

口腔の老化制御を基盤とした新しい口腔機能の維持・向上法の開発（21-6）

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

口腔の老化に伴う咀嚼機能や摂食・嚥下機能の低下は栄養障害や転倒リスクの増加に繋がるため、全身のフレイルに多大な影響を及ぼす。したがって、口腔の老化を制御し口腔機能を維持あるいは回復することは、高齢者の健康を増進し健康寿命を延伸するための重要な方策となりえる。歯の喪失は咀嚼機能低下の最大の要因であり、また歯周病は歯を喪失する最大の原因である。したがって、口腔機能の維持には歯周病対策が必須となる。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）。一方、老化による唾液分泌の低下は、咀嚼・摂食・嚥下困難を引き起こすとともに、う蝕、歯周病、口腔カンジダ症や誤嚥性肺炎等の発症や増悪をきたす。本研究では、歯周組織および唾液腺の老化が歯周病および口腔乾燥症の病態に及ぼす影響を明らかにする。加えて、咀嚼機能低下が脳機能に及ぼす影響をマウスモデルで解析し、最終的にはそれらの制御を基盤とした、新しい口腔機能の維持・向上法の開発を目指し、研究をおこなった。本年度は以下のような成果を得られた。＜歯周病＞に関しては歯周病菌 *P.gingivalis* 感染老齢マウスにおいて Claudin-1 と Claudin-2 発現の増加とともに、口腔および腸内細菌叢の変動が観察された。また、歯肉細胞培養系において *P.gingivalis* LPS による細胞老化誘導が観察された。加えて、*P.gingivalis* gingipain が PAI-1 を強力に分解し、創傷治癒を遅延させる可能性が示唆された。さらに、糖アルコールの一種であるエリスリトールとソルビトールが過酸化水素や *P.gingivalis* LPS による歯肉線維芽細胞の細胞老化を抑制することが明らかとなった。＜口腔乾燥症＞については、老齢マウス唾液腺上皮細胞において VCAM-1 の発現上昇を観察した。また、唾液腺上皮細胞における ACE2 発現を AMPK 活性化により抑制出来る事を見出した。＜咀嚼機能低下＞に関しては、アルツハイマー病モデルマウス（APPKI マウス）の上顎両側第一臼歯を抜歯することにより、認知機能の低下、夜間の活動性の亢進および情動行動の賦活化が観察された。

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 副部長

山田 匡恵 国立長寿医療研究センター 外来研究員

古市 保志 北海道医療大学
多田 浩之 東北大学

教授
講師

A. 研究目的

口腔の老化に伴う咀嚼機能や摂食・嚥下機能の低下は栄養障害や転倒リスクの増加に繋がるため、全身のフレイルに多大な影響を及ぼす。したがって、口腔の老化を制御し口腔機能を維持あるいは回復することは、高齢者の健康を増進し健康寿命を延伸するための重要な方策となりえる。歯の喪失は咀嚼機能低下の最大の要因であり、また歯周病は歯を喪失する最大の原因である。したがって、口腔機能の維持には歯周病対策が必須となる。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）。一方、老化による唾液分泌の低下は、咀嚼・摂食・嚥下困難を引き起こすとともに、う蝕、歯周病、口腔カンジダ症や誤嚥性肺炎等の発症や増悪をきたす。本研究では、歯周組織および唾液腺の老化が歯周病および口腔乾燥症の病態に及ぼす影響を明らかにするとともに、それらの老化制御を基盤とした、新しい口腔機能の維持・向上法の開発を目指す。加えて、咀嚼機能低下が脳機能に及ぼす影響をマウスモデルで解析し、最終的にはそれらの制御を基盤とした、新しい口腔機能の維持・向上法の開発を目指す。

B. 研究方法

1. 歯周病関連

1) 老齢マウスへの *P.gingivalis* 経口投与による歯周組織と口腔細菌叢の変化の解析

4 週齢（若齢）および 76 週齢（加齢）の C57BL/6J マウス口腔内に *P.gingivalis* ATCC 33277 生菌を 2%カルボキシメチルセルロース (CMC) と共に 1×10^9 CFU/ml、週 3 回、5 週間投与した。最終投与から 30 日後にマウスを屠殺し、口腔スワブ、唾液、腸内便、歯肉および下顎骨を採取した。

2) 歯周組織の分析

摘出した下顎骨を中性ホルマリン固定、30%過酸化水素でさらに 24 時間処理し歯肉組織の付着を除去したのち、0.1%メチレンブルーで染色後、顕微鏡で歯槽骨吸収を観察した。また、歯肉からトータル RNA を抽出し real-time RCR を行った。加えて、歯肉よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを行った。

3) 免疫染色

歯肉切片を Claudin-1、Claudin-2、E-cadherin、及び Connexin に対するそれぞれの抗体で免疫染色を行なった。

4) 口腔および腸内マイクロバイオームのメタゲノム解析

口腔粘膜より細菌を採集後、16srRNA の V3-V4 領域を PCR で増幅、イルミナ次世代シーケンサーを使って細菌叢のメタゲノム解析を行った。

- 5) 老齢マウスの歯周組織および老化誘導歯肉線維芽細胞における分子発現の検討
20 月齢♂C57/B6N マウス歯肉における老化関連因子、細胞接着因子、炎症関連因子等の発現プロファイルを 10 週齢の同マウスのそれと比較検討した。また、*P.gingivalis* LPS あるいは過酸化水素で刺激したヒト歯肉線維芽細胞における細胞老化の性状を *in vitro* において解析した。
- 6) 糖アルコールによる老化制御の可能性の検討
老化を誘導したヒト歯肉線維芽細胞培養系に各種濃度のエリスリトールおよびソルビトールを添加し、1 日～3 日間培養した。老化関連分子および炎症関連分子の発現の変化を検討した。
- 7) *P.gingivalis* が創傷治癒に及ぼす影響の解析
歯周病原性細菌: *P. gingivalis* 野生型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、血管内皮細胞に感染させた。ヒト血管内皮細胞:ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC, Lonza)および BBB の主構造を担うヒト脳毛細血管内皮細胞株 (hCMEC/D3, Millipore)は EBM-2 で継代培養し、実験に供試した。Wound healing アッセイ:培養により単層を形成した HUVEC ないし hCMEC/D3 をマイクロチップの擦過により機械的に創傷し、細胞遊走による創傷面積の減少度を経時的に観察した。

2. 口腔乾燥症関連

- 1) 若齢 (約 10 週齢) および老齢 (約 24 か月齢) マウス唾液腺から Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) を上皮マーカーとして、Magnetic cell sorting 法を用い上皮細胞を単離した。それら細胞の遺伝子発現を real-time PCR 法で解析した。
- 2) ヒト由来の唾液腺上皮細胞株 (A253)、口腔扁平上皮細胞株(HSC-2)、不死化歯肉上皮細胞 (OBA-9)、歯肉上皮細胞 (HGK)、口腔粘膜上皮細胞 (HOK) を用いて、遺伝子発現を real-time PCR 法、タンパク発現を western blot 法により解析した。AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMPK) activator として、AICAR 及びメトホルミンを使用した。

3. 咀嚼機能低下関連

- 1) 臼歯喪失が APPKI マウスに及ぼす影響の解析
ヒト変異型 A β ペプチドを持つ App^{NL-G-F} マウス (6 月齢♂) の両側上顎第一臼歯を抜去した。3 ヶ月後に Y 迷路試験、ロータロッド試験および攻撃性応答試験をおこなった。対照には、非抜歯の同月齢 App^{NL-G-F} マウスおよび非抜歯 18 月齢 C57BL/6J マウスを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究での動物実験に関しては、「国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程」を遵

守し、倫理面においては「国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会」の承認を既に得ている。また、一部の動物実験は北海道医療大学歯学部研究倫理委員会に承認を得て、同大の動物実験施設で実施された。

C. 研究結果

1. 歯周病関連

1) 老齢マウスの歯周組織における各種因子の比較

若齢マウスと比較し、老齢マウスでは老化関連マーカーp16 および p21 の上昇が mRNA およびタンパクレベルで確認された。また、炎症関連 SASP 因子である IL-1 β 、TNF α の著しい発現増加が見られた。また、コラーゲン 1a1、4a1 などといった基底膜を構成する分子の発現が低下していた。

2) *P.gingivalis* LPS による歯周線維芽細胞の細胞老化の検討

歯周病菌である *P.gingivalis* LPS を培養ヒト歯肉線維芽細胞に 100mg/ml 添加 24 時間後に老化マーカーの SA- β -gal の増加が観察された。SASP 因子の増加、I 型コラーゲン及びIV型コラーゲンの低下をそれぞれ確認した。

3) LPS 刺激により誘導される歯肉線維芽細胞の細胞老化は、エリスリトール及びソルビトールの添加により著しく抑制された。LPS 刺激による IL-1 β 、TNF α の発現増強も糖アルコール添加により抑制された。一方で、LPS 刺激による I 型コラーゲン及びIV型コラーゲン発現の減弱も、糖アルコール添加により回復した。

4) 歯周炎モデル加齢マウスにおける口腔内バリア因子の変化と口腔のマイクロバイオーーム変化

歯槽骨吸収量の定量的解析により、*P.gingivalis* 感染マウスの若齢群および加齢群は、コントロールマウス群と比較して、いずれも重度の歯槽骨量の減少が認められた。Claudin-1 と Claudin-2 の mRNA の発現は、*P.gingivalis* 感染老齢マウスでコントロールマウスに比べて有意に高かった。一方、E-cadherin の mRNA 発現は、*P.gingivalis* 感染群がコントロール群に比べて有意に低かった。ウェスタンブロッティングと免疫染色の結果は、mRNA の発現パターンと一致していた。*P.gingivalis* の経口投与は、若齢、加齢を問わず、口腔内および腸内のマイクロバイオーームに有意な影響を与えた。口腔内細菌叢は、*P.gingivalis* を投与した若齢マウスと加齢マウスの間で、非投与群と比較して α 多様性 (Shanon index) が有意に変化していた。また、*P.gingivalis* を投与した加齢群では、対照群と比較して β 多様性 (unweighted UniFrac) に有意な変化が見られた。

5) *P.gingivalis* が創傷治癒に及ぼす影響

HUVEC に *P.gingivalis* 生菌を感染させると、PAI-1 産生は著明に低下した。同様に hCMEC/D3 細胞の PAI-1 産生も *P.gingivalis* 感染により著明に低下した。*P.gingivalis* による同細胞の PAI-1 減少は、生菌のみならず細菌から分泌される細胞外小胞や死菌で

もみられた。ジンジパイン阻害剤で処理した *P.gingivalis* は、無処理の生菌と同程度に PAI-HUVED における PAI-1 レベルを低下させた。一方、リジン特異的ジンジパイン (Kgp) を欠損する *P.gingivalis* 株の感染では、HUVEC からの PAI-1 減少は生じなかった。さらに、同菌より精製した Kgp はヒトリコンビナント PAI-1 を分解したことから、*P.gingivalis* が産生する Kgp が PAI-1 を分解することが明らかとなった。さらに、wound healing アッセイの結果、HUVEC 単装培養系の閉鎖は *P.gingivalis* 野生型株の感染により有意に遅延したのに対して、ジンジパイン欠損株の感染では遅延は起きなかった。さらに精製 Kgp は同細胞の創傷治癒を遅延した。

2. 口腔乾燥症関連

- 1) リンパ球の接着を促す膜タンパクである vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) の遺伝子発現が老齢マウス由来上皮細胞で有意に上昇していた。唾液腺上皮細胞における VCAM-1 発現上昇は、唾液腺にリンパ球浸潤を伴い、ドライマウスを主症状とする自己免疫疾患 (シェーグレン症候群) においても報告されており、加齢・自己免疫疾患に起因するドライマウスに共通した基盤病態が存在する可能性が示唆された。
- 2) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) は、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) が宿主細胞へ感染する際に受容体として機能する事が知られている。これまで顎顔面領域組織における ACE2 発現は、主に網羅的遺伝子発現解析や免疫組織化学染色法により検討されてきたが、近年の研究結果から、ACE2 の分子量がその機能を左右する事が明らかになっている。本研究結果から、約 120kDa の ACE2 発現は A253 でのみ確認され、その他供試した細胞ではほぼ検出されなかった。A253 の ACE2 遺伝子発現レベルは他の口腔由来細胞と比較し、高い傾向を示した。細胞エネルギーの恒常性維持における主要な制御因子として重要な役割を持つ AMPK を活性化させる目的で AICAR 及びメトホルミン処理すると、A253 において ACE2 発現が濃度依存的に抑制された。

3. 咀嚼機能低下関連

APPKI マウスの上顎第一臼歯の抜歯を行い、3ヶ月間の飼育の間、各種計測及び行動実験を行なった。抜歯したマウスの3ヶ月後の体重は非抜歯群と差はなく、また、血清中のグルコースの濃度も両マウス間で違いはなかった。次に、Y迷路実験、RotaRod 試験、および攻撃行動実験をおこなった。Y迷路実験の結果、抜歯した APPKI マウスは、非抜歯の APPKI マウスに比べ Alteration rate の低下が顕著に見られ、著しい認知機能の低下が確認された。

RotaRod 試験の結果、抜歯 APPKI マウスは運動平衡性の低下が観察された。さらに、攻撃行動実験の結果、抜歯 APPKI マウスでは、著しい攻撃性の増加が認められた。

次に、海馬における遺伝子発現の変化について PCR および免疫染色にて検討した。そ

の結果、抜歯 APPKI マウスの海馬では、アストロサイトの老化マーカーである GFAP は抜歯により著しく上昇し、神経栄養因子である BDNF は減少、ミクログリアマーカー Iba1 は増加、神経細胞のマーカー NeuN は減少、神経細胞の活動性を示す c-Fos の減少等が認められた。加えて、攻撃性に関与する因子である MAOA, CDH13 の海馬における著しい発現増加を確認した。

D. 考察と結論

<考察>

1. 歯周病関連

本研究ではまず、自然老化した老齢マウスの歯肉組織と初代培養した歯肉細胞における加齢変化を細胞老化の観点から解析した。本研究の結果から、老齢マウスの歯周組織で老化マーカーの増加や炎症マーカーの増加が認められるとともに、コラーゲンの発現低下が観察された。これらの変化は、炎症が起きやすく創傷治癒が遅れやすい要因となる可能性がある。また、歯周病菌の LPS で老化マーカーの更新が認められたことは、歯周病菌の慢性的な曝露が、歯肉の老化と炎症増悪の要因となる可能性が改めて示された。このことは、プラークコントロールの重要性の根拠となり得る。一方、糖アルコールが細胞老化を抑制することを世界で初めて明らかにした。糖アルコールは代用甘味料としてすでに用いられている食品であり、安全性も十分担保されている。加えて、虫歯菌である *Streptococcus mutans* の活性を抑えることで、虫歯予防の効果も期待できる。今後、マウスにおける有効性を確認して、新しい口腔老化予防法の開発に繋げていきたいと考えている。一方、*P.gingivalis* の感染は上皮バリアの機能を低下させるとともに、PAI-1 などの創傷治癒に関連する分子を分解することで、上皮や血管内皮の脆弱性を高めることが明らかとなった。*P.gingivalis* の制御重要性が改めて確認された。

2. 口腔乾燥症関連

本研究により、加齢・自己免疫疾患に起因するドライマウスに共通した病態基盤として、唾液腺上皮の細胞老化の関与を明らかにする事が出来れば、老化細胞をターゲットにした新しい口腔乾燥症の予防・治療法の確立に繋がると考えられる。さらに、唾液腺は SARS-CoV-2 のリザーバーとして機能している事が知られており、AMPK シグナルによる ACE2 発現調節メカニズムを明らかにする事で、全身状態が唾液腺における SARS-CoV-2 感染に重要な役割を担っているという情報を発信できると考えられる。

3. 咀嚼機能低下関連

本研究の結果、臼歯を欠損した *App^{NL-GF}* マウスは、認知機能や平衡感覚が著しく失われるだけでなく、行動レベル、分子レベルの両方で明らかに攻撃性が向上していることが明らかとなった。認知機能が低下した患者は攻撃的になることが知られているが、これはすべての認知症患者に見られる症状ではない。AD 患者の 90%以上が、焦燥感、攻撃性、過敏性、抑制、不安、抑うつ、無気力、妄想、幻覚などの著しい認知症行動・心理症状 (BPSD) を

呈し、攻撃性の頻度は13%から50.4%であり、認知機能の低下の程度が高いほどその割合は高くなる。今回の研究結果から、抜歯 APPKI マウスの海馬において Cadherin-13 (CDH-13) および MAOA の発現増加が確認された。CDH-13 はカルシウム依存性の細胞接着分子で、注意欠陥/多動性障害 (ADHD)、自閉症スペクトラム障害 (ASD) などの神経発達障害や精神疾患、大うつ病の危険因子として報告されている (Özaslan A, J Mol Neurosci, 2021)。CDH-13 が海馬における抑制機能の重要な調節因子であることが知られている。一方、生体モノアミンである 5-hydroxytryptamine (5-HT) またはセロトニンは、神経伝達物質および神経調節物質として作用し、認知機能の低下や他の複数の BPSD と関連している。また、セロトニンは攻撃性の制御に強く関与している。MAOA はセロトニンの代謝に重要な酵素である。したがって、MAOA の発現変化はセロトニン代謝に影響を及ぼすことで、マウスの攻撃性を高めた可能性がある。

咀嚼刺激は三叉神経を介して脳幹に入力し、そこから脳のさまざまな領域に伝導されるものと考えられている。しかし、その刺激が海馬に伝達される経路についてはほとんど明らかにされていない。今後は、三叉神経から海馬への神経伝達経路についても電気生理学的に解析する予定である。一方、今回の研究結果から、三叉神経の賦活によって脳機能が賦活化される可能性も考えられた。そこで、今後はカプサイシンによる三叉神経賦活で、脳機能の回復が可能か否かについて検討していく予定である。

<結論>

本研究の結果から、歯周組織や唾液腺組織の老化が歯周疾患や唾液腺疾患の発症の要因となること、また歯周病菌 *P.gingivalis* やその病原因子が歯周組織老化を促進する可能性が示唆された。今後、糖アルコールによる新しい口腔ケア法の開発を進めていく。

歯の喪失が脳機能の低下やや行動異常を誘発することがマウスモデルで明らかになった。今後は、その機序をさらに解明するとともに、三叉神経賦活による脳の健康増進法の可能性を探る。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Giri S, Takada A, Paudel D, Yoshida K, Furukawa M, Kuramitsu Y, Matsushita K, Abiko Y, Furuichi Y

An in vitro senescence model of gingival epithelial cell induced by hydrogen peroxide treatment.

Odontology volume 110;44–53, 2021.

- 2) Song LT, Tada H, Nishioka T, Nemoto E, Imamura T, Potempa J, Li CY, Matsushita K, Sugawara S.
Porphyromonas gingivalis Gingipains-Mediated Degradation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Leads to Delayed Wound Healing Responses in Human Endothelial Cells.
J Innate Immun, 1-14, 2021.
- 3) Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, Ishimaru N, Matsushita K
The Priming Potential of Interferon Lambda-1 for Antiviral Defense in the Oral Mucosa.
Inflammation, 1-14, 2022.
2. 学会発表
- 1) 松下健二
シンポジウム 2 1 老いの入り “口” から認知症を読み解く
歯周病・口腔細菌と認知症の関連性の update.
第 21 回日本抗加齢医学会総会, 2021 年 6 月 27 日, 京都
- 2) 古川匡恵、四釜洋介、松下健二
軟食飼育が若齢マウスの視床下部および海馬に及ぼす影響。
第 63 回秋歯科基礎医学会学術大会、2021 年 10 月 9～11 日, web 開催
- 3) Giri S, Takada A, Nagano K, Paudel D, Yoshida K, Furukawa M, Kuramitsu Y, Matsushita K, Abiko Y, Furuichi Y
An in vitro senescence model of gingival epithelial cell induced by hydrogen peroxide treatment and reversal of senescence by fisetin.
第 63 回秋歯科基礎医学会学術大会、2021 年 10 月 9～11 日, web 開催
- 4) Tada H, Song L, Imamura T, Potempa J, Matsushita K, Sugawara S
Proteolysis of PAI-1 by *P. gingivalis* gingipains leading to delayed wound healing responses in endothelial cells.
16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 2021 年 10 月 12～15 日, 神戸
- 5) 四釜洋介、古川匡恵、松下健二
III 型 interferon(IFN)である interleukin(IL)-29 の口腔粘膜における抗ウイルス応答増強作用。
第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 16 日, 名古屋
- 6) 多田浩之、松下健二、根本英二
Porphyromonas gingivalis ジンジパインによる血管内皮細胞の PAI-1 分解と創傷治

癒遅延.

第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 16 日, 名古屋

- 7) 古川匡恵、田淵拓也、山田三良、四釜洋介、松下健二

歯周組織の細胞老化について ～若齢および老齢マウスと培養ヒト歯肉線維芽細胞
における検討～

第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 15～16 日, Web 開催

- 8) Giri1 S, Takada A, Paudel D, Yoshida K, Furukawa M, Kuramitsu Y, Matsushita
K, Abiko Y, Furuichi Y

Establishment of an in vitro senescence model of gingival epithelial cell induced
by hydrogen peroxide treatment and reversal of senescence by fisetin.

第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 15～16 日, web 開催

- 9) 萩原真、永野忠聖、松下健二

玄米中に含まれる成分の免疫力活性化機構の解析.

日本農芸化学会 2022 年度大会, 2022 年 3 月 15 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