

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593069

研究課題名(和文) 歯周炎による老化促進の可能性と老化制御因子による新規歯周治療の開発

研究課題名(英文) Examination of the effects of periodontitis on aging, and development of novel periodontal treatments

研究代表者

長澤 敏行 (NAGASAWA, Toshiyuki)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：90262203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎による老化促進の可能性と老化制御因子による新規歯周治療の開発を目的として、糖尿病患者における歯周病の病態を検討し、さらに老化促進マウスであるKlothoマウスを用いて老化と歯周病の関係について検討した。その結果、糖尿病の歯周炎患者では炎症による急激な血糖値の変化が動脈硬化を促進する事が示唆された。老化促進マウスでは歯周組織の細胞の増殖能が低下しており、歯周病原細菌によって炎症を起こしやすいことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the effects of periodontitis on aging. Periodontitis patients with type 2 diabetes were examined to evaluate the association between inflammation and vascular aging. Periodontal tissue of Klotho mouse was examined to evaluate the association between accelerated aging and periodontitis. Results suggested that inflammation might enhance atherosclerosis through the rapid fluctuation of blood sugar. In addition, gingival fibroblasts from Klotho mouse had reduced growth rate, but enhanced inflammatory responses. These results suggest that periodontitis might affect aging through the systemic inflammation.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：Klotho 老化 歯周炎

1. 研究開始当初の背景

基礎生物学の結果から老化の主因が炎症などによる活性酸素であることが知られている。また老化により組織再生能は低下するが、現在の再生医療研究は幹細胞が主体であり、再生療法を受ける個体の老化についてほとんど検討されていない。

老化の主因である活性酸素はグルコース代謝と炎症反応で産生される。細胞はインスリンシグナルによってグルコースを取り込んでエネルギーとして利用し、分化・増殖する。その際に活性酸素が産生されるが、活性酸素は生理的な範囲内であり FOXO 経路によって消去される。しかし歯周病などの細菌感染では TNF などの炎症性サイトカインシグナルがグルコース代謝経路を抑制する(インスリン抵抗性の成立)。インスリン抵抗性によって組織再生のための細胞の増殖能力は著しく損なわれる。活性酸素は感染した微生物を殺菌する働きを有するため、感染による炎症では多量の活性酸素が産生されて老化が進行する。

FOXO は活性酸素やカロリー制限などの様々なストレスによって活性化する転写因子であることが報告されている。FOXO は Sestrin などの発現を上昇させて活性酸素を無毒化し、ストレスから細胞を守る働きがある。多くの動物実験や疫学調査から摂取カロリーの制限が老化を抑制し、寿命を延長することが知られているが、カロリー制限による老化の抑制も AMPK を介した FOXO の働きによることが明らかとなった。さらに FOXO のノックアウトマウスでは幹細胞が激減する事、また骨形成が妨げられることが相次いで報告され、FOXO が老化に伴う様々な病変を抑制する老化制御因子であることが明らかとなってきた。また糖尿病におけるインスリン抵抗性治療薬 Metformin に AMPK 活性化の働きがある事も報告され、薬物による FOXO 発現のコントロールも期待されている。

2. 研究の目的

老化した個体においては増殖能の低下や血管の障害によって十分な組織再生が期待できない事が多い。老化は代謝や炎症反応で生じた活性酸素が原因であると考えられており、歯周炎は老化を促進することが示唆される。Forkhead box transcription factor subgroup 0 (FOXO) 転写因子は活性酸素の消去や幹細胞の維持に不可欠であり、FOXO を過剰発現させた動物の寿命が著しく延長することが報告されている。この FOXO を活性化するのが Klotho 蛋白であり、Klotho 蛋白をノックアウトした Klotho マウスでは骨粗鬆症や動脈硬化など、早期に老化が起こる。本研究では歯周病による老化促進の可能性を歯周炎患者と老化促進マウス(Klotho マウス)をモデルとして検討した。

3. 研究の方法

糖尿病および高脂血症患者の歯周組織と内科検査を行い、歯周炎と全身の炎症について検討した。

ヒト歯肉線維芽細胞および上皮細胞株(KB細胞)を用いて様々なストレスにおける FOXO の発現を検討した。

歯周炎と老化の関係についてヒトを対象として長期の縦断研究を行うことは困難であるため、Klotho マウスをモデルとした。

4 週齢の Klotho マウスを用いて歯周組織、骨の状態を観察した。また歯肉線維芽細胞株を樹立して細胞増殖能や *P.gingivalis*LPS に対する反応性を検討した。

4. 研究成果

ヒト歯肉線維芽細胞および上皮細胞株(KB細胞)を用いて様々なストレスにおける FOXO の発現を検討したところ、これらの細胞は FOXO を発現し、*P.gingivalis*LPS 刺激などのストレスによって mRNA 発現が上昇する事が観察された。また同時にスーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)の発現も上昇し、活性酸

素の除去が行われる事が確認された。

糖尿病および高脂血症患者の歯周組織と内科検査を行い、歯周炎と全身の炎症について検討したところ、歯周炎患者では全身に軽微な炎症が認められた。メトホルミンなどの薬物の服用が歯周炎による全身の炎症に与える影響に関して多変量解析を用いて検討したところ、薬剤の投与を受けていても歯周炎による炎症は正常には戻らない事が示唆された。

Klotho マウスを用いて歯周組織の状態を観察するとともに歯肉線維芽細胞を分離してストレスに対する反応性を検討した。Klotho マウスはヘテロの個体と比較してホモの個体では顎骨のサイズが小さかった。また Klotho マウスおよび正常マウスから骨髄幹細胞、歯肉線維芽細胞を分離・培養を行ったところ、Klotho マウスでは増殖能が劣る事が観察された。さらに歯肉線維芽細胞を *P.gingivalis* LPS で刺激したところ、正常マウスや Klotho マウスのヘテロの個体由来の細胞と比較して Klotho マウスのホモの個体由来の細胞では IL-6 産生が高い傾向が観察された。これらのことから Klotho マウスでは、歯周組織の再機能が低下しかつ強い炎症反応を起こしやすいことが示唆された。

本研究によって歯周炎局所では細菌感染ストレスによる FOXO の誘導と活性酸素の除去が行われることが明らかとなった。歯周炎は FOXO を多量に消費させることによって老化を促進していることが示唆された。またメトホルミンなど FOXO を制御する可能性がある薬物も、歯周炎による全身の炎症を抑制する作用は限定的であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Nagasawa T, Shimizu S, Kato S, Nakatsuka Y, Kado T, Hidaka T, Shirai K, Mori M, Furuichi Y Host-microbial co-evolution in

periodontitis associated with

Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection J Oral Biosci, 2014;56:11-17

2. Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Izumi Y, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Fukui M, Nakamura N, Oseko F, Kanamura N, Inagaki K, Noguchi T, Naruse K, Matsubara T, Miyazaki S, Miyauchi T, Ando Y, Hanada N, Inoue S. Effect of glycemic control on periodontitis in type 2 diabetic patients with periodontal disease. J Diabetes Investig. 2013;4(3):320-325.
3. Bharti P, Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Kobayashi H, Takeuchi Y, Izumiyama H, Uchimura H, Inoue S, Izumi Y Periodontal treatment with topical antibiotics improves glycemic control in association with elevated serum adiponectin in patients with type 2 diabetes mellitus. Obesity Research and Clinical Practice 2013; 7(2):e129-138
4. Ye CC, Katagiri S, Miyasaka N, Bharti P, Kobayashi H, Takeuchi Y, Momohara Y, Sekiguchi M, Takamine S, Nagasawa T, and Izumi Y. The anti-phospholipid antibody-dependent and independent effects of periodontopathic bacteria on threatened preterm labor and preterm birth Archives of Gynecology and Obstetrics, 2013;288(1): 65-72
5. Wara-aswapati N, Chayasadam A, Surari R, Pitiphat W, Boch JA, Nagasawa T, Ishikawa I, and Izumi Y Induction of Toll-Like Receptor Expression by Porphyromonas gingivalis J Periodontol 2013; 84(7): 1010-1018
6. Kato S, Nakashima K, Nagasawa T, Abiko Y, Furuichi Y. Involvement of Toll-like receptor 2 in apoptosis of Aggregatibacter actinomycetemcomitans-infected THP-1 cells. J Microbiol Immunol Infect. 2013; 46(3): 64-70
7. Katagiri S, Nagasawa T, Kobayashi H, Takamatsu H, Bharti P, Izumiyama H, Uchimura I, Tagami T, Suzuki T, Nanbara H, Taniguchi Y, Hayakumo S, Koyanagi T, Himeno-Ando A, Goto M, Kajio H, Takahashi Y, Izumi Y, Noda M. Improvement of glycemic control after periodontal treatment by resolving gingival inflammation in type 2 diabetic patients with periodontal disease. J Diabetes Invest 2012; 3: 402-409
8. Nanbara H, Wara-Aswapati N, Nagasawa T, Yoshida Y, Yashiro R, Bando Y, Kobayashi H, Khongcharoensuk J, Hormdee D, Pitiphat W, Boch JA, Izumi Y. Modulation of wnt5a expression by periodontopathic bacteria. PLoS One. 2012; 7(4): e34434.
9. Hidaka T, Nagasawa T, Shirai K, Kado T, Furuichi Y. FGF-2 induces proliferation of

human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1+/CD146+ periodontal ligament cells. *Archs oral Biol.* (e pub ahead of printing) 2012;57(6):830-840

10. Takeuchi Y, Nagasawa T, Katagiri S, Kitagawara S, Kobayashi H, Koyanagi T, Izumi Y. Salivary levels of antibacterial peptide (LL-37/hCAP-18) and cotinine in periodontitis patients. *J Periodontol* 2012; 83(6): 766-772
11. Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Izumi Y, Kanazawa M, Matsuo A, Chiba H, Miyazaki S, Miyauchi T, Nakamura N, Oseko F, Kanamura N, Ando Y, Hanada N, Inoue S. Reduced masticatory function in non-elderly obese Japanese adults. *Obesity Research and Clinical Practice* 2011;5:e279-e286

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 長澤敏行 歯周病と糖尿病 第 48 回糖尿病学の進歩 札幌コンベンションセンター 札幌 平成 26 年 3 月 7 日
2. Nagasawa T. De novo diagnosis and treatment of periodontitis associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection The 36th Annual Scientific Meeting & 19th General Assembly of Association for Dental Sciences of Republic of China, Taipei International Convention Center, Taipei 2013.12.22
3. Nagasawa T, Terada Y, Konishi Y, Uehara O, Ueyonahara T, Maida T, Kawakami T, Tsuji M, Furuichi Y Cross sectional study on the relationship between serum biochemical examination and periodontal parameters 10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Nara Prefectural New Public Hall, Nara, 2013.9.3-4
4. 新田 浩、片桐さやか、長澤敏行、和泉雄一、金沢真雄、松尾 朗、千葉博茂、宮崎 滋、宮内 孝、大迫文重、金村成智、福井道明、中村直登、安藤雄一、花田信宏、井上修二 糖尿病・肥満患者における口腔に関する多施設疫学研究 第 22 回日本歯科医学会総会 大阪国際会議場 大阪 平成 24 年 11 月 9 日-11 日
5. 片桐さやか、新田 浩、長澤敏行、泉山肇、内村 功、野口俊英、菊池 毅、稲垣幸司、松原達昭、成瀬佳子、金沢真雄、松尾 朗、千葉博茂、大迫文重、金村成智、福井道明、中村直登、井上修二、和泉雄一 歯周炎に罹患した 2 型糖尿病患者における歯周病治療および糖尿病治療による多施設介入研究 第 22 回日本歯科医学会総会 大阪国際会議場 大阪 平成 24 年 11 月 9 日-11 日
6. 日高竜宏、長澤敏行、白井 要、上与原朝秀、門 貴司、古市保志 歯根膜由来細胞移植による組織再生に成長因子の併用が及ぼす影響 第 22 回日本歯科医学会総会 大阪国際会議場 大阪 平成 24 年 11 月 9 日-11 日
7. Nagasawa T, Kato S, Shimizu S, Hidaka T, Kado T, Mori M, Furuichi Y JP-2 type *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* characterization in Japanese periodontitis patients. American Academy of Periodontology 98th Annual meeting, Los Angels Convention Center, Los Angels, 2012.9.28-10.4
8. Nagasawa T. Host-microbial co-evolution in periodontitis associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 歯科基礎医学会 奥羽大学 郡山 平成 24 年 9 月 15 日
9. Bharti P, Katagiri S, Ye C, Kobayashi H, Takeuchi Y, Nagasawa T and Izumi Y. Expression of CD14, CD16 and CD45 on monocytes from aggressive periodontitis patients Europerio 7, European Federation of Periodontology, Vienna, Austria.2012.6.6-9
10. 清水伸太郎、長澤敏行、門 貴司、小松寿明、日高竜宏、加藤さつき、森 真理、古市保志 JP2 型 leukotoxin promoter を有する *A. actinomycetemcomitans* 菌の解析 第 55 回春季日本歯周病学会 札幌コンベンションセンター 札幌 平成 24 年 5 月 17-19 日
11. 長澤敏行、清水伸太郎、加藤さつき、門 貴司、日高竜宏、森 真理、古市保志 北海道在住の日本人家族から分離された JP2 タイプの *A. actinomycetemcomitans* の特徴 第 55 回春季日本歯周病学会 札幌コンベンションセンター 札幌 平成 24 年 5 月 17-19 日
12. 葉 暢暢、片桐さやか、バルティ パリクシャ、小林宏明、竹内康雄、長澤敏行、和泉雄一 早産・低体重児出産における歯周病に起因した 2glycoprotein-I を認識する抗体の役割 第 55 回春季日本歯周病学会札幌コンベンションセンター 札幌 平成 24 年 5 月 17-19 日
13. 寺田 裕、長澤敏行、小西ゆみ子、藤井健男、辻ひふみ、坂本亜衣子、植原 治、上奥那原朝秀、舞田健夫、川上智史、井出 肇、辻 昌宏、古市保志 内科および歯科検査値の相関に関する横断研究 第 55 回春季日本歯周病学会 札幌コンベンションセンター 札幌 平成 24 年 5 月 17-19 日
14. Ye C, Katagiri S, Bharti P, Kobayashi H, Takeuchi Y, Nagasawa T, Izumi Y The role of periodontal bacteria on antiphospholipid syndrome and preterm low birth weight 日中歯科大会 Chengdu(成都) 2012.4.26-28
15. Nagasawa T, Kato S, Shimizu S, Hidaka T, Kado T, Mori M, Furuichi Y Iron acquisition

of *A. actinomycetemcomitans* with JP2 type leukotoxin isolated from Japanese periodontitis patients in Hokkaido 9th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, L'Hotel Nina et Convention Centre, Hong Kong, 2011.9.9-10

16. 長澤敏行 「歯周病の概要と歯周病と糖尿病の関わり-歯周病専門医の立場から」糖尿病と歯周病に関する医科・歯科合同シンポジウム 札幌グランドホテル 札幌 平成 24 年 3 月 24 日
17. 長澤敏行、清水伸太郎、日高竜宏、門 貴司、加藤幸紀、森 真理、古市保志 JP2 型 leukotoxin promoter を有する *A. actinomycetemcomitans* 菌の分離と分析 第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会 大阪国際交流センター 大阪 2011 年 10 月 20-21 日
18. 清水伸太郎、長澤敏行、古市保志 臨床計測値と唾液および歯肉縁下プラークから検出される歯周病原細菌との相関性 第 54 回春季日本歯周病学会 福岡国際会議場 福岡 2011 年 5 月 26-29 日
19. 衣笠裕紀、長澤敏行、白井 要、粟倉あずさ、日高竜宏、古市保志 高齢者における歯周組織と全身の健康状態との関連性 第 54 回春季日本歯周病学会 福岡国際会議場 福岡 2011 年 5 月 26-29 日
20. 南原弘美、Wara-aswapati Nawarat、長澤敏行、吉田安宏、矢代麗子、坂東由記子、小林宏明、Boch Jason、和泉雄一 ヒト単球系細胞 THP-1 における歯周病原細菌刺激による Wnt5a 遺伝子発現について 第 54 回春季日本歯周病学会 福岡国際会議場 福岡 2011 年 5 月 26-29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長澤敏行 (NAGASAWA Toshiyuki)
北海道医療大学 准教授
研究者番号 : 90262203

(2) 研究分担者

辻 昌宏 (TSUJI Masahiro)
北海道医療大学 教授
研究者番号 : 70364271