

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09886

研究課題名（和文）歯周病がサルコペニアにおよぼすメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which periodontal disease affects sarcopenia

研究代表者

安田 忠司（Yasuda, Tadashi）

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：00410473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病による持続的な感染が筋肉の萎縮に影響を及ぼすことが考えられるものの確立した報告はない。そこで今回我々は実験的歯周炎が骨格筋に影響について解析した。その結果、腓腹筋の組織学的解析から対照群と比較して実験群では筋肉の萎縮が亢進した。ウエスタンブロッティングから対照群と比較し実験群ではAtrogin-1、MuRFの発現が亢進した。この結果からマウス実験的歯周炎モデルにおいて歯周炎は筋肉の萎縮に関連するリスク因子である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

加齢に伴う身体機能の低下は社会的にも問題となっているが、加齢に歯周病が関与することによってフレイルが進行するのは未だ明らかになっていない部分が多い。近年の研究から身体活動の低下や加齢ホルモンの変化による持続的な慢性炎症が生じると筋タンパク質分解が促進し炎症性サイトカインが筋萎縮の起点となり、筋衛星細胞の減少、機能低下につながる事が知られている。歯周病モデルマウスをもちいて筋肉の萎縮の解明することはフレイル解明の一助になる。

研究成果の概要（英文）：Although it is thought that persistent infection due to periodontal disease affects muscle atrophy, there are no established reports. Therefore, we analyzed the effects of experimental periodontitis on skeletal muscles. As a result, histological analysis of the gastrocnemius muscle showed that muscle atrophy was increased in the experimental group compared to the control group. Western blotting showed that the expression of Atrogin-1 and MuRF was increased in the experimental group compared to the control group. These results suggested that periodontitis may be a risk factor associated with muscle atrophy in a mouse experimental periodontitis model.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯周病 サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う身体機能の低下は社会的にも問題となっているが、加齢に歯周病が関与することによってフレイルが進行するのかは未だ明らかになっていない部分が多い。近年の研究から身体活動の低下や加齢ホルモンの変化による持続的な慢性炎症が生じると筋タンパク質分解が促進し炎症性サイトカインが筋萎縮の起点となり、筋衛星細胞の減少、機能低下につながる事が知られている。歯周病においてインターロイキン (IL) や腫瘍壊死因子 (TNF) をはじめとする炎症性サイトカインは、歯周組織の破壊を促進することが知られ特に、IL-6 と TNF- $\alpha$  は細菌刺激により産生が促される炎症性サイトカインであり、歯周病の発症に関与している。このことから歯周病による持続的な感染が筋肉の萎縮に影響を及ぼすことが考えられるものの確立した報告は少ない。

2. 研究の目的

そこで今回我々は、絹糸をマウスの歯に結紮させ惹起させた実験的歯周炎が、骨格筋である腓腹筋におよぼす影響について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

歯周炎を惹起させるために、実験開始時に 12 週齢 C57BL/6 マウス雄性マウス (日本クレア) の上顎右側第二臼歯を絹糸で結紮した結紮実験群、対照群 (非結紮) の 2 群とした。結紮開始から 4 週間後に各群の上顎骨を採取し、マイクロ CT を用いて上顎骨の 3 次元的画像を構築し、第二臼歯部歯槽骨の歯槽骨高径を定量的に分析した。その後、脱灰し薄切切片を作成し、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、上顎第二臼歯の歯槽骨に認められる TRAP 陽性多核細胞 (破骨細胞のマーカー) 数を計測した。また腓腹筋を採取し筋萎縮関連分子である Atrogin-1、MuRF の抗体を用いたウエスタンブロッティングと H-E 染色により組織学的評価を行った。

4. 研究成果

- 1) マイクロ CT 解析 : 対照群と比較して実験群では上顎第二臼歯周囲の歯槽骨吸収が惹起されている像が観察された。
- 2) 歯周組織の組織学的解析 : 対照群と比較して実験群では歯槽骨に TRAP 陽性破骨細胞の増加が観察された。
- 3) 腓腹筋の組織学的解析 : 対照群と比較して実験群では筋肉の萎縮が亢進した。
- 4) ウエスタンブロッティング : 対照群と比較し実験群では Atrogin-1、MuRF の発現が亢進した。

1) 実験的歯周炎の惹起

マウス屠殺時の上顎第二大臼歯を含む口蓋組織を示す (図.1)。黒い矢印は、結紮に使用した 5-0 絹縫合糸を示す。縫合糸には多量のプラークの付着を認めた。

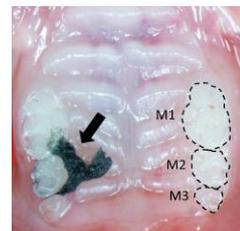


図.1

トルイジンブルー染色によるマウスの上顎第二臼歯の歯槽骨吸収像を示す。歯周病群は対照群と比較して歯槽骨吸収を誘導した (図.2)。

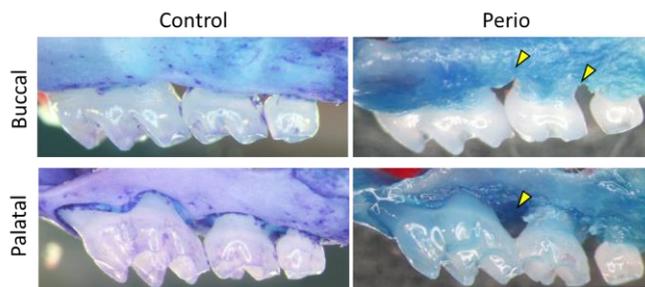


図.2 スケールバー : 1mm

対照群 (n=3)、歯周病群 (n=6) における上顎の  $\mu$ CT 画像を示す (図.3)。絹糸を結紮した第 2 臼歯は高度な骨吸収を認める (矢頭)。破線 : 歯根周囲の骨吸収を示す。

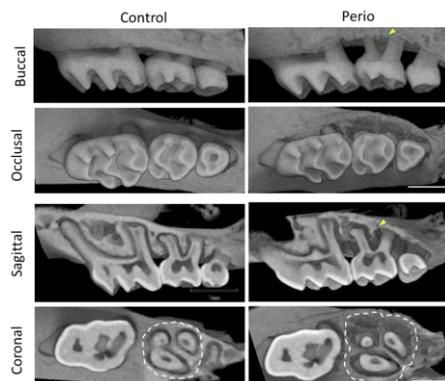


図.3 スケールバー : 1mm

μCT 分析から歯周病群の歯槽骨吸収量は、対照群と比較し 2.4 倍増加した (図.4)。セメント質-エナメル質接合部 (CEJ) と歯槽骨頂部 (ABC) の間の距離で測定した。Student's t-test を用いて統計的評価をした。 (\*  $p < 0.05$ )

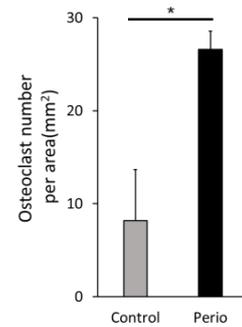


図.4

上顎第二臼歯の H-E 染色を示す (図.5)。破線は歯槽骨 矢頭はセメントエナメル鏡(CEJ)を示し、アタッチメントロスを確認した。

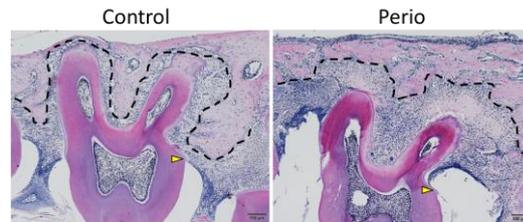


図.5

上顎第二臼歯の TRAP 染色を示す (図.6)。矢頭は TRAP 陽性細胞 (破骨細胞のマーカー) を示す。歯周病群は対照群と比較し 3.7 倍 TRAP 陽性細胞が増加した(図.7)。これらの結果から実験的歯周炎を惹起させることを確認した。 (\*  $p < 0.05$ )

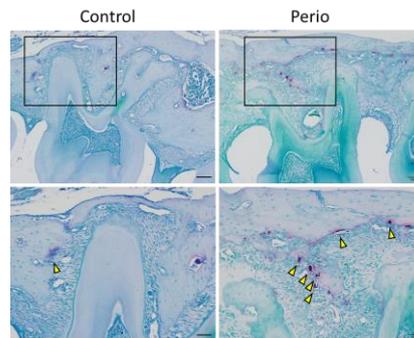


図.6

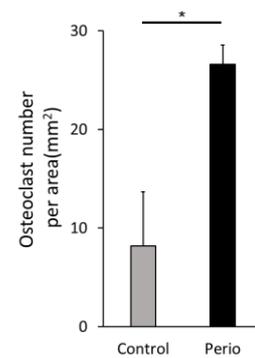


図.7

2) 実験的歯周炎モデルマウスの腓腹筋に及ぼす影響マウスの腓腹筋と取り出した腓腹筋を示す (図.8)。歯周病群は対照群と比較し重量に差はなかった (図.9)。



図.8

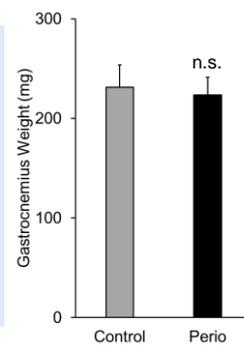


図.9

各群の H-E 染色像、破線は筋束を示す (図 10)。歯周病群の筋線維は萎縮線維間領域の増大、筋線維数減少の形態学的変化を示す。

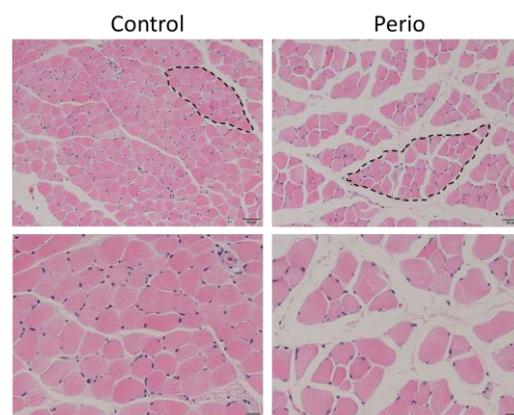


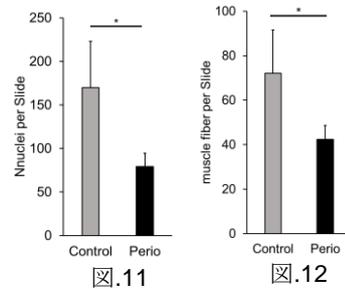
図.10

視野あたりの核数を比較したところ歯周病群は減少した (図.11)。

(\*  $p < 0.05$ )

視野あたりの筋線維数を比較したところ歯周病群は減少した (図.12)

(\*  $p < 0.05$ )



各群のトリクロム染色像を示す。破線は筋束を示す (図 14)。歯周病群の筋線維間領域の著明な線維化はない。

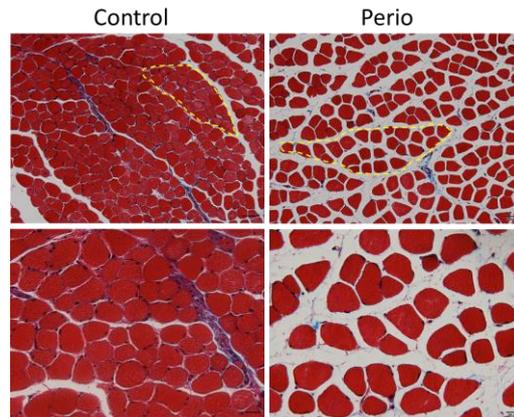


図 14

ウエスタンブロッティングによる Atrogin-1、MuRF1 の発現を示す (図 15)。 GAPDH : internal reference.

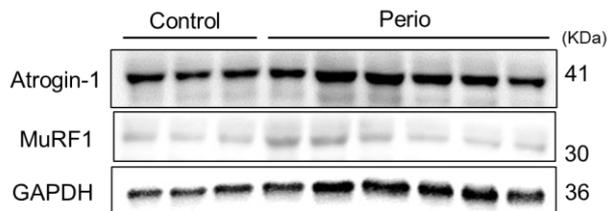


図 15

Atrogin-1、MuRF1 のタンパク質発現レベルを示す (図 16)。歯周病群は対照群と比較し筋萎縮因子の発現が有意に高値を示した。Watanabe ら<sup>1)</sup>は *Porphyromonas. gingivalis* 嚥下感染モデルマウスを用いて骨格筋の影響を調べたところ、ヒラメ筋では有意に脂肪化が亢進したことを報告している。今回、実験的歯周炎モデルマウスの腓腹筋に及ぼす影響を調べた結果、筋萎縮関連分子である Atrogin-1、MuRF の発現が亢進し、組織学的評価から筋肉の萎縮を示したことから、マウス実験的歯周炎モデルにおいて歯周炎は筋肉が萎縮するリスク因子である可能性が示唆された。

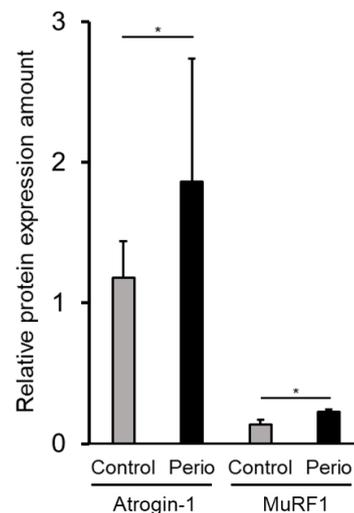


図 16

〈参考文献〉 Watanabe K, Katagiri S, Takahashi H, Sasaki N, Maekawa S, Komazaki R, Hatasa M, Kitajima Y, Maruyama Y, Shiba T, Komatsu K, Ohsugi Y, Tanaka K, Matsuzawa A, Hirota T, Tohara H, Eguchi Y, Anzai K, Hattori A, Iwata T.

*Porphyromonas gingivalis* impairs glucose uptake in skeletal muscle associated with altering gut microbiota. FASEB J. 2021 Feb;35(2):e21171.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田 忠司、堀 直樹、伊神裕高、清水雄太、辰巳順一
2. 発表標題 実験的歯周炎モデルマウスの腓腹筋に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田 忠司、伊神裕高、清水雄太、佐藤 匠、辰巳順一
2. 発表標題 実験的歯周炎モデルマウスの筋肉に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会
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	佐藤 匠  (Sato Takumi)  (10876519)	朝日大学・歯学部・助教   (33703)	
研究分担者	辰巳 順一  (Tatsumi Junichi)  (60227105)	朝日大学・歯学部・教授   (33703)	

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	清水 雄太  (Shimizu Yuta)  (30875901)	朝日大学・歯学部・助教    (33703)	
研究分担者	伊神 裕高  (Izami Hirotaka)  (40973425)	朝日大学・歯学部・ポストドクター    (33703)	

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