

口腔の老化制御を基盤とした新しい口腔機能の維持・向上法の開発（21-6）

主任研究者 松下 健二 国立長寿医療研究センター 部長

研究要旨

口腔の老化制御を基盤とした新しい口腔機能の維持・向上法の開発を目指し、歯周組織、唾液腺、咀嚼機能の老化とその全身への影響を探索するとともに、その制御法について検討した。歯周病に関する研究では、①歯周病菌病原因子リポ多糖（LPS）による歯肉細胞の老化誘導と接着因子の発現異常による歯肉上皮の透過性亢進が観察された。②マウスへの歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の経口投与により、腸内細菌叢の変化とともに腸管上皮の透過性の亢進が観察された。③糖アルコールの一種であるエリスリトールをマウスに長期経口投与することにより、歯肉における老化関連分子および炎症関連分子の発現が有意に抑制された。④ *P. gingivalis* 感染は血管内皮細胞の PAI-1 産生を増強すること、*P. gingivalis* が血液脳関門のバリア機能に関連する Claudin-5 の発現低下をすること、好中球が産生する neutrophil extracellular traps: NETs と協働することで、同菌の脳内の侵入が促進される可能性が示唆された。唾液腺に関する研究では、①糖尿病薬の一種であるメトホルミンをマウスに投与することで、顎下腺における ACE2 発現が顕著に増加した。また、全長型の発現に変化は見られなかったが、断片型 TMPRSS2 が顕著に低下した。さらに、②老齢マウスの唾液中には、sACE2・sTMPRSS2 タンパクが増加していた。咀嚼機能と脳機能の関連においては、①APPKI マウスの上顎両側第一臼歯を抜去し3ヶ月間飼育した結果、非抜歯マウスと比較して、学習・認知機能の低下、運動平衡性の低下、攻撃性の増強が観察された。脳組織の遺伝子解析の結果、抜歯マウスでは、学習認知機能、脳の老化、脳炎症、および攻撃性に関連する遺伝子の発現変化が顕著に観察された。②三叉神経賦活剤の一種であるカプサイシンを上顎両側第一臼歯を抜去した老齢マウスに長期投与した結果、先に示した一連の生理機能が改善されるとともに脳老化・炎症等関連分子の発現が有意に低下した。同機序には、カプサイシンの受容体である TRPV1 の発現増加が一部関与している可能性が示唆された。

主任研究者

松下 健二 国立長寿医療研究センター 部長

分担研究者

四釜 洋介 国立長寿医療研究センター 副部長

山田 匡恵 国立長寿医療研究センター 外来研究員

古市 保志 北海道医療大学 教授

多田 浩之 東北大学 講師

研究期間 2021年4月1日～2024年3月31日

A. 研究目的

口腔の老化に伴う咀嚼機能や摂食・嚥下機能の低下は栄養障害や転倒リスクの増加に繋がるため、全身のフレイルに多大な影響を及ぼす。したがって、口腔の老化を制御し口腔機能を維持あるいは回復することは、高齢者の健康を増進し健康寿命を延伸するための重要な方策となり得る。歯の喪失は咀嚼機能低下の最大の要因であり、また歯周病は歯を喪失する最大の原因である。したがって、口腔機能の維持には歯周病対策が必須となる。我が国では高齢者の歯周病罹患率は増加傾向にあるため、その対策は重要な施策の一つとなっている（第二次健康日本 21 および口腔保健推進に関する法律等）。一方、老化による唾液分泌の低下は、咀嚼・摂食・嚥下困難を引き起こすとともに、う蝕、歯周病、口腔カンジダ症や誤嚥性肺炎等の発症や増悪をきたす。申請者らはこれまで、老齢マウスによる解析結果から、老化に伴う口腔の歯周組織、唾液腺、口腔細菌叢、および免疫系の変化が歯周病や口腔乾燥症の発症要因となり得ることを明らかにしてきた。加えて、マウスの臼歯喪失により脳機能が低下するとともに、脳内の老化関連分子の発現が増加することを見出した。本研究ではこれまでの研究成果を更に発展させ、歯周組織および唾液腺の老化が歯周病および口腔乾燥症の病態に及ぼす影響を明らかにするとともに、それらの老化制御を基盤とした、新しい口腔機能の維持・向上法の開発を目指す。加えて、咀嚼刺激の伝達経路である三叉神経を賦活化することによる脳老化の抑制の可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 老化歯周炎モデル細胞および老齢マウスのバリア機能因子変化の分析

- 1) 初代ヒト歯肉上皮前駆細胞(HGEPp)を様々な濃度の過酸化水素および LPS で処理した後、p16、p21、p53、老化関連 β -ガラクトシダーゼ(SA- β -gal)染色などの老化マーカーの発現を分析した。
- 2) *P. gingivalis* ATCC 33277 株を嫌気培養し、 1×10^9 CFU/ml の濃度になるように 2%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁した。この菌をマウスの口腔内に週 3 回、5 週

間にわたって投与した。最終接種から 30 日後、口腔内のマイクロバイオーーム、歯槽骨、歯肉を採取した。歯周炎の重症度は、下顎第一大臼歯および第二大臼歯の歯槽骨頂とセメントエナメル境の距離を測定することにより評価した。

- 3) *A. muciniphila* (Akk)および *P. gingivalis* (Pg) (ATCC 33277)の細菌培養液を初代ヒト歯肉上皮前駆細胞(HGEPp)に添加し、上清および細胞 RNA を回収した。Pg および AKK+Pg と共培養した細胞については、FITC-アルブミンを用いた透過性実験を行った。また、C57BL/6J 雄マウスに *P. gingivalis* および *A. muciniphila* を経口投与した。

2. 歯周組織の老化を制御する化合物の探索とその効果の検討

- 1) 18 ヶ月齢の老齢オスマウスを飼育し、通常の飲料水群(Aged Control: AC)、0.05%エリスリトール水群(Aged Erythritol:AE)とし、クレア社の CE-2 餌でそれぞれの群を 6 ヶ月飼育した。屠殺後、歯肉組織を採取し、各種分子の解析を行なった。
- 2) 培養ヒト歯肉線維芽細胞を過酸化水素水および LPS で処理し、細胞老化を誘導した。この時、各種濃度のエリスリトールを同時添加して、老化の抑制を観察した。

3. 歯周病原細菌による血管バリア破綻と脳機能障害に関する研究

- 1) *P. gingivalis* 野生型株およびジンジパイン欠損株ならびに *F. nucleatum* を嫌気培養し血管内皮細胞(HUVECs)、脳毛細血管内皮細胞株(hCMEC/D3)、マスト細胞(HMC-1)および C57BL/6 野生型マウス口腔に感染させた。*P. gingivalis* 感染による HUVECs の PAI-1 産生への影響について、培養上清の PAI-1 レベルを ELISA 法で測定した。
- 2) *P. gingivalis* 感染による血管内皮細胞の細胞遊走能への影響について、HUVECs 単層培養に創傷を作成し、細胞遊走による創傷治癒の速度を測定した(wound healing 法)。
- 3) *P. gingivalis* 感染による hCMEC/D3 のタイトジャンクション分子 claudin-5 発現への影響を western blotting 法でそれぞれ測定した。
- 4) 血液脳関門のバリア機能は、*P. gingivalis* 感染による hCMEC/D3 単層培養の経内皮細胞電気抵抗測定法(trans endothelial electrical resistance; TEER 法)と蛍光色素通過法にて評価した。
- 5) マウスの脳機能については、認知機能について新規物体認識試験にて、うつ状態について強制水泳試験にて評価した。脳における病理学的影響は、Iba1+マイクログリアおよび GFAP+アストロサイトを蛍光免疫染色法にて評価した。

4. 加齢・メトホルミンの唾液・唾液腺 ACE2、TMPRSS2 発現に及ぼす影響

C57BL/6N (6 週齢) マウスを 2 群に分け、一方にはメトホルミン水溶液、他方には水を経口投与した。老齢マウスは 18-24 ヶ月齢を用いた。刺激唾液は三種混合麻酔後、0.02%ピロカルピン溶液を腹腔内投与し、唾液分泌確認後、5 分間回収した。唾液回収後、唾液腺(顎下腺および舌下腺)を摘出し、組織学的解析に用いるため 4%PFA 保存、または western blot による解析に用いるため液体窒素で凍結した。唾液腺上皮細胞の単離は、Multi Tissue Dissociation Kit 1 (ミルテニー) を用い分散後、CD326(EpCAM) MicroBeads を用い positive selection にて回収した。western blot で解析を行う際には、

BCA protein assay kit (Thermo)にて総タンパク量を測定後、タンパク量を調整し、実験に用いた。

5. 咀嚼機能低下がマウスの脳機能に及ぼす影響の解析

18ヶ月齢のアルトハイマーノックインマウス(*App^{NL-G-F}*) (以下APPCまたはAPPE)、およびその基盤となる18ヶ月齢C57BL/6J(以下JCまたはJE)マウスを飼育、抜歯群(E)、非抜歯群(C)にわけた。非抜歯群(C)マウスに関しては、麻酔のみを行い抜歯は行わなかった。馴化飼育後、腹腔麻酔下で上顎第一臼歯の抜歯を行い、3ヶ月間の飼育の間、各種計測及び行動実験を行った。次に、各マウスの海馬における遺伝子発現の変化についてPCRおよび免疫染色にて検討した。

次に、若齢および老齢マウスをコントロール群、抜歯群に分け、両群の半数のマウスについてカプサイシン含有水を飲料水として飼育し、同マウスの認知機能や異常行動の有無についてカプサイシン非投与群と比較した。マウスはC57BL6Nslcマウスのオス18ヶ月齢のマウスを購入、以下3群に分けた。CC群(コントロール餌、非抜歯)、CE群(コントロール餌、抜歯)、CAPE群(カプサイシン0.01%含有餌、抜歯)である。抜歯処置が必要なマウスは腹腔麻酔下で上顎第一臼歯抜歯を行い、コントロール群は麻酔のみ行った。餌は、EPトレーディング社のコントロールOpen Standard Diet (OD)飼料、またはOD飼料にカプサイシン0.01%(約0.327 mM)を含む餌を同様にEPトレーディング社にて作製した。3ヶ月間の飼育およびサンプル回収とともに、行動実験、および海馬や視床下部における各種マーカーの発現検討について検討を行った。

(倫理面への配慮)

1. 老化歯周炎モデル細胞および老化マウスのバリア機能因子変化の分析

北海道医療大学歯学部研究倫理委員会の承認を得て実施した。また、実験中はマウスへの苦痛は最小限にとどめ、必要最小限の数匹を使用して行った。

2. 歯周組織の老化を制御する化合物の探索とその効果の検討、抜歯マウスに関する研究

本研究で行う動物実験については、国立長寿医療研究センターの動物実験規程に則り、動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施した。また、動物実験研究を行うため、「①マウスの匹数、②抜歯方法、③抜歯後の処置、④抜歯後の給餌、⑤糖アルコール飲水方法、⑥カプサイシン給餌について十分留意して実施した。

3. 歯周病原細菌による血管バリア破綻と脳機能障害に関する研究

微生物の取扱い、動物実験ならびに遺伝子組換え実験は、国立大学法人東北大学環境・安全委員会規定の定めるところによる微生物安全主任者、動物実験専門委員会ならびに遺伝子組換え実験安全専門委員会の審査および承認を受けた上で実施した。

4. 加齢・メトホルミンの唾液・唾液腺ACE2、TMPRSS2発現に及ぼす影響

本研究での動物実験に関しては、「国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程」を遵守し、倫理面においては「国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会」の承認を得

て実施した。

C. 研究結果

1. 老化歯周炎モデル細胞および老化マウスのバリア機能因子変化の分析

- 1) 歯周病菌の病原因子である LPS の歯周炎老化細胞への寄与について検討した。その結果、*P. gingivalis* を LPS 処理した老化細胞では、TER の顕著な低下、透過性の亢進、Claudin-1 および Claudin-2 の有意な発現上昇、E-cadherin および Connexin の有意な発現低下が認められた。同時に、老化モデルマウスに *P. gingivalis* を経口投与した結果、Pg+Akk 群およびコントロール群と比較して、Pg 群では Claudin-1 および 2 の発現が増加し、E-Cadherin および Connexin の発現が減少した。
- 2) *P. gingivalis* を投与した老齢マウスでは、 α および β 多様性と、*A. muciniphila* や *Clostridiaceae* などの有益菌の存在量の有意な減少が観察された。
- 3) *P. gingivalis* を投与した老齢マウスでは、腸内の Claudin-1 および Claudin-2 の mRNA およびタンパク質レベルが有意に上昇し、E-Cadherin は炎症性サイトカインの血清レベルと同様に有意に低下した。

2. 歯周組織の老化を制御する化合物の探索とその効果の検討

- 1) 老齢マウスの歯肉では、上皮の肥厚とポケットの深化、付着上皮の喪失、基底層の破壊が観察された。一方、エリスリトール投与老齢マウスでは、付着上皮の喪失が抑制され、ポケットや基底層の破壊も改善されていた。老齢マウスの歯周組織では、p21、 γ H2AX、NF- κ Bp65 の強い発現が観察された。一方、エリスリトール投与群では、p21、 γ H2AX、NF- κ Bp65 の染色性が減弱するとともに、p21、 γ H2AX、NF- κ Bp65 陽性細胞が有意に抑制されていた。さらに、TNF α と IL-1 β の mRNA 発現が有意に抑制された。
- 2) 培養ヒト歯肉線維芽細胞 (human Gingival Fibroblasts: hGF) の過酸化水素添加群は SA- β -gal 陽性細胞の数が著しく増加していたが、NAC やエリスリトールを同時添加した群では、陽性細胞が少ないことを確認した。また、エリスリトール投与あるいは NAC 投与群では p16、p21、TNF α および IL-1 β mRNA 発現が著しく増加したが、エリスリトール添加群では、それらの老化関連分子発現の強い抑制が見られた。
- 3) エリスリトールの作用機序を解糖系を標的として検討した。その結果、エリスリトールは、解糖系酵素ホスホフルクトキナーゼ (PFK) とホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM) が関与する経路を修飾している可能性が示唆された。

3. 歯周病原細菌による血管バリア破綻と脳機能障害に関する研究

P. gingivalis 感染が血管内皮を構成する血管内皮細胞の PAI-1 産生ならびに創傷治癒作用に及ぼす影響について検討した。*P. gingivalis* 感染ヒト血管内皮細胞では、PAI-1 レベルは著明に低下した。ジンジパイン欠損 *P. gingivalis* は PAI-1 レベルに影響しないこと、精製ジンジパインは PAI-1 を分解すること、さらにジンジパインによる PAI-1 分解は、血管内皮細胞の創傷治癒を遅延させることが明らかとなった。

ligature-induced periodontitis (LIP) モデルマウスの口腔に *P. gingivalis* を感染させると、脳に本菌と NETs が伝播することが明らかとなった。また、*P. gingivalis* 口腔感染 LIP モデルマウスは、認知機能が低下することを明らかにした。

歯周病が脳機能に影響を及ぼすには、歯周炎による炎症性因子が血管を経て血液脳関門を突破し、脳に至る必要がある。*P. gingivalis* 口腔感染 LIP モデルマウスにより歯肉に誘導された NETs を解析したところ、NETs にはジンジパインが結合しており、NETs 結合ジンジパインは血液に含まれるプロテアーゼ阻害因子に耐性を示した。つまり、ジンジパインは NETs に結合することでプロテアーゼ活性を保持した状態で口腔から脳へ血管内を移動することが示唆された。次に、ヒト血液脳関門 *in vitro* モデルのヒト脳毛細血管内皮細胞株 hCMEC/D3 を用いた経内皮電気抵抗試験により、血液脳関門バリア機能への影響を評価した結果、hCMEC/D3 細胞を NETs 結合ジンジパインで処理するとバリア機能が有意に低下した。これらの研究成果は、*P. gingivalis* ジンジパインが好中球 NETs と協調して、口腔から血管を経て血液脳関門を突破し、脳機能を障害することを示唆している。

4. 加齢・メトホルミンの唾液・唾液腺 ACE2、TMPRSS2 発現に及ぼす影響

- 1) 若齢(6 週齢)マウス(C57BL/6N)にメトホルミン(5mg/ml)を自由給水させ、5 週間、または 10 週間後刺激唾液を回収した。刺激唾液は三種混合麻酔後、0.02%ピロカルピン溶液を腹腔内投与し、唾液分泌確認後、5 分間回収した。高脂肪食負荷マウスを用いた実験ではメトホルミンによる体重減少効果が多数報告されているが、通常食で飼育したマウスではその効果は確認されなかった。投与 5 週間で刺激唾液がメトホルミン投与群で増加傾向となり、10 週間で有意に増加した。
- 2) メトホルミン投与 10 週後に唾液腺（顎下腺）をサンプリングし、ACE2、TMPRSS2 タンパク発現を western blot 法で解析した。メトホルミン投与群では ACE2 発現が顕著に増加した。TMPRSS2 は全長型の発現に変化は見られなかったが、断片型はメトホルミン投与群で顕著に低下した。舌下腺を用いた解析でも同様の結果が得られている。マウス唾液には sACE2 および sTMPRSS2 が存在することを見出しているが、メトホルミン投与により sACE2 は増加し sTMPRSS2 は減少した。
- 3) ACE2、TMPRSS2 は唾液腺では主に上皮細胞で発現していることを免疫組織化学染色法で確認しているため、上皮細胞における遺伝子発現を real-time PCR 法を用い検討した。マウス顎下腺を分散後、磁気ビーズ法を用い CD45 negative、CD326 (EpCAM)positive selection により唾液腺上皮細胞を回収した。メトホルミン投与は唾液腺上皮細胞の ACE2、TMPRSS2 mRNA 発現に顕著な変化を誘導することはなかった。
- 4) 老齢マウス唾液腺 ACE2 発現を western blot 法により解析した結果、若齢と比較し有意にその発現が減少していた。TMPRSS2 および ACE2 切断酵素である ADAM17 発現を免疫組織化学染色法により解析した所、両タンパクともに老齢マウス唾液腺導管

で有意に陽性面積が増加していた。

- 5) 老齢マウス唾液 sACE2・sTMPRSS2 タンパクを western blot 法により解析した結果、若齢と比較し sACE2・sTMPRSS2 ともに有意に増加していた。老齢マウス唾液腺における ACE2 発現は減少していたが、ACE2 切断酵素である ADAM17 発現が増加したため、唾液 sACE2 が増加したと考えられる。また血清 sACE2 レベルは若齢と比較し有意な差は認められなかったため、唾液 sACE2 は唾液腺由来であると考えられた。

5. 咀嚼機能低下がマウスの脳機能に及ぼす影響の解析

- 1) 老齢アルツハイマーノックインマウス(APPI マウス)を用い、臼歯抜歯による認知機能低下、老化関連分子の誘導、行動異常等を検討した。行動実験としては、①Y 迷路実験、②RotaRod、③24 時間ホームゲージモニタリング、④攻撃行動実験の 4 つの検討を行った。

Y 迷路実験の Alteration rate の結果、抜歯群ではコントロール群と比較して著しい認知機能の低下が見られた。攻撃行動実験では、抜歯群において、攻撃誘発用バーを噛む力およびその回数が非抜歯群に比べてさらに増加した。24 時間のマウスの行動をモニターした結果、抜歯群は夜間に強い活動ピークがみられ、全体的に活動量が多いことが示された。抜歯処置により、認知機能の低下、運動平衡性の低下、筋力低下、攻撃性の増悪が観察された。

また、各マウスの海馬における遺伝子発現の変化について、PCR および免疫染色にて検討した。抜歯群では GFAP 陽性細胞、Iba1 陽性細胞の増加とともに、c-Fos 発現の減少が観察された。BDNF および NeuN 発現も抜歯群で低下していた。さらに、攻撃性に関与する因子である CDH13 および MAOA の mRNA およびタンパク発現は、抜歯により増加していた。一方、抜歯群においてセロトニン(5-HT)の発現減少が認められた。

- 2) 三叉神経賦活作用のあるカプサイシンを投与することによって抜歯による脳機能低下を回復できるか否かについて検討した。

行動実験は、①24 時間ホームゲージモニタリング、②Y 迷路実験、③RotaRod の 3 つの検討を行った。24 時間のマウスの行動をモニターした結果、抜歯群では夜間の活動性の増加が観察されたが、カプサイシン投与によりそれは減少する傾向になった。Y 迷路実験の Alteration rate は、抜歯群において低下が見られたが、カプサイシン投与によりコントロールレベルまで回復した。RotaRod 試験では、抜歯群のマウスにおいて著しく Latency 低下が見られたが、カプサイシン投与群でそれは回復した。これらの結果から、カプサイシン投与によって、認知機能(Y 迷路実験)、運動機能の低下(RotaRod)が回復することが明らかとなった。

次に、海馬における遺伝子発現の変化について PCR および免疫染色にて検討した。c-fos および Bdnf の視床下部および海馬での mRNA 発現は、抜歯群で低下し、カプサイシン投与群で回復した。Iba1 mRNA 発現は抜歯群で増加したが、カプサイシン投与

群でその発現は抑制された。NeuNmRNA の発現は抜歯群で減少し、カプサイシン投与群でその発現はコントロールと同程度まで回復した。アストロサイトの老化マーカーである Gfap の発現は抜歯により著しく上昇したが、カプサイシン投与群ではその発現は抑制された。

また、カプサイシンの受容体である TRPV1 の発現は、抜歯群では著しく減少していたが、カプサイシン投与群では回復した。カプサイシンは抜歯により低下した脳機能を回復する可能性が示唆された。

D. 考察と結論

1. 老化歯周炎モデル細胞および老化マウスのバリア機能因子変化の分析

in vitro の歯肉細胞培養モデルで LPS を投与したところ、老化細胞は上皮バリア分子を変化させるだけでなく、若い細胞よりも高い透過性を示した。老化マウスに *P. gingivalis* を経口接種すると、透過性の増加とともに上皮バリア分子の変化が誘導された。老齢マウスにおける変化は、若年マウスにおける変化よりも顕著であった。これらの結果は、*P. gingivalis* の感染と加齢が歯肉透過性を増加させる主要因である可能性を示唆している。さらに、加齢に伴うバリア分子の発現を制御する炎症性サイトカインの産生を評価した。LPS または *P. gingivalis* で処理した老化細胞および老齢マウスにおける IL-1 β および TNF- α の有意な発現上昇は、細菌が加齢による衰弱の刺激であることを示唆している。全体として、*P. gingivalis* は歯肉バリアの完全性に重大な影響を及ぼし、この影響は老化が進むほど顕著になることが示唆された。

P. gingivalis を経口投与すると、細菌の多様性が失われ、*A. muciniphila* のような有益な細菌の存在量が減少し、腸管上皮バリア分子の発現が変化したが、これらはすべて加齢が進むほど顕著になった。本研究の結果、*A. muciniphila* の *P. gingivalis* の増殖抑制作用、抗菌ペプチドの制御作用、*P. gingivalis* によって上昇する炎症性サイトカインの減少作用が明らかになった。さらに、*A. muciniphila* の投与は、*P. gingivalis* によって誘導される上皮透過性を低下させた。*P. gingivalis* は、S100A7、LL37、mBD-2 の発現を有意に上昇させ、炎症と組織損傷に寄与した。しかし、*A. muciniphila* の投与はこれらの発現を低下させ、宿主の免疫応答に対する調節作用を示唆した。また、IL-6 と TNF- α レベルを低下させることで、抗炎症作用も示した。さらに、*A. muciniphila* は e-カドヘリンの発現を増加させ、NF κ B 経路の活性化を減少させ、バリアの完全性を維持し、*P. gingivalis* によって誘発される歯槽骨吸収を減少させた。これらの知見は、*A. muciniphila* が歯周組織の劣化を緩和する可能性を強調するものである。本研究は *P. gingivalis* が口腔および腸管上皮バリアに及ぼす影響を明らかにした。さらに、老齢マウスへの *P. gingivalis* 投与により細菌の多様性が失われ、*A. muciniphila* のような有益な細菌の存在量が減少した。本研究により、*A. muciniphila* は *P. gingivalis* が誘発する歯周病の有害な影響を緩和する治療薬として注目された。これらの知見は、歯周

炎による歯周組織の劣化を緩和する *A. muciniphila* の保護効果に関する新たな洞察を提供し、*P. gingivalis* 感染に関連する歯周病に対する治療介入としての可能性を示唆するものである。

2. 歯周組織の老化を制御する化合物の探索とその効果の検討

本研究では、歯周病菌の一種である *P. gingivalis* (*P.g*) 菌より抽出した内毒素 LPS で培養ヒト歯肉線維芽細胞(hGF)の老化を誘導し、エリスリトールの添加によりその老化を抑制することを明らかにした。更にはその抑制された老化が、解糖系の PFK 酵素に起因することを明らかにした。

主要なグルコース分解酵素である PFK は、細胞を multiple passage する時の aging marker として知られており、線維芽細胞においては、passage を重ねることで徐々に増加していることが確認されている。このことから、解糖系代謝の亢進は老化に起因するものであり、本研究では PFK をターゲットとし、検討した。結果として、hGF における老化に関連する酵素は PFK であり、エリスリトールがその活性に影響している可能性が示唆された。

また in vivo における検討でも、エリスリトールを長期間飲水していた老齢マウスの口腔組織は、老化マーカーの発現がコントロール老齢マウスと比較して減弱していただけでなく、mRNA、タンパクレベルでも抑制されていた。

エリスリトールの口腔内への使用は、あらゆる老化に起因する口腔疾患の予防に有効である可能性が明らかとなった。今後、口腔内への老化防止の臨床応用を目標とした口腔ケア製品の発売が期待できる。

3. 歯周病原細菌による血管バリア破綻と脳機能障害に関する研究

歯周病の歯周ポケットは、粘膜が潰瘍化しており絶えず出血している。*P. gingivalis* が産生するジンジパインによる血管内皮バリアの創傷治癒遅延は、*P. gingivalis* による血管内侵入を可能とする。一方、ジンジパインは urokinase plasminogen activator (uPA)前駆体を分解することで活性化 uPA の生成を促進することが報告されており、*P. gingivalis* はジンジパインにより PAI-1 機能低下と uPA 活性化を共に誘導することにより線溶系を促進させる。他方、PAI-1 は歯周組織の創傷治癒に重要な役割を担うことが明らかにされている(J. Periodontol. 72:849-857, 2001)。歯周病罹患者の歯周組織では、*P. gingivalis* が産生するジンジパインによる PAI-1 分解と uPA 活性化が誘導され、線溶系の異常な活性化により歯周組織の繊維素溶解、易出血性、補体活性化や歯槽骨吸収などが生ずる可能性が示唆される。

歯周病原細菌の感染により誘導される MIF 発現 MCETs による炎症反応は、MCETs の主な役割が感染防御ではなく、炎症誘導である可能性を示唆する。歯周病において歯周ポケット内には多量の歯周病原細菌が集積するため、歯周ポケットの潰瘍部位から MIF 発現 MCETs は血行性に全身の他臓器に伝播する可能性が考えられる。たとえば、関節リウマチを有する患者は歯周病罹患率が高いが、MIF は関節リウマチの関節腔に

において TNF- α や IL-6 発現および白血球の浸潤を誘導することが示唆されている。他方、ヒトは 1 日に約 1.5 兆個の口腔細菌を唾液とともに飲み込んでおり、一部の口腔細菌は腸まで到達することが明らかにされている。活動性の炎症性腸疾患患者は血清 MIF レベルが上昇しており、治療の奏効に伴い MIF レベルは低下することから、MIF 発現 MCETs は歯周病のみならず炎症性腸疾患の病態増悪に関わる可能性が示唆される。

歯周病は青年期から壮年期を経て老年期に至る長期間にわたり慢性炎症が持続して徐々に悪化することが特徴であるが、歯周病とアルツハイマー病に関する研究は高齢者に着目した研究が多く、青年期から壮年期における発症前期における病態に着目した研究は少ない。そして、歯周病は世界の 30 歳以上の約半数が罹患することから、両疾患は長期間にわたり病態に影響を及ぼすことが考えられる。アルツハイマー病および軽度認知障害患者の口腔および脳脊髄液では *Porphyromonas* 属を含むグラム陰性菌が増加しており、米国では軽度から中等度のアルツハイマー病患者を対象としたジンジパイン阻害剤を用いた臨床試験が行われており、*P. gingivalis* 感染が認められる歯周病患者において、認知機能低下の速度が遅延する成果が報告されている。

NETs 形成障害を起こす好中球エラストアーゼ ELANE 変異、cathepsin C 異常や抗菌ペプチド発現低下の Pappilon-Lefevre 症候群や Haim-Munk 症候群では歯周病が悪化することから、口腔の好中球が放出する NETs は口腔の感染防御を担う。一方、本研究で明らかとなった *P. gingivalis* 感染による MIF 発現 NETs は、MCETs と同様に炎症を誘導することを示した。アルツハイマー病および軽度認知障害の脳脊髄液における MIF レベルは亢進しており、脳脊髄液 MIF レベルとタウリン酸化は相関がみられる。また、アルツハイマー病における認知機能低下は MIF アンタゴニスト ISO-1 および MIF ノックアウトマウスで改善されることも明らかにされている。また、アルツハイマー病マウスモデルにおいて MIF を抑制するとアストロサイト活性化とタウリン酸化は抑制される。本研究成果ならびに関連する先行研究より、歯周病は脳機能障害に密接に関わることが示唆され、口腔の健康を維持することは全身疾患の発症・進行の予防に寄与すると捉えられる。

4. 加齢・メトホルミンの唾液・唾液腺 ACE2、TMPRSS2 発現に及ぼす影響

唾液 sACE2・sTMPRSS2 は唾液腺由来と考えられるため、細胞老化・AMPK による ACE2・TMPRSS2 発現調節メカニズムを明らかにする事で、SARS-CoV-2 の新たな感染予防法の開発に繋がると考えられる。薬剤服用により唾液分泌障害が副作用として現れることがあるが、メトホルミンは唾液分泌促進するためドライマウス患者にも応用できる可能性がある。さらに、メトホルミンは ACE2 タンパク安定化を促すことが報告されており、これにより唾液 sACE2 が増加する可能性があるが、sTMPRSS2 についてはその活性・機能に関する報告はほぼない。また今後はヒトサンプルも用い解析していく予定である。

5. 咀嚼機能低下がマウスの脳機能に及ぼす影響の解析

1) 臼歯喪失が APPKI マウスに及ぼす影響の解析

本研究の結果、臼歯を欠損した *App^{NL-G-F}* マウスは、認知機能や平衡感覚が著しく失われるだけでなく、行動レベル、分子レベルの両方で明らかに攻撃性が向上していることが明らかとなった。認知機能が低下した患者は攻撃的になることが知られているが、これはすべての認知症患者に見られる症状ではない。AD 患者の 90%以上が、焦燥感、攻撃性、過敏性、抑制、不安、抑うつ、無気力、妄想、幻覚などの著しい認知症行動・心理症状(BPSD)を呈し、攻撃性の頻度は 13%から 50.4%であり、認知機能の低下の程度が高いほどその割合は高くなる。生体モノアミンである 5-hydroxytryptamine(5-HT)またはセロトニンは、神経伝達物質および神経調節物質として作用し、認知機能の低下や他の複数の BPSD 領域と関連している。セロトニンは、動物およびヒトにおいて攻撃性の制御に強く関与しており、攻撃性とセロトニンの関連は AD 患者にも及んでいる。AD では、セロトニン作動性伝達の全体的な違いが生じるが、ここでの 5-HT 受容体の回路特異的な変化が AD の BPSD と関連する可能性がある。本研究で高い攻撃性を示した APPE 群のマウスの海馬では、MAOA と CDH13 が高値であったことから、認知症における攻撃性の指標となる可能性が示唆された。*App^{NL-G-F}* マウスにおいて、歯の喪失によって CDH13 と MAOA が上昇し、HPA 軸における脳の 5-HT 系が障害される可能性が考えられた。

2) 三叉神経賦活による脳老化抑制の解析

咀嚼機能の低下に起因する脳機能障害の原因として、歯根膜の侵害受容器への刺激が弱まることが考えられている。そのため、三叉神経を介して大脳皮質や海馬に投射される信号が弱まることで、脳機能に変化が生じる可能性がある。TRPV1 は口腔粘膜を含む消化管粘膜に広く分布しているため、口腔から摂取されたカプサイシンは粘膜表面の受容体を活性化する。そして、そのインパルスは脊髄、延髄を経て視床、視床下部、中脳に伝わり、海馬、大脳皮質に投射され、遺伝子発現や脳機能に反映される。したがって、今回観察されたカプサイシンの効果は、歯根膜の刺激性の低下をカプサイシンの刺激で補ったことに起因する可能性がある。

臨床的な治療目標は、臼歯の喪失による認知機能の低下を防ぐために、予防処置や口腔ケア、補綴治療、すなわち義歯の装着やインプラント埋入によって咀嚼機能を向上させることがほとんどである。しかし、認知症患者や寝たきり患者は年々増加しており、補綴治療は今後ますます困難になっていくと考えられる。本研究では、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンが、嚥下反射の促進や AD 治療薬としての可能性だけでなく、認知機能の低下や口腔補綴治療が困難な患者に対して有効である可能性を示唆した。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

2021 年度

- 1) Giri S, Takada A, Paudel D, Yoshida K, Furukawa M, Kuramitsu Y, Matsushita K, Abiko Y, Furuichi Y. An in vitro senescence model of gingival epithelial cell induced by hydrogen peroxide treatment. *Odontology* volume 110;44–53, 2021.
- 2) Song LT, Tada H, Nishioka T, Nemoto E, Imamura T, Potempa J, Li CY, Matsushita K, Sugawara S. *Porphyromonas gingivalis* Gingipains-Mediated Degradation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Leads to Delayed Wound Healing Responses in Human Endothelial Cells. *J Innate Immun*, 1-14, 2021.
- 3) Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, Ishimaru N, Matsushita K. The Priming Potential of Interferon Lambda-1 for Antiviral Defense in the Oral Mucosa. *Inflammation*, 1–14, 2022.

2022 年度

- 1) Furukawa M, Matsuda K, Aoki Y, Yamada M, Wang J, Watanabe M, Kurosawa M, Shikama Y, Matsushita K. Analysis of senescence in gingival tissues and gingival fibroblast cultures. *Clin Exp Dent Res*, 8(4):939-949, 2022.
- 2) Furukawa M, Tada H, Wang J, Yamada M, Kurosawa M, Satoh A, Ogiso N, Shikama Y, Matsushita K. Molar loss induces hypothalamic and hippocampal astrogliosis in aged mice. *Sci Rep*, 12(1):6409, 2022.
- 3) Tada H, Kawahara K, Osawa H, Song LT, Numazaki K, Kawai J, Onoue S, Nishioka T, Nemoto E, Matsushita K, Sugawara S. *Hericium erinaceus* ethanol extract and ergosterol exert anti-inflammatory activities by neutralizing lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 636(Pt 2):1-9, 2022.

2023 年度

- 1) Furukawa M, Tada H, Raju R, Wang J, Yokoi H, Yamada M, Shikama Y, Matsushita K. Long-Term Soft-Food Rearing in Young Mice Alters Brain Function and Mood-Related Behavior. *Nutrients*, 15(10), 2397, 2023.
- 2) Furukawa M, Tada H, Raju R, Wang J, Yokoi H, Ikuyo Y, Yamada M, Shikama Y, Matsushita K. Long-Term Capsaicin Administration Ameliorates the Dysfunction and Astrogliosis of the Brain in Aged Mice with Missing Maxillary Molars. *Nutrients*, 15(11), 2471, 2023.
- 3) Yokoi H, Furukawa M, Wang J, Aoki Y, Raju R, Ikuyo Y, Yamada M, Shikama Y, Matsushita K. Erythritol can inhibit the expression of senescence molecules in mouse gingival tissues and human gingival fibroblasts. *Nutrients*, 15(18):4050,

- 2023.
- 4) Saji N, Ishihara Y, Murotani K, Uchiyama A, Takeda A, Sakurai T, Matsushita K. Cross-sectional analysis of periodontal disease and cognitive impairment conducted in a memory clinic: the Pearl study. *J Alzheimers Dis*, 96(1):369-380, 2023.
 - 5) Tada H, Nishioka T, Ishiyama R, Song LT, Onoue S, Kawahara K, Nemoto E, Matsushita K, Sugawara S. Macrophage migration inhibitory factor-mediated mast cell extracellular traps induce inflammatory responses upon *Fusobacterium nucleatum* infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 674:90-96, 2023.
 - 6) Yokoi H, Wang J, Ikuyo Y, Yamada M, Shikama Y, Furukawa M, Matsushita K. Long-term sorbitol consumption affects the hippocampus and alters cognitive function in aged mice. *Genes to Cells*, 1356-9597, 2024.
 - 7) Furukawa M, Yokoi H, Wang J, Ikuyo Y, Tada H, Yamada M, Shikama Y, Matsushita K. Premature gray hair development in the interbrow region owing to the loss of maxillary first molars in young mice. *Genes to Cells*, 2024 Feb 20. doi: 10.1111/gtc.13107. Online ahead of print.
 - 8) Numazaki K, Tada H, Nishioka T, Nemoto E, Matsushita K, Mizoguchi I, Sugawara S. Neutrophil extracellular traps inhibit osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press.
 - 9) Furukawa M, Tada H, Raju R, Wang J, Yokoi H, Yamada M, Shikama Y, Saito T, Saido T, Matsushita K. Effects of Tooth Loss on Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia in App Knock-in Mice. *Journal of Oral biosciences*, 2024 Mar 21:S1349-0079(24)00074-4. doi: 10.1016/j.job.2024.03.005. Online ahead of print.
 - 10) Giri S, Takada A, Paudel D, Uehara O, Kurashige Y, Kuramitsu Y, Furukawa M, Matsushita K, Arakawa T, Nagasawa T, Abiko Y, Furuichi Y. Oral infection with *Porphyromonas gingivalis* augmented gingival epithelial barrier molecules alteration with aging. *J Oral Biosci*, 66(1):126-133, 2024.

2. 学会発表

2021 年度

- 1) 松下健二. シンポジウム 2 1 老いの入り“口”から認知症を読み解く 歯周病・口腔細菌と認知症の関連性の update. 第 21 回日本抗加齢医学会総会, 2021 年 6 月 27 日, 京都
- 2) 古川匡恵、四釜洋介、松下健二. 軟食飼育が若齢マウスの視床下部および海馬に及

- ぼす影響. 第 63 回秋歯科基礎医学会学術大会、2021 年 10 月 9～11 日, web 開催
- 3) Giri S, Takada A, Nagano K, Paudel D, Yoshida K, Furukawa M, Kuramitsu Y, Matsushita K, Abiko Y, Furuichi Y. An in vitro senescence model of gingival epithelial cell induced by hydrogen peroxide treatment and reversal of senescence by fisetin. 第 63 回秋歯科基礎医学会学術大会、2021 年 10 月 9～11 日, web 開催
 - 4) Tada H, Song L, Imamura T, Potempa J, Matsushita K, Sugawara S. Proteolysis of PAI-1 by *P. gingivalis* gingipains leading to delayed wound healing responses in endothelial cells. 16th Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society, 2021 年 10 月 12～15 日, 神戸
 - 5) 四釜洋介、古川匡恵、松下健二. III 型 interferon(IFN)である interleukin(IL)-29 の口腔粘膜における抗ウイルス応答増強作用. 第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 16 日, 名古屋
 - 6) 多田浩之、松下健二、根本英二. *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによる血管内皮細胞の PAI-1 分解と創傷治癒遅延. 第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 16 日, 名古屋
 - 7) 古川匡恵、田淵拓也、山田三良、四釜洋介、松下健二. 歯周組織の細胞老化について ～若齢および老齢マウスと培養ヒト歯肉線維芽細胞における検討～. 第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 15～16 日, Web 開催
 - 8) Giri S, Takada A, Paudel D, Yoshida K, Furukawa M, Kuramitsu Y, Matsushita K, Abiko Y, Furuichi Y. Establishment of an in vitro senescence model of gingival epithelial cell induced by hydrogen peroxide treatment and reversal of senescence by fisetin. 第 64 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2021 年 10 月 15～16 日, web 開催
 - 9) 萩原真、永野忠聖、松下健二. 玄米中に含まれる成分の免疫力活性化機構の解析. 日本農芸化学会 2022 年度大会, 2022 年 3 月 15 日, Web 開催

2022 年度

- 1) 石原裕一、伊土美南海、新明桃、湯之上志保、武儀山みさき、細久保和美、與那覇佳織、内山章、古川匡恵、佐治 直樹、松下健二. 認知機能低下および認知症と歯周病病態との関連性 -もの忘れ外来患者を対象とした観察研究 (1) - 第 65 回春季日本歯周病学会学術大会, 2022 年 6 月 3～4 日, 東京
- 2) 伊土美南海、石原裕一、新明桃、湯之上志保、武儀山みさき、細久保和美、與那覇佳織、内山章、古川匡恵、佐治 直樹、松下健二. 歯周病病態と口腔機能低下との関連性 -もの忘れ外来患者を対象とした観察研究 (2) - 第 65 回春季日本歯周病学会学術大会, 2022 年 6 月 3～4 日, 東京
- 3) 新明桃、石原裕一、伊土美南海、湯之上志保、武儀山みさき、細久保和美、與那覇

- 佳織、内山章、古川匡恵、佐治 直樹、松下健二. 口腔機能低下と認知機能の関連性-もの忘れ外来患者を対象とした観察研究 (3) - 第 65 回春季日本歯周病学会学術大会, 2022 年 6 月 3~4 日, 東京
- 4) 山田 (古川) 匡恵、松下健二. 歯の喪失は APPKI マウスの認知症の行動・心理症状を悪化させる. 第 22 回抗加齢医学会総会, 2022 年 6 月 17~19 日, 大阪
- 5) 松下健二. 歯周病原細菌と認知症. 基礎研究シンポジウム「ここまでわかった、口腔機能と認知症の関係—基礎研究からのアプローチ」. 第 3 回認知症と口腔機能研究会学術集会, 2022 年 8 月 7~8 日, web 開催
- 6) 多田浩之、西岡貴志、松下健二、菅原俊二. *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインはヒト血管内皮細胞の PAI-1 を分解し、血管内皮の創傷治癒を遅延させる. 第 64 回歯科基礎医学会学術大会, 2022 年 9 月 17~19 日, 徳島
- 7) 沼崎研人、多田浩之、松下健二、溝口到、菅原俊二. Neutrophil extracellular traps による RANKL 誘導性破骨細胞の分化制御. 第 64 回歯科基礎医学会学術大会, 2022 年 9 月 17~19 日, 徳島
- 8) 遠山学、多田浩之、沼崎研人、松下健二、溝口到、菅原俊二. *Porphyromonas gingivalis* 線毛は、LPS によるヒト単球のインターロイキン-6 産生を相乗的に誘導する. 第 64 回歯科基礎医学会学術大会, 2022 年 9 月 17~19 日, 徳島
- 9) 四釜洋介、古川匡恵、松下健二. 唾液腺および口腔粘膜上皮細胞における ACE2 発現: AMPK の役割. 第 64 回歯科基礎医学会学術大会, 2022 年 9 月 17~19 日, 徳島
- 1 0) Matsushita K. Exploring the Association Between Oral Health and Dementia. The 17th International Symposium on Geriatrics and Gerontology, Dec 3, 2022, Obu.
- 1 1) 萩原真、永野忠聖、松下健二. 玄米中に含まれる LPS によるファゴサイトーシス活性化機構の解析. 第 45 回日本分子生物学会年会, 2022 年 12 月 2 日, 千葉
- 1 2) 萩原真、松下健二. オルニチンによる免疫力活性化機構の解析. 日本農芸化学会 2023 年広島大会, 2023 年 3 月 14 日, 広島

2023 年度

- 1) 湯之上志保、石原裕一、武儀山みさき、細久保和美、伊土美南海、野原佳織、新明桃、内山 章、松下健二. もの忘れ外来患者の認知機能は口腔清掃状態と相関する. 第 72 回日本口腔衛生学会学術大会, 2023 年 5 月 20 日, 大阪
- 2) 山田 (古川) 匡恵、横井春奈、青木 優、杉山大二郎、王 静舒、幾代以子、嶋田智紀、松下健二. エリスリトールはマウス歯周組織およびヒト歯肉線維芽細胞における老化分子の発現を抑制する. 第 23 回抗加齢医学会, 2023 年 6 月 11 日, 東京
- 3) 幾代以子、王 静舒、山田 (古川) 匡恵、横井春奈、松下健二. カプサイシンは *Streptococcus mutans* の増殖を抑制する~in vitro での解析~. 第 23 回抗加齢医学会, 2023 年 6 月 11 日, 東京

- 4) Furukawa M, Yokoi H, Ikuo Y, Matsushita K. Capsaicin intake suppresses the increase of GFAP in the hippocampus. IAGG Asia Oceania Regional Congress2023, Jun 12, 2023, Yokohama
- 5) 松下健二. 口腔の健康と認知症の関連性. 公募シンポジウム『口腔疾患がアルツハイマー病分子病態に及ぼす影響の分子メカニズムの検討』. 第64回日本神経病理学会・第66回日本神経科学会合同大会, 2023年7月6日, 神戸
- 6) 横井春奈, 古川匡恵, 青木優, 王 静舒, 幾代依子, 四釜洋介, 松下健二. エリスリトールはマウス歯肉およびヒト歯肉線維芽細胞における老化分子の発現を抑制する. 第65回歯科基礎医学会学術大会, 2023年9月16日, 東京
- 7) リュウ ドウシン, 多田浩之, 西岡貴志, 松下健二, 菅原俊二. 歯周病マウスモデルにおける *Porphyromonas gingivalis* と好中球による脳機能障害の検討. 第65回歯科基礎医学会学術大会, 2023年9月16日, 東京
- 8) 四釜洋介, 古川匡恵, 松下健二. メトホルミンによる唾液・唾液腺における ACE2, TMPRSS2, IgA 発現の制御. 第65回歯科基礎医学会学術大会, 2023年9月18日, 東京
- 9) 幾代以子, 横井春奈, 古川匡恵, 王 静舒, 四釜洋介, 松下健二. 老化歯肉におけるカプサイシンの β -defensin 誘導能 —老齢マウスと老化歯周細胞培養系における解析—. 第65回歯科基礎医学会学術大会, 2023年9月18日, 東京
- 1 1) 四釜洋介, 松下健二. メトホルミンによる唾液腺機能変容を介した新型コロナウイルス感染制御の可能性. 第28回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2023年12月2日, 名古屋
- 1 2) 多田浩之, 西岡貴志, 松下健二. 歯周病原細菌プロテアーゼと NETs のクロストークによる脳機能障害. 第28回日本エンドトキシン・自然免疫研究会, 2023年12月1日~2日, 名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし