

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09611

研究課題名(和文) 老化制御による歯周病・動脈硬化症関連性への分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular basis for the relationship between periodontal disease and atherosclerosis by controlling aging

研究代表者

吉成 伸夫 (Yoshinari, Nobuo)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20231699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、老化制御による歯周病・動脈硬化症の関連性解明と抗老化療法の開発である。若齢および高齢マウスに実験的歯周炎または動脈硬化症を誘導し、DasatinibとQuercetin投与による老化細胞除去を行い、各群の歯周炎および動脈硬化症悪化状態、老化細胞の除去程度を評価した。その結果、抗老化療法を施した高齢マウス群において、動脈硬化症部位の縮小および歯槽骨吸収量の減少を示し、抗老化作用が確認された。一方、若齢および高齢の対照マウス群では特異な所見は認められなかった。以上より、老化細胞除去薬による抗老化作用は、慢性炎症性疾患に対して有効な治療法になりうる可能性のあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、老化が歯周病や動脈硬化症などの慢性炎症性疾患に対して影響を及ぼしていることが立証され、両疾患の相互関係の解明に寄与できた。同時に、老化制御が、慢性炎症性疾患の発症・進行を抑制し、寿命を延伸するという抗老化細胞療法の開発という新たな研究分野の展開にもつながると考えられた。本研究のさらなる発展は、超高齢社会における健康寿命の延伸に貢献する鍵を握っている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of study was to elucidate the relationship between periodontitis and arteriosclerosis by controlling aging and to develop anti-aging therapy. The young or old mice were induced experimental periodontitis or arteriosclerosis, and aging cells were removed by administration of senolytic drugs as Dasatinib and Quercetin. As a result, the elderly mouse group treated with anti-aging therapy, the arteriosclerotic lesion was reduced and the alveolar bone resorption was decreased. Therefore, the anti-aging effect was confirmed. On the other hand, the young mouse group was not observed the significant findings. From the above, it was suggested that the anti-aging effect of senolytic drugs could become an effective treatment for chronic inflammation diseases.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 動脈硬化症 老化制御 分子基盤

1. 研究開始当初の背景

わが国の超高齢社会の進行は、慢性の全身疾患に罹患した歯科疾患患者の増加をきたし、今や歯科の研究課題が口腔領域にとどまることは許されない。歯周病領域では、心臓血管疾患 (Cardiovascular Disease; CVD)、2型糖尿病、骨粗鬆症、慢性閉塞性肺炎との関係を検討した疫学研究結果より、これらの疾病リスクを増す疾病相関が明らかである。この中で、CVDは心臓血管系に影響を与える多くの疾患の総称であるが、その大部分の原因は、動脈壁が肥厚、弾性低下、硬化する動脈硬化症である。申請者は、遺伝的高脂血症モデルのApoE^(-/-)マウスに歯周病原細菌である*Porphyromonas gingivalis*を感染させることにより、動脈硬化部位の形成促進を確認した(Champagne et al., J Periodont Res, 2009)。その後、ApoE^(-/-)マウスに歯周病局所で産生される炎症性サイトカイン(IL-6)刺激を与え、実験的歯周炎誘導性動脈硬化症悪化モデルを作製した。その結果、歯周炎誘導マウスの肝臓で、急性炎症マーカーであるSAAのmRNA発現、および末梢血においてSAAタンパク質が上昇し、動脈硬化部位が増大することを見出した。さらに、SAA刺激により、培養血管内皮細胞で動脈硬化症の発症に関わる接着分子群が発現上昇し、その受容体はTLR2であることを明らかにした(10th APSP Meeting, 2013)。しかし、歯周病と動脈硬化症の共通かつ独立した危険因子である老化が、両疾患の関連性に対する交絡因子として影響していることは明らかである。よって、老化の影響を検討することが歯周病と動脈硬化症の関連機序を解明するうえで必須である。

歯周病は、動脈硬化症などの全身疾患との関連を検討した疫学研究結果より、これらの疾病リスクを高めることが多数報告されている(Bartold MP et al., Curr Oral Health Rep, 2017)。その関連機序は、プラーク中の歯周病原細菌が歯周ポケット上皮より組織内に侵入し、全身循環を介して遠隔組織に影響すること、歯周炎組織で産生された炎症性サイトカインが全身循環を經由して血管、脂肪組織、肝臓などに持続的かつ軽微な炎症を起こすと考えられてきた(Epstein SE et al., Circulation, 1999)。しかし、歯周病が全身疾患の発症・進行に関与する機序についてはいずれの説も決定的ではなく、依然として不明な点が多い。申請者は、歯周病から肝臓を通して急性反応性タンパクが血管内皮細胞を刺激することにより動脈硬化症が悪化することを明らかにしたが(98th AAP Meeting, 2012)、両疾患に共通の独立した危険因子である老化の影響は解明できていなかった。動脈硬化症の最大の危険因子は生物学的老化とされており(Wang JC et al., Circ Res, 2012)、その罹患率は加齢と共に増加し、80歳以上の日本人高齢者では癌以上の割合を示している。よって、本研究で老化因子を制御することにより、従来の仮説では十分に説明することができなかった歯周病と動脈硬化症の関連の因果関係を説明するのに合理的な生物学的分子基盤を提供できる。

現在、高齢者の健康寿命を延伸させる観点からも、老化機序の解明が社会的に最重要課題となっている。その中で、老化した細胞が老化関連疾患の病因となるという「細胞老化仮説」が分子レベルで検討されている。細胞老化とは、細胞分裂能の限界を意味し、形態、遺伝子発現、細胞機能の変化を伴う。そして、老化細胞が個体年齢や種の寿命に相関することから、細胞老化のレベルと個体老化の密接な関係が示唆されている(Minamino T et al., Circ Res, 2007)。また、老化細胞は、様々な炎症性サイトカイン、ケモカイン、細胞外マトリックス分解酵素など炎症作用のあるタンパク質を分泌する。近年、これらのタンパク質はSenescence-associated secretory phenotype(SASP)と呼ばれ、主にNF- κ Bが活性化されることによりIL-6、IL-8、MCP-1、PAI-1、MMP等が分泌される(Rodier F et al., J Cell Biol, 2011)。各SASP因子は、細胞老化促進、増殖促進など機能が多岐にわたり、相反する機能もある。また、受容細胞の種類によっても作用が変化するため、in vivoにおいて、老化細胞がSASPを通してどのような効果を周辺細胞または個体に与えているかは不明である(Stout MB., Physiology, 2017)。さらに、同様のタンパク質が分泌される歯周病と動脈硬化症が老化の要因となっている可能性も考えられる。そこで本研究では、老化制御による歯周病・動脈硬化症の関連性解明と抗老化療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

加齢に伴い歯周病や動脈硬化症の罹患率が増加することが、CVD発症の基盤病態となっている。両疾患は、多くの高齢者に共通に認められることから、脂質異常症や糖尿病等の危険因子に加え、加齢に伴う老化という特有の因子が大いに関与すると推測できる。そこで、老化細胞を制御し、SASP因子の変動から病態を比較検討することにより、老化因子の重要性が解明され、抗老化細胞療法による新たな歯周病や心血管治療の開発が期待されると考えた。本研究の目的は、老化の歯周病と動脈硬化症悪化に対する影響、および老化因子がない状態での歯周病と動脈硬化症の関連性を解明することであり、抗老化療法の開発を目指すことである。本研究は、交絡因子(老化)の存在下で歯周病と動脈硬化症の関連を研究していた従来の方法から、薬理的に老化の影響を除去して歯周病と動脈硬化症の関係を評価する「重回帰分析」的手法とした。本研究により、老化の慢性炎症性疾患(歯周病、動脈硬化症)に対する影響程度が立証され、両疾患の因果関係が明らかにできる。同時に、老化制御が、慢性炎症性疾患の発症・進行を抑制し、寿命を延伸するという抗老化細胞療法の開発という新たな研究分野の展開にもつながり、超高齢社会における健康寿命の延伸に貢献する鍵となると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、以下のことについて検討・解明した。

(1)若齢・高齢，歯周病・非歯周病，動脈硬化症・非動脈硬化症のマウスにおける老化細胞の検出

年齢，病態における老化細胞の局在程度を検索するために，実験的歯周炎，動脈硬化病変部位のp16遺伝子発現，senescence-associated β -galactosidase(SA- β -gal)活性を組織学的に，老化マーカー(p16, p21, p53)，SASP因子(IL-6, IL-8, MCP-1, PAI-1, MMP)のmRNA発現をreal-time PCR法，タンパク質をELISA法にて検出した(Farr JN., Nat Med, 2017)。若齢時として，3ヶ月齢のApoE^(-/-)，WT(C57BL/6)マウスを実験に供した。両マウスを，上顎第2臼歯の周囲に6-0絹糸結紮による歯周炎発症群，歯周炎コントロール群，また，歯周炎からの影響による動脈硬化症悪化モデルとしてIL-6，PBS注入群に分け，下顎臼歯部の歯周組織に注入した。動物は4ヶ月齢時に安楽死させ，各群の歯周組織，心臓，大動脈のパラフィン包埋切片を作製，p16，SA- β -galを染色し，老化細胞の局在，数を特定した。また，反対側にはマイクロCT撮影を行い，歯槽骨の吸収量を測定した。大動脈の内腔をen-faceにしてoil-red染色を行い，動脈硬化症の発症および進行状態を解析した。前述部位をホモジナイズし，老化マーカー，SASP因子をreal-time PCR法，ELISA法にて検出した。また高齢時として，同様の実験を開始時より飼育した13ヶ月齢のApoE^(-/-)，WTマウスに行った。

(2)老化細胞除去による歯周病，動脈硬化症局所の病態改善の検討

老化制御による歯周病と動脈硬化症の発症，進行抑制効果，および歯周病から動脈硬化症悪化機序を評価するために，13ヶ月齢のApoE^(-/-)，WTマウスに(1)と同様の方法で実験的歯周炎発症，動脈硬化症を悪化させ，同時にDasatinib(チロシンキナーゼ阻害薬)とQuercetin(フラボノイド)を経口投与し，老化細胞を除去した(Zhu et al., Aging Cell, 2015)。動物は17ヶ月で安楽死させ，各群の歯周炎の状態，動脈硬化悪化状態，老化細胞の除去程度を組織学的に観察し，老化マーカー，SASP因子をreal-time PCR法，ELISA法にて検出した。(1)の結果と比較検討し，両疾患の老化への影響も検討した。

4. 研究成果

若齢マウスに比較して，高齢マウスは大動脈内腔の脂肪沈着量が有意に増加した。また，マイクロCT所見では，若齢マウスに比較して，高齢マウスは歯槽骨の吸収量が有意に増加した。これらの結果により，老化は動脈硬化症や歯周病の病態悪化に影響を及ぼすリスク因子であることが示された。高齢マウスにおいて，老化細胞除去薬(Dasatinib, Quercetin)を投与した群は，コントロール群に比較して大動脈内腔の脂肪沈着量が有意に減少し，動脈硬化病変部位が明らかに縮小していた。また，高齢マウスにおいて，老化細胞除去薬を投与した群は，コントロール群に比較して，歯槽骨の吸収量が有意に減少していた(図1)。これらの知見は，DasatinibとQuercetinの投与により老化細胞が除去され，老化細胞が分泌するSenescence-associated secretory phenotype(SASP)が減少し，炎症反応が抑制されたことにより生じた結果であることが推察される。老化細胞除去薬の投与により歯周病および動脈硬化症の病態が改善したことから，老化細胞除去薬による抗老化作用は，慢性炎症を基盤とする疾患に対しても有効な治療法であることが示唆された。

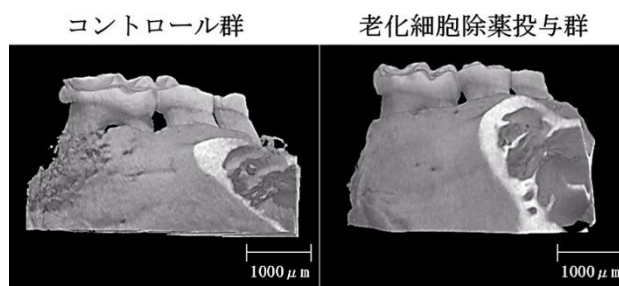


図1 歯槽骨に対する老化細胞除去薬の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dewake Nanae, Ishioka Yasuaki, Uchida Keiichi, Taguchi Akira, Higashi Yukihito, Yoshida Akihiro, Yoshinari Nobuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Association between Carotid Artery Calcification and Periodontal Disease Progression in Japanese Men and Women: A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 3365 ~ 3365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9103365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kohinata Kiyomi, Ishioka Yasuaki, Yamada Shinichiro, Sugino Noriyuki, Kuroiwa Hiroko, Yoshinari Nobuo, Asano Akira, Muneyasu Mitsuji, Uchida Keiichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Study on the Carotid Artery Calcification Appearing on the Panoramic Radiography and Computed Tomography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 93 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.28.93	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Saleem Murtaza, Yoshinari Nobuo, Nakamura Suguru, Sumi Yasunori, Iwai Yukiko, Ozaki Yuki, Masuda Yuji, Uchida Keiichi, Taguchi Akira	4. 巻 61
2. 論文標題 Improvement of salivary flow and oral wetness by a lip trainer device and sonic toothbrush in older Japanese men and women with dry mouth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 221 ~ 228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnurd.18-0012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉成伸夫
2. 発表標題 口腔ケアから口腔健康管理へ 介護予防としての高齢者への歯周治療の必要性と口腔健康管理の中での位置づけ
3. 学会等名 第30回日本老年歯科医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 卓, 吉成伸夫
2. 発表標題 歯周組織の状態とフレイル, ソーシャルキャピタルの関連性に関する疫学研究
3. 学会等名 第30回日本老年歯科医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内川竜太郎, 安西正明, 石田直之, 宮國 茜, 中村圭吾, 岩崎由紀子, 森 啓, 吉成伸夫, 富田美穂子, 山本昭夫
2. 発表標題 20歯以上保有している高齢者の要因
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出分菜々衣, 石岡康明, 田口 明, 吉田明弘, 吉成伸夫
2. 発表標題 総頸動脈分岐部石灰化の有無と歯周病による歯槽骨吸収との関連についての臨床的研究～医科歯科連携における画像診断利用の有用性について～
3. 学会等名 第35回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 出分菜々衣, 石岡康明, 田口 明, 吉田明弘, 吉成伸夫
2. 発表標題 歯槽骨吸収と総頸動脈分岐部石灰化との関連について
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾崎 友輝 (Ozaki Yuki) (10802902)	松本歯科大学・歯学部・助教 (33602)	
研究分担者	石原 裕一 (Ishihara Yuichi) (50261011)	公益財団法人ライオン歯科衛生研究所(研究部研究開発室)・研究部研究開発室・研究開発室長 (82681)	
研究分担者	田口 明 (Taguchi Akira) (70243582)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	宇田川 信之 (Udagawa Nobuyuki) (70245801)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------