

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K12067

研究課題名(和文) 口腔疾患と心疾患の関連性の解明 心不全の非薬物治療法開発の基礎的研究

研究課題名(英文) Effects of oral disease on cardiac function

研究代表者

大貫 芳樹 (Ohnuki, Yoshiki)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：50288114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不正咬合モデルマウスを作製し、口腔疾患と心疾患の因果関係およびその分子機序を解明することを目的とした。16週齢の雄性マウスをコントロール群、不正咬合群、propranolol(受容体遮断薬)投与群、不正咬合+propranolol投与群の4群に分けて2週間後に心臓を摘出し、不正咬合による口腔ストレスが心臓および交感神経活動に及ぼす影響を詳細に解析した。その結果から、不正咬合による慢性的な交感神経活動の亢進が、細胞内Ca²⁺の過負荷ならびにオートファジー機能の低下による酸化ストレスの上昇を介して心筋リモデリング(線維化およびアポトーシス)を誘導す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

口腔疾患と心疾患の関連性は疫学調査から示唆されているが、その因果関係やメカニズムに関する詳細な報告は少ない。本研究では、不正咬合モデルマウスを用い、口腔機能障害と心疾患の因果関係およびその分子機序を解明した。また、得られた研究成果から、正常な口腔機能の維持が心疾患の予防につながることも示唆された。高齢化社会を迎え、近年増加傾向にある歯周病などの口腔疾患と、死亡原因第2位の心疾患との関連性を調べた本研究の意義はきわめて高い。

研究成果の概要(英文)：Various types of stress are associated with increased incidence of cardiovascular disease, but the relationship between occlusal disharmony and cardiovascular disease remain poorly understood. Therefore, in this work, we examined the effects of occlusal disharmony on cardiac homeostasis in bite-opening (BO) mice, in which a 0.7 mm space was introduced by cementing a suitable appliance onto the mandibular incisor. Sympathetic nervous activity and serum corticosterone, a key biomarker for stress, were significantly increased by the 14 days of BO treatment. Cardiac function was significantly decreased by the BO treatment, but propranolol, a non-selective β -blocker, ameliorated the dysfunction. Cardiac fibrosis, myocyte apoptosis and myocyte oxidative DNA damage were significantly increased by the BO treatment, but propranolol blocked these changes. These results suggest that occlusal disharmony might affect cardiac homeostasis via alteration of the autonomic nervous system.

研究分野：生理学

キーワード：不正咬合 心筋 線維化 アポトーシス オートファジー 酸化ストレス プロプラノロール

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓自律神経機能は、全身性の疾患（心疾患、糖尿病、甲状腺機能亢進症など）、薬物、味覚・嗅覚への刺激など様々な因子に影響を受けることが報告されている。我々は、マウスを用いて、パラボリック飛行による重力ストレス負荷（微小重力および過重力ストレス負荷）が心臓自律神経機能に影響を及ぼすことを観察した（Bai Y et al., *J Pharmacol Sci.*, 2012）。慢性的なストレスによる心臓自律神経機能の異常は心房細動などの不整脈の誘発因子として知られており、特に心疾患を持つ場合、不整脈は、心不全を引き起こし、突然死につながることもある。また、我々は、慢性的な心筋 β_1 受容体への刺激が心筋リモデリング（心肥大、アポトーシス、線維化など）を伴う心不全を誘発することも観察した（Okumura S et al., *J Clin Invest.*, 2014）。

(2) 心電図の心拍変動（heart rate variability: HRV）解析を用いて咀嚼運動が心臓自律神経機能に及ぼす影響を調べた報告によると、ガム咀嚼は心臓交感神経活動の亢進と副交感神経活動の抑制を誘発した（Shiba Y et al., *J Oral Rehabil.*, 2002; Hasegawa Y et al., *Eur J Oral Sci.*, 2009; Ohmure H et al., *J Dent Res.*, 2012）。しかしながら、ラットを用いた実験では、拘束ストレス負荷は心臓交感神経活動の亢進と副交感神経の抑制を誘発し、不整脈（期外収縮）の発生頻度を増加させるが、木片の咀嚼が亢進した交感神経活動および増加した期外収縮の発生頻度を抑制した（Koizumi S et al., *Am J Physiol.*, 2011）。これらの先行研究から、心臓自律神経機能に対する咀嚼の効果はストレス負荷などの他の因子に影響を受けることが示唆される。一方、モルモットの咬合高径低下モデルを用いた実験では、心臓自律神経（交感神経と副交感神経）活動の亢進と致死性心不全が観察された（Taga H et al., *in vivo*, 2012）。このことから、不正咬合は心臓自律神経機能に重大な影響を及ぼし、不整脈や心不全を誘発することが推察されるが、この種の研究は非常に少なく、一定のコンセンサスを得るまでには至っていない。

2. 研究の目的

近年、高齢化社会を迎えて、口腔疾患と全身性疾患の関連が注目されている。特に、歯周病による咀嚼機能の低下と認知症の関連性が報告されていることから、口腔機能の維持・改善は、全身性疾患の予防につながり、QOLの観点からも非常に重要な意味を持つ。口腔疾患と心疾患の関連性も疫学調査から示唆されているが、因果関係の有無を判定できる長期介入試験の報告はない（Lockhart et al., *Circulation*, 2012）。歯周病と同様に、不正咬合もQOLを低下させるだけでなく、全身の健康にも影響を及ぼすことが疫学調査から報告されている（Burt, *Clin Geriatr Med.*, 1992; Caplan and Weintraub, *J Dent Educ.*, 1993）が、メカニズムに関する詳細な報告は少ない。そこで本研究では、上記の学術的背景から立てた仮説（不正咬合が心臓自律神経機能に影響を及ぼし、不整脈や心筋リモデリング（心肥大、アポトーシス、線維化など）を伴う心不全を誘発する）を科学的に立証するため、不正咬合がマウスの心臓自律神経機能および心機能に及ぼす影響を詳細に解析する。そして、咬合・咀嚼機能の改善による心不全の非薬物療法開発の基礎的データを蓄積することを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

16 週齢の雄性マウス (C57BL/6) を①コントロール群、②不正咬合群 (下顎切歯に咬合挙上板を装着)、③propranolol (β 受容体遮断薬) 投与群 (propranolol を含む飲料水 (1 mg/mL) を自由摂取)、④不正咬合+propranolol 投与群の 4 群に分けて 2 週間後に心臓を摘出し、不正咬合による口腔ストレスが心臓に及ぼす影響を以下の (1) ~ (5) の手法にて解析した。

(1) 心電図の心拍変動 (HRV) 解析による心臓自律神経機能の定量的評価

コントロール群と不正咬合群に記録用電極および送信器を装着し、テレメトリーシステムを用いて心電図を自由行動下で 24 時間記録した。RR 間隔の標準偏差 (SDNN、副交感神経活動の指標、心疾患発症リスクと関連)、パワースペクトルの高周波 (0.20-0.35 Hz) 成分 (HF、副交感神経活動の指標)、低周波 (LF、0.05-0.20 Hz) 成分と高周波成分の比 (LF/HF、交感神経活動の指標) を算出し、心臓自律神経機能を定量的に評価した。

(2) 心エコー解析による心機能の定量的評価

心摘出前にイソフルレン麻酔下にて心エコーを行い、in vivo のポンプ機能 (駆出率 (EF)、内径短縮率 (FS)、左室収縮末期径 (LVESD)、拡張末期径 (LVEDD)) を解析した。

(3) 血清コルチコステロンの測定

心臓摘出時に採血し、ELISA 法にて、血清中のストレスマーカーであるコルチコステロンレベルを測定した。

(4) 心臓の形態解析

心不全に伴って発症する心臓のリモデリング (線維化、アポトーシス) を組織化学的手法にて定量的に解析した。線維化の解析にはマッソントリクローム染色、アポトーシスの解析には TUNEL 染色を用いた。

(5) 心筋リモデリング発症の分子機序の解析

酸化ストレス、オートファジー、アポトーシスの関連因子および β 受容体シグナル分子、 Ca^{2+} ハンドリング因子をウェスタンブロッティング法にて定量的に解析した。

4. 研究成果

(1) テレメトリーシステムを用いて心電図を自由行動下で 24 時間記録し、心拍変動 (HRV) 解析を行った結果、コントロール群に比べて不正咬合群では LF/HF (交感神経活動の指標) が実験期間 (2 週間) を通して有意に高いことが観察された。

(2) 心摘出前にイソフルレン麻酔下にて心エコーによる心機能測定を行った結果、コントロール群と比べて不正咬合群では EF (駆出率) と FS (内径短縮率) の有意な低下が観察されたが、この心機能低下は propranolol 投与により抑制された。

(3) 血清中のストレスマーカーであるコルチコステロンレベルを測定した結果、コントロール群に比べて不正咬合群では血清コルチコステロンレベルが有意に高いことが観察された。

(4) マッソントリクローム染色および TUNEL 染色の結果、不正咬合群では心室の線維化とアポトーシス陽性細胞の有意な増加が認められたが、それらの心筋リモデリング (線維化とアポ

トーシス) は propranolol 投与により抑制された。

(5) 心室から抽出したタンパク質を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、アポトーシスの指標となる Bax/Bcl-2 比は不正咬合群で有意に増加したが、その増加は propranolol 投与により抑制された。また、細胞内 Ca^{2+} ハンドリング因子であるホスホランパンのリン酸化レベル (Ser16、Thr17) およびそのリン酸化酵素である Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) のリン酸化レベルは不正咬合群で有意に増加したが、その増加は propranolol 投与により抑制された。さらに、不正咬合群ではオートファジー関連因子である LC3-II/I レベルの減少と p62 レベルの増加が観察されたが、これらの変化は propranolol 投与により抑制された。加えて、酸化ストレスの指標となる 8-OHdG およびタンパク質カルボニル化は不正咬合群で有意に上昇したが、その上昇は propranolol 投与により抑制された。

(6) 以上の結果は、不正咬合による慢性的な交感神経活動の亢進が、細胞内 Ca^{2+} の過負荷ならびにオートファジー機能の低下による酸化ストレスの上昇を介して心筋リモデリング(線維化およびアポトーシス)を伴う心機能障害を誘導することを示唆する。

(7) このように本研究では、不正咬合モデルマウスを用いて口腔疾患と心疾患の因果関係やメカニズムに関する新たな知見を得ることができた。今後、口腔疾患と心疾患の関連性を解明する新しい研究手法になることが期待される。高齢化社会を迎え、近年増加傾向にある口腔疾患と、死亡原因第 2 位の心疾患との関連性を調べる本研究の意義はきわめて高い。また、このような動物実験による研究結果は、心疾患に対する口腔疾患の重要性を科学的に評価する際にも大変役立つものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yagisawa Y, Suita K, Ohnuki Y, Ishikawa M, Mototani Y, Ito A, Matsuo I, Hayakawa Y, Nariyama M, Umeki D, Saeki Y, Amitani Y, Nakamura Y, Tomonari H, Okumura S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of occlusal disharmony on cardiac fibrosis, myocyte apoptosis and myocyte oxidative DNA damage in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0236547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0236547	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 -
1. 著者名 Suita K, Yagisawa Y, Ohnuki Y, Umeki D, Nariyama M, Ito A, Hayakawa Y, Matsuo I, Mototani Y, Saeki Y, Okumura S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of occlusal disharmony on susceptibility to atrial fibrillation in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70791-8	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 -
1. 著者名 八木澤由佳、吹田憲治、大貫芳樹、伊藤愛子、梅木大輔、友成 博、奥村 敏	4. 巻 41
2. 論文標題 実験的咬合異常がマウスの心機能に及ぼす影響について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 循環制御	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -
1. 著者名 Ito A, Ohnuki Y, Suita K, Ishikawa M, Mototani Y, Shiozawa K, Kawamura N, Yagisawa Y, Nariyama M, Umeki D, Nakamura Y, Okumura S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Role of α -adrenergic signaling in masseter muscle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0215539
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0215539	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 -

1. 著者名 Kawamura N, Ohnuki Y, Matsuo I, Suita K, Ishikawa M, Mototani Y, Shiozawa K, Ito A, Yagisawa Y, Hayakawa Y, Nariyama M, Umeki D, Ujiie Y, Gomi K, Okumura S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Effects of chronic Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide infusion on skeletal muscles in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 503-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00670-z	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 -

1. 著者名 Shiozawa K, Mototani Y, Suita K, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Matsuo I, Hayakawa Y, Nariyama M, Umeki D, Saeki Y, Ohnuki Y, Okumura S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Relationship between bite size per mouthful and dental arch size in healthy subjects.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 159-163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0630-8	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 -

1. 著者名 Mototani Yasumasa, Okamura Tadashi, Goto Motohito, Shimizu Yukiko, Yanobu-Takanashi Rieko, Ito Aiko, Kawamura Naoya, Yagisawa Yuka, Umeki Daisuke, Nariyama Megumi, Suita Kenji, Ohnuki Yoshiki, Shiozawa Kouichi, Sahara Yoshinori, Kozasa Tohru, Saeki Yasutake, Okumura Satoshi	4. 巻 470
2. 論文標題 Role of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3 (GRIN3) in -arrestin 2-Akt signaling and dopaminergic behaviors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 937 ~ 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-018-2124-1	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 -

〔学会発表〕 計22件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吹田憲治、八木澤由佳、早川佳男、伊藤愛子、松尾一朗、梅木大輔、大貫芳樹、奥村 敏
2. 発表標題 咬合不調和による慢性的な交感神経系の活性化は心房細動に対する脆弱性を高める
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤愛子、大貫芳樹、梅木大輔、吹田憲治、石川美佐緒、八木澤由佳、松尾一朗、早川佳男、友成 博、奥村 敏
2. 発表標題 咬合異常によるストレスはレニンアンジオテンシン系を介し心機能に影響を及ぼす
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川佳男、大貫芳樹、吹田憲治、石川美佐緒、伊藤愛子、松尾一朗、清本賢一、角田通則、河原 博、奥村 敏
2. 発表標題 抗ヘルペス薬（ピダラピン）は咬合異常に起因する心機能障害に対して心機能に影響を及ぼすことなく予防効果を示す
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吹田憲治、大貫芳樹、奥村 敏
2. 発表標題 咬合不調和のストレスがマウスの心機能に与える影響
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅木大輔、大貫芳樹、伊藤愛子、八木澤由佳、吹田憲治、石川美佐緒、友成 博、奥村 敏
2. 発表標題 咬合異常マウスの咬筋肥大効果におけるmiRNAの役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木澤由佳、大貫芳樹、梅木大輔、吹田憲治、伊藤愛子、早川佳男、松尾一朗、中村芳樹、友成 博、奥村 敏
2. 発表標題 咬合異常モデルにおける心臓リモデリングと アドレナリン受容体遮断薬による抑制効果
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吹田憲治
2. 発表標題 口腔内ストレスは心房組織のリモデリングを誘導して心房細動のリスクを高める
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川佳男、大貫芳樹、吹田憲治、石川美佐緒、伊藤愛子、川村直矢、八木澤由佳、松尾一朗、河原 博、奥村 敏
2. 発表標題 口腔のストレスに起因する心疾患に対する抗ヘルペス薬（ピダラビン）の予防効果
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木澤由佳、大貫芳樹、梅木大輔、伊藤愛子、中村芳樹、奥村 敏、友成 博
2. 発表標題 咬合異常モデルにおける心臓リモデリングと アドレナリン受容体遮断薬による抑制効果
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吹田憲治、大貫芳樹、奥村 敏
2. 発表標題 咬合不調和はマウスにおいて交感神経の活性化を介して心房細動の脆弱性を高める
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大貫芳樹、梅木大輔、伊藤愛子、川村直矢、八木澤由佳、早川佳男、松尾一朗、石川美佐緒、吹田憲治、成山明具美、奥村 敏
2. 発表標題 咬筋における アドレナリン受容体およびcAMP 活性化因子Epac の役割
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吹田憲治、八木澤由佳、大貫芳樹、梅木大輔、石川美佐緒、伊藤愛子、川村直矢、中村芳樹、奥村 敏
2. 発表標題 強制的開口負荷が心機能および心筋細胞内シグナル伝達に与える影響の解析
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八木澤由佳、大貫芳樹、梅木大輔、吹田憲治、伊藤愛子、川村直矢、石川美佐緒、中村芳樹、奥村 敏
2. 発表標題 強制的開口モデルにおける心臓リモデリングと アドレナリン受容体遮断薬による抑制効果
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅木大輔, 大貫芳樹, 伊藤愛子, 八木澤由佳, 川村直矢, 吹田憲治, 石川美佐緒, 中村芳樹, 奥村 敏
2. 発表標題 強制的開口によるマウス咬筋筋肥大効果に対するデキサメタゾンの拮抗作用
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohnuki Y, Suita K, Okumura S.
2. 発表標題 Roles of Epac1 in the regulation of contractility in cardiac muscle.
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅木大輔, 大貫芳樹, 伊藤愛子, 八木澤由佳, 成山明具美, 川村直矢, 吹田憲治, 中村芳樹, 奥村 敏
2. 発表標題 マウス咀嚼筋適応機構の解明
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吹田憲治, 八木澤由佳, 大貫芳樹, 梅木大輔, 石川美佐緒, 伊藤愛子, 川村直矢, 中村芳樹, 奥村 敏
2. 発表標題 開口負荷がマウスの心房に与える影響
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川村直矢, 大貫芳樹, 吹田憲治, 梅木大輔, 氏家優子, 伊藤愛子, 五味一博, 奥村 敏
2. 発表標題 Polphyromonas gingivalis由来LPS が心筋, 骨格筋に及ぼす影響
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤愛子, 大貫芳樹, 梅木大輔, 石川美佐緒, 吹田憲治, 川村直矢, 八木澤由佳, 中村芳樹, 奥村 敏
2. 発表標題 咬筋における アドレナリン受容体シグナルのサブタイプ特異的な役割
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八木澤由佳, 大貫芳樹, 梅木大輔, 石川美佐緒, 川村直矢, 伊藤愛子, 吹田憲治, 中村芳樹, 奥村 敏
2. 発表標題 強制的開口モデルによる心臓リモデリングとベータ遮断薬による抑制効果
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大貫芳樹, 奥村 敏
2. 発表標題 Epac1トランスジェニックマウスにおける心筋線維の収縮特性
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吹田憲治、大貫芳樹、奥村 敏
2. 発表標題 強制的開口負荷がマウスの心臓に与える影響
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018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	梅木 大輔 (Umeki Daisuke) (10514937)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	削除：2021年2月28日
研究 分担者	成山 明具美 (Nariyama Megumi) (90440304)	鶴見大学・歯学部・助教 (32710)	

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