

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09982

研究課題名(和文) 老化因子除去による新規の歯周病治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel treatment for periodontal disease by removing aging factors

研究代表者

尾崎 友輝 (Ozaki, Yuki)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10802902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1)加齢により歯槽骨吸収が亢進する機序を解明すること、(2)老化細胞除去療法または老化細胞が産生するSASPを抑制することにより、歯周病と老化の関連性を解明すること及び新規治療法を確立することを目的とした。絹糸結紮による実験的歯周炎を誘導した18ヵ月齢の老化C57BL/6マウスに対して、4ヵ月間老化細胞除去薬を経口投与し、歯周炎及び老化状態が改善するかどうかを検討した。対照マウスと比較して、老化細胞除去薬を投与したマウスは歯槽骨吸収が抑制された。また、歯周組織と血清中にいくつかのSASPタンパク質発現を減少させた。以上より、老化細胞除去薬の投与は歯周炎の改善に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病治療における再生療法では、多数の薬剤が臨床応用されているが、抗炎症作用や骨形成を促進させる因子の開発は十分ではない。加齢により蓄積した老化細胞は種々の炎症性サイトカインを含むSASPを産生し、その結果骨量の減少をきたすことから、歯周病は加齢性疾患であることも明らかである。近年、加齢性疾患に対する治療として老化細胞除去療法が検討されているが、歯周病に対する有効性を示す報告はまだない。本研究結果は、実験的歯周炎を誘導した高齢マウスに対する老化細胞除去薬の有効性を証明した。本研究結果のさらなる発展により、超高齢社会である我が国において、加齢性疾患の新規の治療法の確立に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was (1)to elucidate the mechanism by which alveolar bone resorption is accelerated by aging, (2)to elucidate the relationship between periodontal disease and aging, and to establish a novel treatment method, by senolytic therapy or suppressing SASP produced from senescent cells. 18-month-old aged C57BL/6 mice induced with experimental periodontitis by silk ligation were orally administered a senolytic agent for 4 months to investigate whether periodontitis and senescence improved. Senolytic-treated mice had reduced alveolar bone resorption compared with control mice. It also decreased the expression of several SASP proteins in periodontal tissue and serum. These results indicate that administration of senolytic drugs is effective in improving periodontitis.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病 老化 SASP 慢性炎症 interleukin senolytics

1. 研究開始当初の背景

我が国は2010年に超高齢社会に突入し、高齢者数は増加の一途とともに医療費も増大しており、「令和2(2020)年度国民の医療費の概況」によると42兆9,665億円と公表された(厚生労働省, 2022)。それゆえ、今日の医療費問題の解決が急務とされる。また、高齢者においては慢性の全身疾患を併発した歯科疾患患者が増加しており、歯科の研究課題は口腔領域のみならず、全身領域との関連性についての究明が必要である。歯周病領域においては、動脈硬化症や2型糖尿病などの関係を検討した疫学研究が報告されており、歯周病がこれらの全身疾患の発症・進行リスクと関連性のあることは明らかである(Nat Rev Endocrinol 7: 738-748, 2011)。これらの疾患は内臓脂肪型肥満を共通の要因したメタボリックシンドロームと称され、メタボリックシンドロームの発症および進行に慢性炎症が関与することが明らかになっている(日本内科学会雑誌, 94: 4)。近年では、歯周病は単純に口腔局所の感染症としてのみならず、様々な臓器に影響を及ぼしうる軽微な慢性炎症として捉えなおされている。歯周病の罹患率および重症度は加齢に伴い増加すること(Periodontology 2000 72:54, 2016)や、高齢者では骨の再生能力が低下すること(Cell Stem Cell 20:1, 2017)が報告されている。また、加齢は心血管疾患や骨粗鬆症、癌の発症、慢性炎症の増加をきたすとともに、免疫系の機能低下も引き起こす。近年、細胞老化を起こした細胞が炎症関連遺伝子の発現を亢進させる現象である細胞老化随伴分泌現象(Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP)を起こすことが、加齢関連疾患に関与することが報告されている(J Clin Invest 123: 966-972, 2013)。さらに、加齢による過剰な慢性炎症が歯周病を悪化させることが示されている。慢性炎症は歯周病を含む加齢関連疾患に共通する基盤病態である(J Clin Invest 118: 2992-3002, 2008, Nat Rev Immunol 11: 98-107, 2011)。すなわち、老化細胞が産生するSASPが慢性炎症を誘導し、歯周病や加齢関連疾患の悪化に関与する可能性が示唆されている。以上より、高齢者の歯周組織を維持するためには、慢性炎症の抑制と歯槽骨形成を促進する因子の両者を応用する必要があると考えられる。加齢により歯周病を悪化させる分子基盤を解明すること、さらに老化細胞の除去やSASPの抑制により、歯周病や老化状態を改善できるかどうかを目指し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、加齢が歯槽骨吸収を悪化させる機序を解明すること、また老化細胞を除去する、あるいは老化細胞が産生するSASPを抑制することで歯槽骨の喪失を抑制することができるかを解明することである。現在臨床応用されている歯周組織再生療法とは異なり、老化による歯槽骨吸収に対しても応用できる方法として、喪失した歯槽骨を再生させる新たな歯周病の治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 老化が歯周病に及ぼす影響の解析

C57BL6/Jマウスの歯槽骨と長管骨の骨代謝状態を18か月齢まで経時的に評価した。評価項目は、骨量、骨吸収量、骨形成量、血清中の骨形成および骨吸収マーカーとした。また、老化細胞を検出するため、老化細胞マーカーであるSA- β -gal, p16, p21, p53遺伝子の発現を組織化学的及び免疫組織学的手法で解析した。研究方法の詳細を以下に示す。歯槽骨吸収の経時的解析: 加齢に伴う歯槽骨の変化を検討するため、3, 6, 12, 18か月齢のC57BL6/Jマウスの上顎歯槽骨の形態および骨量を、マイクロCT撮影により同一個体で経時的に解析した。血清中の骨形成および骨吸収マーカーの解析: 加齢に伴う変化を検討するため、各月齢のC57BL6/Jマウスの血清サンプリングを行い、骨形成マーカーとしてアルカリフォスファターゼ(ALP)を定量した。また、骨吸収マーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP5b)およびI型コラーゲン架橋C-テロペプチド(CTX)を定量した。免疫組織化学的染色法による歯槽骨および脛骨の解析: 各月齢のC57BL6/Jマウスの上顎歯槽骨と脛骨よりパラフィン包埋切片を作製し、OsterixとALPの免疫組織化学的染色法により、骨形成活性を評価した。老化マーカーの解析: 各月齢のC57BL6/Jマウスの上顎歯槽骨より作製したパラフィン包埋切片を使用し、老化マーカーであるSA- β -gal染色を行った。歯周組織における細胞増殖の低下した細胞の局在および数を評価した。上顎歯槽骨からmRNAを抽出し、Real-time PCR法にて、老化マーカーであるp16, p21, p53遺伝子の発現を解析した。

(2) 実験的歯周病モデルに対する老化細胞除去薬剤の投与効果の検討

チロシンキナーゼ阻害薬Dasatinib(D)とフラボノイドQuercetin(Q)の併用投与により、老化細胞が除去されることが報告されている(Aging Cell 14: 644, 2015)。D+Q併用投与による老化細胞除去療法が、老化による歯槽骨吸収を改善できるかを目的として、以下の研究を行った。絹糸結紮により誘導した14か月齢の高齢実験的歯周炎モデルマウスにD+Qを投与し、老化細胞除去による歯周炎及び老化状態の改善効果を検討した。18か月齢の

C57BL6/J マウスの上顎第 2 臼歯の周囲に 6-0 絹糸を結紮し、実験的歯周炎モデルマウスを作製した。14 か月齢より 4 か月間、月に一度 D+Q を経口投与した。上記(1)と同様に、

歯槽骨吸収の経時的解析: 加齢に伴う歯槽骨の変化を検討するため、3, 6, 12, 18 か月齢の C57BL6/J マウスの上顎歯槽骨の形態および骨量を、マイクロ CT 撮影により同一個体で経時的に解析した。血清中の骨形成および骨吸収マーカーの解析: 加齢に伴う変化を検討するため、各月齢の C57BL6/J マウスの血清サンプリングを行い、骨形成マーカーとしてアルカリフォスファターゼ (ALP) を定量した。また、骨吸収マーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP5b) および I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド (CTX) を定量した。免疫組織化学的染色法による歯槽骨および脛骨の解析: 各月齢の C57BL6/J マウスの上顎歯槽骨と脛骨よりパラフィン包埋切片を作製し、Osterix と ALP の免疫組織化学的染色法により、骨形成活性を評価した。老化マーカーの解析: 各月齢の C57BL6/J マウスの上顎歯槽骨より作製したパラフィン包埋切片を使用し、老化マーカーである SA- β -gal 染色を行った。歯周組織における細胞増殖の低下した細胞の局在および数を評価した。上顎歯槽骨から mRNA を抽出し、Real-time PCR 法にて、老化マーカーである p16, p21, p53 遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

歯槽骨及び長管骨の骨レベルは 3~18 か月齢で経時的に減少したが、D+Q 投与マウスは骨吸収を有意に抑制した。血清中の ALP 活性は 3~18 か月齢で経時的に減少し、また TRAP5b 及び CTX は経時的に増加する傾向がみられたが、D+Q 投与マウスではより変化が少なかった。上顎歯槽骨と脛骨における Osterix と ALP のタンパク質発現は、3~18 か月齢で経時的に減少する傾向がみられたが、D+Q 投与マウスは減少がより小さかった。上顎歯槽骨における SA- β -gal 陽性細胞は 3~18 か月齢で経時的に増加したが、D+Q 投与マウスは増加しなかった。上顎歯槽骨における p16, p21, p53 の遺伝子発現は 3~18 か月齢で経時的に増加する傾向がみられたが、D+Q 投与マウスでは増加しなかった。

以上の結果より、D+Q 投与による老化細胞除去療法は、加齢に伴う歯周病の進行を抑制する治療薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松井龍一, 小山尚人, 上原龍一, 田井康寛, 尾崎友輝, 吉成伸夫
2. 発表標題 高齢の遺伝的高脂血症マウスに対する老化制御の効果
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山尚人, 加藤慎也, 田井康寛, 佐故竜介, 出分菜々衣, 尾崎友輝, 吉成伸夫
2. 発表標題 高齢マウスに対する老化制御モデルの作成
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koyama N, Kato S, Tai Y, Sako R, Nakamura S, Dewake N, Ozaki Y, Yoshinari N
2. 発表標題 Effects of senolytic drugs on aged mice.
3. 学会等名 108th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and Japanese Academy of Clinical Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2022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	吉成 伸夫 (Yoshinari Nobuo) (20231699)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中村 卓 (Nakamura Suguru) (50756393)	松本歯科大学・歯学部・助教 (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