誘導細胞ではいくつかの細胞間接着因子が発現上昇し、TEER (経上皮電気抵抗) の低下が確認された。一方、LPS 刺激後では細胞間接着因子は減少し、TEER (経上皮電

気抵抗) はさらに低下する傾向が見られた。このことは、加齢によって細胞間接着因子の発現は上昇したが、LPS への感受性が上昇することでバリア機構に影響を与えることが示唆された。今後は加齢マウスでの LPS 刺激を行い歯周炎の状態を想定した実験を行うとともに、患者の歯肉サンプルを回収し細胞間接着因子の発現変化を調べ、加齢に伴うバリア機能変化を解析することとしている。さらに、それらと歯周炎の発症・進展との関連性を明らかにする予定である。これらの研究から加齢と歯周炎の病態変化の関連性を解明することで、新しい歯周病制御法への開発に役立てることができると考えている。

ヒトおよびマウスにおいて、肥大化した脂肪細胞から遊離する DNA 断片が TLR9 を介し慢性炎症を惹起する事が知られている。また臨床研究から、肥満の人が歯周病になりやすい事が明らかになっているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究結果は、脂肪細胞由来の自己核酸が、歯肉上皮細胞における炎症性サイトカインおよび TLR2 発現誘導を介して歯周病の病態を増悪し得る事を示唆しており、自己核酸をターゲットにした新たな歯周病の治療戦略開発に繋がることが考えられる。

*Pg* がどのようにして脳と血液を隔てる BBB を通過するか、分子機序は未だ不明である。今後、claudin-5 発現減少による BBB 機能低下について、ヒト脳毛細血管内皮細胞を用いたバリア機能解析を行う。さらに、ジンジパインがヒト脳毛細血管内皮細胞に発現する他の tight junction 分子をタンパク分解する可能性について検討を行う予定である。本研究の結果から、歯周病菌がアルツハイマー病を増悪させる分子機序の一端を明らかにすることができると考えている。

本研究の結果から、老齢マウス歯肉や培養老化歯肉細胞において歯肉の脆弱化や易感染につながる分子の発現増加が観察されたことから、これらの変化が老齢期において慢性歯周炎が増加する原因である可能性が考えられた。今後、これらの発現を制御し、歯肉を健康に保つことができる化合物を明らかにすることによって、高齢者における歯周病の発症や増悪を防ぐ創薬や口腔ケア製品の開発につなげることができると考えている。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Furukawa M, Yamada K, Kurosawa M, Shikama Y, Wang J, Watanabe M, Kanekura T, Matsushita K  
High concentration of glucose induces filaggrin-1 expression through AP-1 in skin keratinocytes.  
J Dermatol Sci, 98(2):137-140, 2020.

- 2) Hagiwara M, Matsushita K  
Synthetic cell-permeable caveolin-1 scaffolding domain peptide activates phagocytosis of Escherichia coli by regulating Rab5 activity.  
Naturforsch C J Biosci, 75(9-10):333-337, 2020.
- 3) Shimazaki Y, Nonoyama T, Tsushita K, Arai H, Matsushita K, Uchibori N  
Oral hypofunction and its association with frailty in community-dwelling older people.  
Geriatr Gerontol Int, doi.org/10.1111/ggi.14015, 2020.
- 4) Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M, Arakaki R, Ishimaru N, Matsushita K  
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, 22(5):2302, 2021.
- 5) Furukawa M, Wang J, Kurosawa M, Ogiso N, Shikama Y, Kanekura T, Matsushita K  
Effect of green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro.  
J Oral Biosci, 63:58-65, 2021.

## 2. 学会発表

- 1) Giri S, Takada A, Matsushita K, Furukawa M, Furuichi Y  
Effect of aging on junctional molecules of gingival epithelial cells.  
106TH Annual Meeting of American Academy of Periodontology, Nov. 6-15, 2020, Online held.
- 2) 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 lipopolysaccharide.  
第 63 回春季日本歯周病学会学術大会, 2020 年 7 月 13 日～8 月 7 日, 2020, Web 開催
- 3) 黒澤実愛、古川匡恵、松下健二、四釜洋介  
老化関連 T 細胞および唾液腺上皮の細胞老化が口腔乾燥症の病態形成に関与する可能性。  
第 62 回歯科基礎医学会学術大会, 2020 年 9 月 11 日～10 月 9 日, Web 開催
- 4) 山田（古川）匡恵, 黒澤実愛、松下健二  
歯牙の喪失および軟食が視床下部に及ぼす影響 ～若齢・老齢マウスにおけるおよび

解析～

第 20 回抗加齢医学総会, 2020 年 9 月 25～27 日, 受賞講演

- 5) 山田 (古川) 匡恵、黒澤実愛、松下健二

プロポリスは高齢者の口腔粘膜炎の治療に有望である ～in vitro および in vivo における解析～

第 20 回抗加齢医学総会, 2020 年 9 月 25～27 日, Web 開催

- 6) 黒澤実愛、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 回抗加齢医学総会, 2020 年 9 月 25～27 日, Web 開催

- 7) Giri S, Takada A, Furukawa M, Matsushita K, Furuichi Y

Concentration dependent 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学術大会, 2021 年 3 月 13 日, Web 開催

- 8) ソン・リーティン、松下健二、多田浩之

*Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるヒト血管内皮細胞の PAI-1 分解作用.

第 94 回日本細菌学会総会, 2021 年 3 月 23 日～25 日, Web 開催

- 9) 坂本雄哉、尾之上さくら、川原一芳、松下健二、多田浩之

*P. gingivalis* ならびに *F. nucleatum* LPS は *E. coli* LPS によるヒト単球の IL-6 産生を増強する.

第 94 回日本細菌学会総会, 2021 年 3 月 23 日～25 日, Web 開催

- 10) 大沢啓、尾之上さくら、川原一芳、松下健二、多田浩之

ヤマブシタケエタノール抽出物によるエンドトキシン中和作用.

第 94 回日本細菌学会総会, 2021 年 3 月 23 日～25 日, Web 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