

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19644

研究課題名（和文）NAD+中間代謝産物補充と老化細胞除去による 全身と歯周組織の健康寿命の延伸

研究課題名（英文）Extension of healthy longevity in body and periodontal tissue by NMN supplementation and senolytic treatment

研究代表者

山下 元三（YAMASHITA, MOTOZO）

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90524984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,500,000円

研究成果の概要（和文）：本課題において、加齢性の慢性疾患に共通の細胞老化を標的とした新規の歯周病治療法の開発に挑んだ。高齢者の臓器においては、NAD+合成系と同依存性脱アセチル化酵素SIRT1の機能低下が報告されている。NAD+に変換される代謝産物NMNあるいは老化細胞除去薬剤処理が歯周組織構成細胞に及ぼす影響を検討した結果、NMNもしくは同経路の活性化剤処理により、老化歯根膜細胞において、疲弊したミトコンドリアの機能がSIRT3/6ならびに、部分的にはPGC1 α を介して賦活化されることが明らかとなった。これらより、NMNにより、高齢者の口腔と全身の生物学的老化が制御可能で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

本研究の研究成果は、NAD+中間代謝物であるNMNの補充により、老化した歯根膜を中心とする歯周組織の細胞機能の賦活化が可能であることを示唆するものである。また、そのメカニズムの一つとして、NMNによる機能低下したミトコンドリアの賦活化と、それに基づく細胞内の活性酸素種ROSの調節制御機構を示した。これらの研究成果は、細胞傷害に作用するROSを産生・代謝するダメージミトコンドリアを標的とした薬剤開発のための基盤情報となるものであり、高齢者の歯周病の発症や進行を抑制する新たな治療法の樹立への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we challenged the development of a novel treatment for periodontal disease that targets cellular senescence, which is common in damaged organs of chronic age-related diseases. It has been reported that activity of NAD+ synthesis system and NAD+ dependent deacetylase, SIRT1 is reduced in the organs of the elderly ones. Therefore, we investigated the effects of treatment with NMN, an intermediate metabolite converted to NAD+, or senescent cell removal agents on periodontal cells. The results showed that treatment with NMN or an activator for this pathway resulted in the activation of exhausted mitochondrial function via SIRT3/6 and, in part, PGC1 α axis. These results suggest that the biological aging of the oral and total body of the elderly ones might be controlled by NMN supplementation.

研究分野：歯周病学

キーワード：細胞老化 NAD+依存性 NMN ミトコンドリア 歯根膜細胞 老化細胞

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省“健康日本 21 第 2 次”においては、健康寿命の延伸を目標とし、生活習慣病の発症と重症化予防の徹底が目標とされる。そして、口腔の健康は生活の質の向上に寄与すると明確に定義され、60 歳代の進行した歯周炎発症者の割合を 45%以下とする、高齢者に対して非常に高い数値目標が設定されていることから、従来の治療法に対する大きなイノベーションが必要である。サイトカイン療法や組織幹細胞移植療法が、臨床に応用されている今日においても、80 歳以上の高齢者において歯を喪失することなく炎症のない健康な歯周組織を維持、機能させることは極めて困難である。生体の寿命制御の為に、機能低下した臓器の「再生医療」のみならず「老化制御」の積極的なアプローチが必要である。

歯周病は、糖尿病、動脈硬化性疾患に類する生活習慣病の側面を有している。よって、個々の疾患に対して特異的な治療法をとるのではなく、これらに「共通の基盤病態」を標的とする治療戦略が高齢者の歯周病と生活習慣病の征圧には必要である、ことが考えられた。生体は加齢と共に「老化」が進行し、臓器の機能低下を特徴とした病態をとり、歯周病の発症と進行においても「加齢」は重要なリスク因子であることが疫学的に証明されている。実際に、高齢者の歯周病は、成人性疾患の合併症としてみられる事も多い。従って、加齢の特徴である「生物学的な老化」を標的とし、歯周組織と全身の臓器の細胞レベルの老化を制御する治療法の開発は、個体の老化そのものを遅延し、高齢者の歯周病の発症、進行を抑制するものであり、全ての成人性疾患の治療への応用が理論上可能である。初速する研究グループは、加齢に伴う歯周組織の機能低下の原因として、細胞レベルの老化、「細胞老化」が関与し、老化歯根膜細胞からの炎症性サイトカインの高産生 SASP 現象と長寿遺伝子 SIRT1 の炎症への関与を報告してきた。SIRT1 は、NAD⁺依存性の脱アセチル化酵素活性を有し、多様な標的因子の脱アセチル化により、細胞老化、エネルギー、栄養代謝、オートファジー、体内時計などの細胞機能のロバストネスの維持に働く。近年、老化により、SIRT1 と NAD⁺/SIRT1 代謝酵素の NAMPT の発現量は減少すること、その一方で、NAD⁺合成系の中間代謝産物である NMN (ニコチンアミド・モノヌクレオチド)の補充により、老化関連疾患である糖尿病モデルマウスの病態の分子レベルの改善が報告されている。また、興味深い事に、リウマチなどの老化疾患マウスモデルにおいては、小分子化合物投与による「老化細胞」除去の有効性が確認されている。これらの事実は、加齢によって進行する生活習慣病の原因として、老化細胞、NAD⁺合成系-SIRT 経路の低下と体内時計の乱れによる臓器連関ネットワークの破綻が共通の病因として抽出されるとともに、高齢者の歯周病の治療標的になりうることを強く示唆するものである。

2. 研究の目的

臨床においては、高齢者の歯周病では、細菌バイオフィーム除去を基本とした歯周治療では十分に完治せず、慢性炎症を特徴とした難治の臨床像をとることが散見される。これらの経験と基礎研究を通して、「細胞老化を予防、遅延させることならびに老化細胞を除去することにより、全身と歯周組織の老化を遅延し、高齢者の歯周組織における治癒、再生能の低下を特徴とした老化病態の賦活は可能である」と考えている。

本研究計画においては、加齢性の成人性疾患に共通の「細胞老化」を標的としたオリジナルな発想に基づいた歯周病治療法開発のための分子基盤情報を構築し、高齢者の難治性の歯周病と全身性の生活習慣病の克服に挑む治療戦略への展開を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、NAD⁺合成系の中間代謝産物である NMN 投与により、生体内において、中枢と末梢である歯周組織の NAD⁺合成系—SIRT1 経路を増強することで全身と歯周組織の細胞老化に及ぼす影響を炎症と幹細胞能に焦点をあて、*in vitro*、*in vivo* 実験モデルを用いて検討した。また、小分子化合物による老化細胞集団の除去が慢性炎症ならびに細胞外基質タンパク (ECM タンパク) 産生に及ぼす影響について検討した。

(1) NMN 補充が、ヒトの歯周組織構成細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞、血管内皮細胞、とりわけ歯根膜細胞の細胞老化に及ぼす影響の検討

老化細胞では、NAD⁺合成系が加齢により減弱することから、初代培養歯根膜細胞に NMN(100 μ M)を添加、*in vitro* にて複製老化を誘導し、NMN の補充が以下の細胞機能に及ぼす影響を検討した。

- 1, 細胞内 NAD⁺合成量、NAMPT の発現量、
- 2, SIRT1~7、概日時計遺伝子(CRY1/2,BMAL1, PER1/2)の発現量、
- 3, 炎症応答は *Porphyromonas gingivalis* (P.g.)LPS 刺激下での IL-6/8 の発現量、
- 4, 幹細胞能は、細胞増殖試験により自己複製能、硬組織形成能にて分化能を評価した。
- 5, ストレス応答、ミトコンドリア活性は、細胞内 ROS と ATP 活性の蛍光プローブ標識で評価した。同様の実験を、シャペロン阻害剤 (老化細胞除去薬剤) VER-155008 処理にて検討した。

(2) NMN 補充が細胞老化に及ぼす効果 *in vivo* 歯周病モデルマウスを用いた検討

70週齢 C57BL/6J-Aged マウスに(5-0)絹糸を結紮することで高齢歯周炎モデルを構築、供した。同モデルに NMN を腹腔投与(500mg/kg)し、NMN 投与と非投与群について、口腔内の臨床所見、顎骨マイクロ CT 解析による骨吸収量、歯周組織切片の免疫組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) *in vitro* にて複製老化を誘導した歯根膜細胞においては、継代数の増加とともに炎症サイトカイン、IL-6 の mRNA の発現が増強する一方で細胞増殖スピードは低下した。継代数に準じた細胞内の NAD⁺合成量の低下が認められたものの、NAMPT の発現量の変動は完全には一致しなかった。NMN(100 μ M)処理により、細胞老化が確認された老化歯根膜細胞の NAD⁺依存性脱アセチル化酵素サーチュイン (SIRT1~7)、とりわけ SIRT3、SIRT6 とその標的遺伝子である PGC alpha の発現増強が mRNA、蛋白レベルで認められた。SIRT3、SIRT6 は細胞内でミトコンドリアに局在することが報告されている。細胞内活性酸素種 ROS は、ミトコンドリアで生成される。そこで、NMN 処理が及ぼす影響を検討した結果、老化歯根膜細胞の ROS 産生を抑制することが明らかとなった。また、NMN 処理が、歯根膜細胞の硬組織形成能を増強したことより、NMN が老化歯根膜細胞の幹細胞能を賦活科することが示唆された。SIRT1-NAMPT と概日時計遺伝子(CRY1/2,BMAL1)はネガティブフィードバック経路を形成することが報告されている。しかしながら、NMN 処理が、SIRT1、NAMPT、概日時計遺伝子群の mRNA 発現量の発振に及ぼす影響は実験に供した *in vitro* のシステムでは確認できなかった。同様の実験を、シャペロン阻害剤 (老化細胞除去薬剤) VER-155008 処理にて検討した。

その結果、シャペロン阻害剤処理は、老化歯根膜細胞の小胞体ストレスを誘導し、ECM 産生を

阻害することが明らかとなった。興味深いことに、NMNの細胞機能に及ぼす影響は、継代数の多い老化歯根膜細胞において顕著であった。これらの研究成果より、NMNの老化歯根膜細胞に及ぼす影響は疲弊したミトコンドリア機能の賦活化にあることが示唆された。

(2) 老齢野生型マウス(C57/BL6)顎骨の μ CT計測により、著明な歯槽骨の吸収と組織切片解析により、歯根膜におけるROSの蓄積、DNAダメージの蓄積が観察された。NMNを5回/週、腹腔投与(500mg/kg)したマウスにおいては、明らかな活動量の増加が認められた。採取した心臓、歯周組織の病理切片について、ROSならびにSIRT3/6、NAMPTの詳細な免疫組織学的解析を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	藤原 千春 (FUJIWARA CHIHARU) (00755358)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	岩山 智明 (IWAYAMA TOMOAKI) (80757865)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	