

長寿医療研究開発費 平成30年度 総括研究報告

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

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、歯肉上皮細胞培養系において粘膜バリアの低下が誘導された。さらに、口腔上皮細胞が発現する IL-29 受容体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と考えられる。また、歯周病・糖尿病・認知症の三者を結びつける重要な因子として IL-1 β を推定し、この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。

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

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（糖尿病および高脂血症等）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

1. 高齢マウスにおける粘膜バリア関連分子の発現動態

SPF および無菌老齢マウス（18 月齢）、SPF および無菌若齢マウス（8 週齢）の歯肉組織を採取した後、total RNA を採取し、microarray 解析を行った。また、同歯肉サンプルの組織切片を作成した後、各種抗体を用いて免疫染色を行なった。加えて、各マウスの血液を採取し、血液性状の解析を行った。

2. 歯周病原細菌による IL-31 発現誘導と粘膜バリア機能への影響

慢性歯周炎の主要な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の感染による、肥満細胞からのインターロイキン-31 (IL-31) 産生機構について検討を行なった。具体的には、歯周病原性細菌: *P. gingivalis* W83 株、ATCC33277 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、ヒト歯肉上皮細胞株 HMC-1 細胞に添加した。その後、細胞および上清中の IL-31 発現レベルを ELISA および RT-PCR 法で解析した。加えて、同培養系における Claudin-1 の発現レベルを解析するとともに、上皮間透過性の変化をデキストランの透過を指標に検討した。肥満細胞欠損マウス (WBB6F1) を用い、*P. gingivalis* 感染による IL-31 発現動態を検討した。

3. 口腔粘膜上皮における IL-29 受容体発現とウイルス感染防御との関連

不死化歯肉上皮細胞 (OBA-9)、ヒト表皮初代上皮細胞 (HEK) およびヒト口腔粘膜切片を用いて、IL-10R2 および IL-29Ra mRNA 発現を Flow cytometry 法および *in situ* hybridization 法で解析した。また、IFN- β 発現等に対する IL-29 の効果を real-time PCR 法および ELISA で解析した。

4. IL-1 β 欠損マウスの作製

当センターの実験動物管理委員会で承認された動物実験計画を基に、モデルマウスの

交配ならびに解析を進める。特に、IL-1 β 欠損マウスの作製を進め、実験に供試出来るよう準備する。

(倫理面への配慮)

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。また、東北大学における動物実験の実施は、同大の動物実験等に関する規程により定める審査および承認を経て実施した。加えて、遺伝子組換動物の取扱および細胞への遺伝子導入が含まれる実験に関しては、国立大学法人東北大学遺伝子実験センター規程により定める委員会の審査および承認を受けた上で実施した。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. 高齢マウスにおける歯肉遺伝子発現の検討

SPFおよび無菌老齢マウス（18月齢）、SPFおよび無菌若齢マウス（8週齢）の歯肉組織を採取した後、total RNAを採取し、microarray解析を行った。その結果、老齢マウスにおいては若齢マウスと比較して、Ink4a mRNAの発現が著しく亢進していた。各種コラーゲンの発現は、加齢とともに減少すること、また無菌マウスにおいてその発現が小さくなる傾向があることが明らかとなった。また、SPF老齢マウスにおいて、SPF若齢と比較して免疫関連遺伝子の発現増強がみられた。一方、無菌マウスにおいては老齢、若齢にかかわらず、免疫関連遺伝子の発現が低下していた。炎症性サイトカインの発現においては、SPF老齢マウスが、他の3群のマウスと比べて強く発現する傾向がみられた。さらに、SPFおよび無菌の老齢マウスでは、若齢マウスと比べて、各種ケモカイン遺伝子の発現が著しく亢進していることが明らかとなった。

2. 歯周病原細菌によるIL-31発現誘導と粘膜バリア機能への影響

野生型マウスの口腔に*P. gingivalis*を感染させた結果、歯肉IL-31 mRNA発現が亢進したのに対して、肥満細胞を欠損する WBB6F1マウスでは同発現に変化はみられなかった。ヒトマスト細胞株HMC-1細胞に*P. gingivalis* W83株を感染させると、感染3時間後よりIL-31産生が認められ、24時間後には著明なIL-31が産生された。一方、ジンジパイン欠損*P. gingivalis* KDP136刺激では、肥満細胞からのIL-31産生は完全に消失した。また、*P. gingivalis*野生型株をジンジパイン阻害剤で前処理すると、肥満細胞からのIL-31産生が抑制された。ヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22細胞を*P. gingivalis*単独の培養上清で刺激すると claudin-1発現は亢進したのに対して、同細胞を肥満細胞と*P. gingivalis*を共培養した上清

で刺激すると claudin-1 発現は抑制された。この claudin-1 発現抑制作用は、肥満細胞と *P. gingivalis* を共培養した上清に IL-31 中和抗体を添加すると回復したことから、*P. gingivalis* 刺激により肥満細胞から産生された IL-31 は、歯肉上皮細胞の claudin-1 を抑制させることが明らかにされた。また、歯肉上皮細胞を肥満細胞と *P. gingivalis* の培養上清で処理すると上皮間のデキストラン透過量が増加した。一方、肥満細胞と *P. gingivalis* の培養上清に IL-31 中和抗体を添加するとデキストラン透過量の亢進が抑制された。以上の結果から、*P. gingivalis* 感染により肥満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機能を減弱させることが明らかとなった。

3. 口腔粘膜上皮における IL-29 受容体発現とウイルス感染との関連

Flow cytometry 法および *in situ* hybridization 法を用いた解析結果から、口腔粘膜上皮細胞に IL-28Ra が発現している事が明らかとなった。HGK において、IL-29 濃度および刺激時間を調整し解析したが、IL-6、IL-8、および IFN- β mRNA 発現レベルに有意な変化は認められなかった。HGK において、IL-29 前処理により 5'ppp-dsRNA 誘導性 IFN- β 産生は有意に増強された。

4. IL-1 β 欠損マウスの作製

歯周病において重要な役割を担っていることが示唆されている炎症性サイトカインである IL-1 β のノックアウトマウスの交配を進めた。当実験動物施設飼育室にて予定通りヘテロマウスからホモマウスを得ており、このまま実験に必要な n 数の確保、維持を進める。

D. 考察と結論

昨年までの研究結果から、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 の発現低下があることが明らかとなった。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可能性がある。今回、SPF の老齢マウスでは若齢の SPF マウスに比べ、免疫・炎症関連遺伝子および細菌毒素応答に関連した遺伝子 (TLR) などが強く誘導されていた。また、老化マウスでは、血液中の顆粒球の増加も観察された。一方、無菌の老齢マウスではそれらの発現は亢進していなかった。以上のことは、老化によって、口腔細菌等に生体が強く反応するようになったことが示唆されるとともに、その一因として粘膜上皮バリアの減弱が関与している可能性が考えられる。今後、その機序について検討していく予定である。老化に伴って各種コラーゲンの発現の減弱が見られたが、特に粘膜バリア形成に関係すると思われるタイプのコラーゲンの変化が著しかった。同コラーゲンの関連分子も同様に発現低下が見られることから、今後これらの分子についても詳細に検討する予定である。

歯周病原細菌の感染によりマスト細胞から産生された IL-31 は、タイトジャンクション構成分子である claudin-1 発現を抑制し、歯肉上皮バリア機能を減弱させることが明らかとなった。この歯肉粘膜バリアの破綻は、歯周炎の慢性化に関わる可能性が想定され、口腔

粘膜バリアの恒常性維持を目的とした歯周予防法の基礎的な知見になると捉えられる。歯周病における慢性炎症は歯の喪失の原因となることから、慢性炎症のコントロールを目的とした予防・治療法の開発は高齢社会である我が国に大きく貢献すると期待される。

ウイルス感染が原因となる口腔粘膜疾患はヘルペス性口内炎や扁平上皮癌等多数存在するが、それら疾患の予防法はほとんど確立されていないのが現状である。本研究により、低濃度の IL-29 (数 ng/ml) が口腔粘膜において免疫賦活能を有する事が証明できれば、副作用の少ない (それ自身が炎症惹起作用を有しない)、新しいウイルス疾患に対する予防法になると考えられ、その臨床応用へと展開できる可能性がある。

本研究の結果から、老化あるいは歯周病原細菌により口腔粘膜のバリア機能が減弱することが明らかになった。今後は、これらのバリア機能低下の機序を詳細に解析するとともに、その機能を回復・維持する創薬のスクリーニングも合わせて行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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, 2018.

2) 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.

2. 学会発表

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

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