

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17059

研究課題名(和文) 歯周病を起点とした動脈硬化悪化機序に対する老化関連遺伝子の解析及び細胞老化の抑制

研究課題名(英文) Analysis of aging-related genes and suppression of cell aging associated with exacerbated arteriosclerosis by periodontitis.

研究代表者

中村 卓 (Nakamura, Suguru)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50756393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、(1)老化関連疾患である歯周病と動脈硬化症の基盤病態に關与する因子を同定すること、(2)細胞老化の抑制は、歯周病誘導性の動脈硬化症を防止できるか検討することを目的とした。若齢者または高齢者由来のヒト大動脈血管内皮細胞(HAECs)を継代培養して細胞老化を誘導し、歯周病原菌であるP.g菌由来のLPSを添加して、HAECsに及ぼす影響を検討した。

その結果、IL-6の発現量が有意に増加したが、一方で老化関連因子の発現量に有意な差はなかった。以上より、歯周病と動脈硬化症の基盤病態においてIL-6が關与し、老化が両疾患を悪化させる機序において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国は超高齢社会であり、高齢者の健康寿命をいかに延長できるか問題となっており、生物学的老化メカニズムの解明が最重要課題となっている。加齢はCVDに対する最も有力な危険因子であるが、その原因疾患である動脈硬化症と加齢を結びつけるメカニズムはまだ十分に解明されていない。また、加齢は歯周病の発症と進行においても關与することが報告されている。

本研究により、老化が歯周病および動脈硬化症を悪化させる機序において、IL-6が關与することが示唆された。本研究のさらなる発展は、老化関連疾患に対する新たな治療方法を確立できる可能性を秘めていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of study was to identify the factors related underlying pathology of periodontitis and arteriosclerosis, and to examine whether suppression of cell aging prevents periodontitis-induced arteriosclerosis. Human aortic endothelial cells (HAECs) derived from young or elderly people were subcultured to induce cellular senescence, and lipopolysaccharide derived from porphyromonas gingivalis as periodontal pathogen was added to investigate the effect on HAECs.

As a result, the expression level of IL-6 increased significantly, but on the other hand, there was no significant difference in the expression level of aging-related factors. From the above, it was shown that IL-6 is involved in the underlying pathology of periodontal disease and arteriosclerosis, and IL-6 may play an important role in the mechanism of exacerbating both diseases by aging.

研究分野：歯周病

キーワード：老化 歯周病 動脈硬化症 HAECs IL-6 SAA

### 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国では様々な要因により超高齢社会となっていることが大きな社会問題となっている。歯科界にとっても高齢者が増加することは、全身性の慢性疾患を持つ歯科疾患罹患者の増加を意味する。そこで、従来の口腔領域における研究を発展させ、全身的健康科学・生活科学を目指した研究を行っていく必要がある。歯周疾患は、CVD、糖尿病、細菌性肺炎、慢性閉塞性肺疾患、肥満等の生活習慣病のリスク因子として広く知られており、今後、これらの疾患との双方向的な関係メカニズムに関する研究が必要とされる。さらに疾病相関に基づく新たな治療法の創生が望まれる。その中でCVDは、高血圧症、不整脈、大動脈瘤、虚血性心疾患、脳梗塞などの心臓血管系に影響を与える多くの疾患の総称であり、死因第4位の脳血管疾患と合わせると死因第1位の悪性新生物に匹敵する死亡割合で、歯周病との関連性が特に重要である(厚生労働省:死因別死亡確率, 2016)。心臓血管疾患の本態は、動脈壁が肥厚することによる弾性の低下、あるいは硬化による動脈硬化性疾患に起因している。また、この病態は血栓症を引き起こし、遠隔部位に梗塞を起こすことがあるため、死因第4位の脳血管疾患も動脈硬化性疾患に起因していると言える。この動脈硬化性疾患の割合は加齢と共に増加し、80歳以上の高齢者では癌以上の割合を示している。このため、加齢によって起こる老化現象(生物学的老化)が動脈硬化症の進展に大きく寄与していると考えられている(Gando Y et al., Front Physiol, 2017)。

一方、歯周病も生活習慣病としての側面をもち、その発症率は加齢に伴い増加していく。また、全身への影響として、歯周病原細菌は血管の炎症を惹起するとともに、接着因子による血栓生成の危険性を増加させると報告され(Roth et al., J Thromb Haemost, 2006)、逆に、動脈硬化症は、歯周組織内の歯周病原細菌に対する抵抗力を減弱させ、歯周組織の再生力を低下させると報告されている(Okuda et al., J Clin Microbiol, 2001)。すなわち、両疾患には双方向的な関連が示唆される。現在まで、歯周病と動脈硬化性疾患発症の共通メカニズムとして、1)歯周病原細菌、あるいは細菌産生物による上皮、内皮細胞に対する直接的障害作用、2)細菌あるいは細菌産生物によるIL-6, TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカイン刺激による間接的障害作用、3)LPSやIL-6, TNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインの刺激により肝臓から産生されるC反応性タンパクや血清アミロイド

A(SAA)タンパク等の急性期タンパクによる間接的障害作用の3つの経路が可能性として挙げられている。申請者らはApoEノックアウト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、動脈硬化症形成促進を確認した(Champagne et al., J Periodont Res, 2009)。そのため、歯周病モデルマウス、高齢マウス共に老年性疾患である動脈硬化症が進行することに着目し、両モデルにおいて発現が増加する因子を検出するべく研究を行ってきた。すなわち、ApoEノックアウトマウスに歯周病原細菌が産生する炎症性サイトカイン(IL-6)刺激を与え、疑似的な歯周病を惹起させる歯周炎誘導性動脈硬化亢進モデルを作成した。その結果、歯周病が惹起されたApoEノックアウトマウスの肝臓組織のmRNAおよび抹消血タンパクにおいて急性炎症マーカーであるSAAが上昇し、動脈硬化部位が増大することを見出した。また、ApoEノックアウトマウスを生後5, 10, 15, 20ヵ月齢まで飼育した結果、加齢とともに肝臓組織のmRNA発現、および末梢タンパク質においてSAA量が上昇し、動脈硬化部位が増大することを見出した。さらに、申請者らは、血管内皮細胞においてSAAシグナルにより、動脈硬化発症に関わる接着分子群が発現上昇し、そのシグナルにはSAA受容体の1つであるTLR2の関与が大きいことを明らかにした。

そこで本研究課題では、継代培養により実験的に細胞老化を惹起した血管内皮細胞に対して、歯周病原細菌である*Porphyromonas gingivalis*由来のlipopolysaccharide(LPS)が及ぼす影響機序を検討することで、生物学的老化のメカニズムの詳細を明らかにすることを目指した。

### 2. 研究の目的

現在、我が国は超高齢社会となっており、高齢者の健康寿命をいかにして長期間持続させるかという社会的必要性から、生物学的老化メカニズムの解明が最重要課題となっている。加齢はCVDに対する最も有力な危険因子であるが、その原因疾患である動脈硬化症と加齢を結びつけるメカニズムはまだ十分に解明されていない。また、加齢が歯周病の発症と進行にも関与している可能性も考えられる。本研究により、歯周病を起点とした動脈硬化症悪化機序に対する老化の関与が立証され、歯周病の動脈硬化症の悪化に対する影響が明らかにできる。また、この研究方法を発展させることにより、歯周病治療による老化予防、さらには抗炎症薬による老化治療薬開発という新たな研究分野の発展にもつながると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1)歯周病誘導性に動脈硬化症が惹起されるメカニズムについて検討するために、若齢者または高齢者由来のヒト大動脈血管内皮細胞(HAECs)に対して血清アミロイドA(SAA, 2  $\mu$ g/ml)を添加し、10日または20日間培養を行った。培養細胞よりcDNAを精製し、老化関連因子(p16, p21, p53)および接着分子(ICAM-1, VCAM-1)の遺伝子発現をreal time PCR法にて定量し、コントロール群と比較した。

(2)老化が歯周病と動脈硬化症の悪化機序に及ぼす影響について検討するために、HAECsを継代培養することにより細胞老化を誘導し、歯周病原細菌である*Porphyromonas gingivalis*由来のLPSを添加して、HAECsに及ぼす影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1)の研究において、高齢者由来のHAECsでは、SAA添加培養群において接着分子の遺伝子発現量が有意に増加した。このことから、老化により血管内皮細胞はより炎症を起こしやすくなっていることが示唆され、歯周炎局所で産生されたIL-6によりSAAが増加し、SAA刺激がtoll-like receptor-2を介して血管内皮細胞の機能障害を惹起し、動脈壁へのマクロファージ浸潤を誘発して動脈硬化症を進行させることが示唆された。一方で、老化関連因子については有意な差は認められなかった。

(2)の研究において、継代培養により細胞老化を惹起したHAECsにLPSを添加すると、IL-6の発現量が有意に増加することが明らかとなった。一方で、老化関連因子の発現量に有意な差はなかった。

本研究結果より、歯周病と動脈硬化症の基盤病態においてIL-6が関与し、老化が両疾患を悪化させる機序において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 杉江美穂, 中村 卓, 小町谷美帆, 田口 明, 宇田川信之, 吉成伸夫	4. 巻 45
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 松本歯学	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

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/josnusd.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

1. 著者名 Nakamura Suguru, Shioya Koki, Hiraoka B. Yukihiro, Suzuki Nao, Hoshino Tomonori, Fujiwara Taku, Yoshinari Nobuo, Ansai Toshihiro, Yoshida Akihiro	4. 巻 164
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis hydrogen sulfide enhances methyl mercaptan-induced pathogenicity in mouse abscess formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 529~539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mic.0.000640	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 卓, 塩屋幸樹, 平岡行博, 谷口奈央, 吉成伸夫, 安細敏弘, 吉田明弘
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis のメチオニン- リアーゼは L-システインを基質とした硫化水素産生酵素の1つであり、同細菌が産生する硫化水素はマウスの膿瘍形成を促進する
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 卓, 塩屋幸樹, 平岡行博, 谷口奈央, 吉成伸夫, 安細敏弘, 吉田明弘
2. 発表標題 マウス膿瘍形成におけるPorphyromonas gingivalis の産生する硫化水素の役割
3. 学会等名 第14回JSP-JACP合同研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------