

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23121

研究課題名（和文）炎症性老化を介した糖尿病と歯周病の関連メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidating the mechanisms linking diabetes and periodontal disease via inflammatory senescence

研究代表者

原 美音（Hara, Mikoto）

松本歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：60880804

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は老化が歯周病と糖尿病に及ぼす影響と作用機序を解明し、老化細胞除去により、歯周病と糖尿病の病態の改善が可能かを検討することを目的としている。実験動物としてマウスを使用し、歯周病発症群、糖尿病発症群、コントロール群を作製した。また、上記の歯周病発症群、糖尿病発症群において、老化細胞除去薬を投与し、老化抑制マウスを作製した。老化抑制群では、コントロール群と比較して歯槽骨吸収量が減少する傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の高齢者は増加の一途をたどり、それに伴い国民医療費も増加し続けている。高齢者の多くは糖尿病などの慢性疾患を有している。糖尿病は歯周病を含む様々な疾患と関連していると報告されている。また、老化した細胞が分泌する因子（SASP因子）が慢性炎症を誘導し、歯周病や糖尿病の悪化に関与することが示唆されているが、現在までに直接的な検証はほとんどない。よって、本研究によって歯周病・老化・糖尿病の相互的な関連性の解明、老化細胞除去による新たな治療戦略を確立する一助となることを目指すことは、超高齢社会において医療経済的にも非常に重要な意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the effects and the mechanism of aging on periodontal disease and diabetes, and to examine whether the removal of senescent cells can improve the pathology of periodontal disease and diabetes.

We prepared three groups of experimental animals: a periodontal disease group, a diabetes group, and a control group.

In addition, senescence-suppressed mice were generated by administering a senescence cell-eliminating drug to the periodontal disease- and diabetes-affected groups. In the anti-aging group, the amount of alveolar bone resorption tended to decrease compared with the control group.

研究分野：保存治療系歯学関連

キーワード：歯周病 糖尿病 老化 炎症

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、加齢に伴う全身疾患罹患率の増加は大きな問題となっており、高齢者に対する医療費も増加し続けている。特に糖尿病患者は判明している者だけで328万人超、糖尿病が強く疑われる者および疑いのある予備軍も含めると2,000万人以上にも及ぶとされている(厚生労働省, 国民健康・栄養調査, 2016)。その医療費問題の解決には慢性疾患の予防および治療が不可欠である。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をきたしており、歯科の研究課題は口腔領域にとどまらず、全身領域との関連性についての究明が求められる。

糖尿病は高血糖を主徴とする疾患であり、歯周病を含む様々な疾患と関連していることが報告されている(Nat Rev Endocrinol 7: 738-748, 2011)。また、高齢者では加齢に伴うインスリン分泌量の低下や、筋肉量の減少と脂肪組織の増加によるインスリン抵抗性の増大により耐糖能が低下し、糖尿病が悪化すると報告されている(Diabetes 52: 1738-1748, 2003)。歯周病は歯周病原細菌の感染に応答する慢性炎症により、歯槽骨の吸収をきたす疾患である。歯周病の罹患率と重症度は、加齢に伴い増加すること(Periodontology 2000 72: 54, 2016)が報告されている。

老化した細胞はSenescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) 因子と呼ばれる炎症性メディエーターを分泌する形質を示すようになり、加齢に伴う慢性炎症に寄与することが示唆されている(J Clin Invest 123: 966-972, 2013)。慢性炎症は歯周病や糖尿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)。老化細胞によるSASP因子が慢性炎症を誘導し、歯周病や糖尿病の悪化に関与する可能性が示唆されているが、現在まで直接的な検証はほとんどない。よって歯周病-老化-糖尿病の相互的な関連性の解明は医療経済的にも重要な課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、老化細胞のSASP因子による慢性炎症が歯周病と糖尿病に及ぼす作用機序を解明すること、さらに老化細胞の除去により歯周病と糖尿病が改善するのか否かを検討することである。老化という因子を除去したうえで糖尿病と歯周病の関連性を構築しなおし、老化の両疾患に対する病態増悪機序を解明することにより、これまでは局所の病原因子除去が主体であった糖尿病を併発した歯周病罹患者の治療において、老化細胞除去療法という新規の治療戦略の創生を期待する。

3. 研究の方法

(1) 高齢の歯周病誘導マウスと糖尿病誘導マウスの病態解析

72週齢のC57BL/6マウス30匹を実験に供する。上顎第2臼歯への絹糸結紮を施行した10匹を歯周病誘導群とする。脾臓細胞への毒性を有するstreptozotocin(STZ, 55mg/kg)を1回/日、5日間の腹腔内投与により、インスリン分泌機能不全を誘導した10匹をSTZ誘導性糖尿病発症群とする(J Biol Chem 294: 18807-18819, 2019)。10匹をコントロール群とする。以上の標準老化の3群にて研究を施行する。

老化の病態を検討する。歯周組織のSA-β-gal染色を行う。細胞周期阻害により老化を誘導するp16と、SASP因子の血清中における発現量の測定をreal-time PCR法、ELISA法にて行う。

歯周病の病態を検討する。歯槽骨吸収量のμCT解析、骨関連マーカー(alkaline phosphatase; ALP, tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP)と炎症性サイトカイン(IL-6, TNF-α)の血清中における遺伝子発現量、蛋白量の測定をreal-time PCR法、ELISA法にて行い、組織学的検討として免疫組織化学的染色による評価、および骨形態計測を行う。

糖尿病の病態を検討する。随時血糖値、空腹時血糖値の測定と、糖尿病進行程度の評価として、脾臓、肝臓、腎臓、心臓の炎症性サイトカイン発現を免疫組織化学的染色とreal-time PCR法、ELISA法にて解析する。

(2) 老化細胞除去による歯周病と糖尿病の病態改善効果の解析

72週齢のC57BL/6マウス30匹を実験に供する。上記(1)と同様に歯周病誘導群、STZ誘導性糖尿病発症群、コントロール群の3群を作製する。56週齢から72週齢までDasatinib(D; 5mg/kg)とQuercetin(Q; 50mg/kg)を1回/月、計4回経口投与して老化細胞を除去し(Aging Cell 14:644, 2015)、老化抑制群を作製する。上記と同様に、老化の病態、歯周病の病態、糖尿病の病態の解析を行う。これにより、加齢性の持続的な慢性炎症状態や免疫機能低下を老化細胞除去により抑制することが、コントロール群と比較して糖尿病と歯周病の病態に対して与える影響を検討する。

4. 研究成果

本研究は、老化細胞が分泌する SASP 因子による炎症が、慢性炎症を基盤病態とした加齢関連疾患である歯周病と糖尿病に及ぼす影響とその作用機序を解明すること、老化細胞除去薬を使用した老化細胞除去療法により、歯周病と糖尿病の病態の改善が可能かを検討することを目的としている。

(1) 研究成果の内容

老化が歯周病と糖尿病に及ぼす影響およびその作用機序を検討するため、実験動物としてモデルマウスの作製を行った。実験に使用する個体群は、6 週齢の C57BL/6 マウスを購入し、6 週齢時に streptozotocin (STZ, 100 mg/kg)・nicotinamide (NA, 240 mg/kg) を 2 日間隔で 2 回腹腔内投与することにより実験的糖尿病を誘発させた STZ 誘導性糖尿病発症群を作製した (Biol Pharm Bull 29: 1167-1174, 2006)。なお、研究当初の計画では、STZ (55mg/kg) を 1 回/日、5 日間の腹腔内投与 (J Biol Chem 294: 18807-18819, 2019) としていたが、本学の同系統の実験を行っている他の研究者にならい、上記手技とした。また、70 週齢時に上顎第 2 臼歯に 6-0 絹糸を結紮して実験的歯周炎を誘発させた歯周病発症群、コントロール群を作製した。

糖尿病の進行程度の検討のため、随時血糖値および絶食後 16 時間経過時における空腹時血糖値の測定を行った。STZ 投与による糖尿病発症個体において、随時および空腹時血糖値が増加する傾向がみられた。しかし、STZ 投与時の血糖値は各サンプル間でのばらつきが大きく、また STZ 投与後の血糖値の経時的な推移もばらつきがみられ、高血糖状態が安定しなかった。

STZ 投与による糖尿病発症個体の各サンプル間での血糖値のばらつきの改善・高血糖状態の維持のため、新たなプロトコルの構築が必要であった。随時血糖値が 180 mg/dl 未満に低下していた個体において、32 週齢時に STZ (100 mg/kg)・NA (240 mg/kg) の再投与を試みた。再投与後の血糖値も経時的に低下する傾向にあったが、随時血糖値 180 mg/dl 以上の個体において、糖尿病を発症していると定義し、STZ 誘導性糖尿病発症群とした。

上記の歯周病発症群、STZ 誘導性糖尿病発症群、コントロール群において、56 週齢から 72 週齢まで Dasatinib (5 mg/kg) と Quercetin (50 mg/kg) を 1 回/月、計 4 回経口投与し、老化抑制マウスを作製した。

上記 ~ の方法にて、歯周病誘導群 6 匹、STZ 誘導性糖尿病発症群 5 匹、コントロール群 3 匹、老化抑制歯周病誘導群 3 匹、老化抑制 STZ 誘導性糖尿病発症群 5 匹、老化抑制コントロール群 2 匹を最終的なサンプル数とした。

72 週齢の各サンプルを用い、以下の検討を行った。

血清中における SASP 因子の発現量を評価するために、炎症性サイトカインとして IL-6 と TNF- α の遺伝子発現量と蛋白量を real-time PCR 法、ELISA 法にて測定した。歯周病誘導群および STZ 誘導性糖尿病発症群はコントロール群に比較して有意な増加を認めた。

歯周病の病態の検討として、歯周組織に μ CT 解析を行った。三次元再構築画像を用いて、上顎第 1 臼歯、第 2 臼歯の近心根、遠心根、および第 3 臼歯歯根中央部を計測部位とし、各臼歯部のセメントエナメル境 (Cemento-enamel junction; CEJ) から歯槽骨頂 (Alveolar bone crest; ABC) の距離を歯槽骨吸収量 (Alveolar bone loss; ABL) として計測した。その結果、歯周病誘導群はコントロール群に比較して歯槽骨吸収量が有意に増加した。また、歯周組織の組織学的評価として ALP 染色および TRAP 染色を行った結果、歯周病誘導群はコントロール群に比較して ALP 陽性細胞数の有意な減少と TRAP 陽性細胞数の有意な増加を認めた。一方で、STZ 誘導性糖尿病発症群はコントロール群に比較して有意な変化は認めなかったが、歯槽骨吸収量および TRAP 陽性破骨細胞数が増加する傾向がみられた。

糖尿病進行程度の評価として、膵臓における炎症性サイトカイン発現を測定した。ホモジナイズした膵臓組織中の IL-6 遺伝子発現量、蛋白量を real-time PCR 法、ELISA 法を用いて測定した。組織学的検討として、免疫組織化学的染色を行った。その結果、STZ 誘導性糖尿病発症群はコントロール群に比較して有意な増加を認めた。一方で、歯周病誘導群はコントロール群に比較して有意な増加は認めなかったが、増加する傾向がみられた。

老化細胞除去療法による歯槽骨に対する影響を検討するため、歯槽骨の μ CT 解析を行い、上顎第 1 臼歯、第 2 臼歯の近心根、遠心根、および第 3 臼歯歯根中央部の CEJ と ABC から ABL を計測した。老化抑制群はコントロール群と比較して ABL が減少する傾向を認めた。

(2) 研究成果の考察

上記 (1) の結果より、歯周病誘導群、STZ 誘導性糖尿病発症群は、コントロール群に比較して血清中に炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α) の発現が多くみられ、全身的な慢性炎症状態がより強く誘導されていることが示唆された。また、老化細胞除去薬を投与した老化抑制群とコントロール群の歯槽骨の μ CT 解析より、老化抑制群はコントロール群と比較して ABL が減少する傾向を認めたことから、老化除去薬の投与が歯周病の病態を改善する可能性があることが示唆された。歯周病 - 老化 - 糖尿病の病態悪化機序の関連性を解明するためには、さらなる検討が必要であるため、以下 (3) に記す。

(3) 今後の展望

今後の実験予定

歯周病 - 老化 - 糖尿病の病態悪化機序の関連性についてさらなる検討を行う。老化の病態の検討、また、老化細胞の除去により、加齢性の持続的な慢性炎症状態や免疫機能低下を抑制することが、コントロール群と比較して糖尿病と歯周病の病態に対して組織学的・分子生物学的にどの程度影響を与えるのかを検討し、マクロファージ - 脂肪細胞相互作用を介した免疫応答系の機序を解明する。炎症性因子と免疫応答系因子を制御することにより、両疾患の発症および進行を制御するという新たな治療戦略を構築することが、本研究成果により期待される。

本研究の成果の国内外の位置づけ

歯周病と糖尿病などの全身疾患の関連性を検討した疫学的研究はこれまでに多数報告されている (Nat Rev Endocrinol 7: 738-748, 2011)。糖尿病が歯周病を悪化させる機序として、高血糖による脱水のため口腔が乾燥し、唾液の自浄作用低下による歯肉の炎症が起こりやすくなること、高血糖による白血球の免疫機能低下が生じ、歯周病原細菌に対する抵抗力が低下すること、高血糖における単球では炎症性サイトカインの産生が増加することなどである。現在ではこの単球が分化したマクロファージの活性化が歯周組織破壊を進行するという説が主流である。血糖コントロール不良の糖尿病患者においては歯周病の進行により歯の喪失リスクが上昇するという報告がなされている (Oxid Med Cell Longev 2016, 1810327, 2016)。また、歯周病が糖尿病を悪化させる機序として、慢性炎症性疾患である歯周病により歯周局所で産生された炎症性サイトカインが血中に移行し、インスリン抵抗性の上昇、インスリン感受性の低下を誘発し血糖コントロールが悪化する可能性などが考えられている (Nat Rev Endocrinol 7: 738-48, 2011)。これらの報告は歯周病と糖尿病が双方向性に関係することを支持している。一方で、老化細胞により発現する SASP 因子が糖尿病性歯周病に対して悪影響を及ぼすことも示唆される論文もこれまでに多数報告されている (Nat Rev Endocrinol 7: 738-748, 2011) が、その根本的なメカニズムについてはいまだ解明されていない。本研究により歯周病 - 老化 - 糖尿病の相互的な関連性の解明の一端を担うことは、歯周病と全身疾患との関連性の解明を目指す歯周医学 (Periodontal Medicine) の発展に寄与できると考えられる。また、老化因子除去により誘導される新たな治療戦略である老化細胞除去療法を確立することが、健康寿命の延伸にもつながりうる可能性を秘めているという点で、超高齢社会において非常に重要な研究課題であると考えられる。

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

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