

歯周病がアルツハイマー病の分子病態

ならびに認知機能障害を増悪させる機序の解明（26-21）

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

本研究では AD 発症における歯周病の関与に着目し、脳外に病態の首座を持つ歯周病がいかんして脳内 AD 分子病態に関与するかの分子機構を解明し、AD の早期診断・予防・治療法の開発に役立てることを目指す。まず、マウスに歯周病を発症させるための予備実験を遂行し、歯周病関連細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) をマウス口腔内に接種することによって同マウスの歯槽骨に骨吸収を惹起することに成功した。この成果をもとに、歯周病が AD の病態に及ぼす影響を検討するため、アルツハイマー病モデルマウスに *P.g* を感染させた実験的歯周炎モデルを作製し、*P.g* 投与群と非投与群における行動変化および脳内の病態を比較した。その結果、*P.g* 投与群では非投与群に比べてより高度な歯槽骨吸収を認め、歯周病の発症を確認した。*P.g* 投与群では、行動試験においても認知機能の低下を認めた。また、脳内における A β の沈着面積は *P.g* 投与群で有意に広く、A β 量も有意に高かった。次に、歯周病あるいは *P.g* 菌が AD 病態の増悪する機序の一端を明らかにするために、同マウスから採取した血液および脳組織について詳細な解析を行なった。その結果、*P.g* 投与群マウスの血液中には非投与群のそれに比べ有意に高い *P.g* 抗体価の上昇が認められるとともに、血中リポ多糖 (LPS) の上昇も認められた。さらに、*P.g* 投与群の脳内では、非投与群と比較して有意に高く IL-1 β および TNF- α の増加が認められた。また、*P.g* 投与群の脳内には、LPS の存在も確認された。以上の結果より、歯周病はアルツハイマー病の病態増悪に関与している可能性が示唆された。さらに、*P.g* 菌あるいはその他の菌が血行性に脳内に到達し、脳内に炎症反応を惹起することで AD の病態を増悪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

道川 誠 名古屋市立大学 教授

石原 裕一 松本歯科大学 教授

田沼 順一 朝日大学 教授

A. 研究目的

超高齢社会に突入した我が国では認知症患者数は460万人を越え、MCIを含めると800万人を超えると推計されている。認知症の発症予防・治療法開発は急務であるが、その半数以上を占めるアルツハイマー病（AD）の根本的な予防・治療法はない。病因分子A β 沈着は認知機能の正常な高齢者にも認められること、最近のアミロイド・イメージング研究から、認知機能障害発症前に脳内A β 蓄積が出現することが明らかになり、ADをA β 蓄積の慢性疾患として捉えることが可能となっている。こうした考え方に一致して、近年孤発性ADの後天的危険因子として糖尿病・脂質異常症や歯周病といった生活習慣病との関連性が指摘されている。我々は、これまでAD病態形成における歯周病の関与に着目し、脳外に病態の首座を持つ歯周病が脳内AD分子病態に関与する可能性についてマウスモデルで検討してきた。その結果、歯周病原細菌*Porphyromonas gingivalis*の接種によって歯周病を発症したAPP-Tgマウスにおいて、認知機能が低下するとともに、脳内A β 沈着の増加および炎症性サイトカインの増加が認められることを明らかにし、歯周病がアルツハイマー病を増悪する可能性を確認した。本研究は、これまでの成果を踏まえ歯周病がアルツハイマー病を増悪する機序を *in vitro* および *in vivo* の実験系で明らかにするものである。本年度は、歯周病発症J20マウスについて、病理組織学的、細菌学的、生化学的な解析をさらに進めた。

B. 研究方法

1) APP-Tg マウスにおける歯周病の惹起

歯周病群は *P.g* 菌 (*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 株) を 2.5% CMC (Carboxy methylcellulose) に懸濁して *P.g* 菌懸濁液 (1×10^{10} CFU) を 1 日おきに計 5 回、58 および 62 週齢マウスの口腔内に直接投与した。その後、5 週間飼育することにより実験的歯周炎を惹起した。なお、細菌懸濁液の代わりに PBS で同様の処置を施したものをコントロール群とした。

2) 歯周組織の評価

69 週齢で屠殺したマウスの歯周組織を採取し、同組織を中性ホルマリンで固定後、病理組織切片を作成した。同切片をヘマトキシリン・エオジンで染色し、炎症の程度を評価した。

3) マウス血清の解析

歯周病群、対照群それぞれのマウスから採取した血液から血清を分離した。その後、同血清中の *P.g* 菌抗体価、炎症性サイトカイン濃度 (IL-1 β 、TNF- α)、および消化管の透過性亢進の指標となる zonulin-1 (ZO-1) 濃度を ELISA 法でそれぞれ測定した。また、血清中のエンドトキシン濃度をリムルス法で測定した。

4) 脳内の *P.g* 菌およびその毒素の測定

マウス脳抽出液中の *P.g* 菌の有無を qPCR 法で検討した。また、同抽出液中のエンドトキシン濃度をリムルス法で定量した。

5) 腸管内 *P.g* 菌の検討

P.g 菌投与 3 時間および 1 週間後マウスの腸管洗浄液を回収した。その後、塗抹法および qPCR 法で同菌の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、愛知学院大学歯学部動物指針に従って行われた。また、本実験は同大学動物実験委員会での動物実験倫理審査規定により承認された (動物実験計画承認番号 : AGUD159 号、229 号)。

C. 研究結果

歯周病群は *P.g* 菌を APP-Tg マウスの口腔内に投与した結果、歯槽骨の吸収を伴う歯周病を惹起することができた。同歯周病惹起マウスの歯周組織をヘマトキシリン・エオジン染色で観察したところ、*P. gingivalis* 非投与群と比べ有意に強い炎症像はみられなかった。次に、歯周病群、対照群それぞれのマウスから採取した血清中の *P.g* 菌抗体価、炎症性サイトカイン濃度 (IL-1 β 、TNF- α)、および消化管の透過性亢進の指標となる zonulin-1 (ZO-1) 濃度を ELISA 法でそれぞれ測定した。また、血清中のエンドトキシン濃度をリムルス法で測定した。その結果、*P.g* 菌投与群の血清中に有意に高い同菌に対する抗体価の上昇が認められた。一方、血中の IL-1 β および TNF- α の有意な増加は認められなかった。*P.g* 菌投与群の血清中には、コントロール群に比べ有意に高いエンドトキシン活性が認められるとともに、ZO-1 濃度の有意な増加が認められた。マウス脳抽出液中の *P.g* 菌の有無を qPCR 法で検討した。また、同抽出液中のエンドトキシン濃度をリムルス法で定量した。その結果、*P.g* 菌投与マウスの脳内に非投与群に比べ エンドトキシンの有意に高い上昇が見られた。一方、PCR の結果では脳内の同菌が存在を確認することはできなかった。次に、*P.g* 菌投与マウス腸管洗浄液中の *P.g* 菌の有無を塗抹法および qPCR 法で同菌の有無を検討した。その結果、3 時間後の腸管洗浄液中に生きた *P.g* 菌が存在することが確認された。また、同菌は投与 1 週間後の洗浄液中にも存在していた。

D. 考察と結論

アルツハイマー病の病態増悪は歯周組織の慢性炎症が脳内に波及することによって起こるものと当初予想していたが、今回の結果から *P. gingivalis* が消化管を経由して腸管に達し、そこで腸内環境に影響を及ぼすことによって、最終的に脳内に毒素や炎症が波及する可能性が出てきた。近年、食事や抗生物質などが腸内細菌叢に変化をもたらし、それが糖尿病や肥満といった生活習慣病の増悪に寄与することが示唆されつつある。口腔清掃不良によって増加した口腔内細菌は食物や唾液とともに腸管に達し、腸内環境に変化をもたらすと同時に全身に影響をおよぼす可能性がある。今後、この機序が明らかになることによって、口腔の健康が全身に及ぼす影響に関する全く新しいパラダイムを提供することができる。加えて、口腔ケアを行う意義の科学的根拠を提供することになり、口腔ケアが真に安価で有効な生活習慣病および認知症の予防法として確立され、国民の福祉とともに医療費の削減に大いに貢献できると考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato Y, Hagiwara M, Ishihara Y, Isoda R, Sugiura S, Komatsu T, Ishida N, Noguchi T and Matsushita K:
TNF- α augmented *Porphyromonas gingivalis* invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1.
BMC Microbiology, 14:229, 2014.
- 2) Hagiwara M and Matsushita K:
Epigallocatechin gallate suppresses LPS endocytosis and nitric oxide production by reducing Rab5-caveolin-1 interaction.
Biomed Res. 35:145-151, 2014.

2. 学会発表

- 1) Wang J, Kobayashi K, Hagiwara M, Ishida N, Matsushita K:
Analysis of the Regulatory Mechanism by which Shear Stress and Stretch Force Induce Nitric Oxide Production in Endothelial Cells.
ASCB/IFCB meeting. Dec 9, 2014, Philadelphia, USA
- 2) Hagiwara M, Ishida N, Wang J, Matsushita K:
Nitric oxide regulates phagocytosis by S-nitrosylation of Rab5.
ASCB/IFCB meeting. Dec 8, 2014, Philadelphia, USA

- 3) 多田浩之、松下健二、長岡 功、高田春比古:
 Porphyromonas gingivalis ジンジパインは IL-33 誘導を介してヒト歯肉上皮細胞の CAP18/LL-37 産生をダウンレギュレーションする
 第 20 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2014/12/6 東京
- 4) 萩原真、石田直之、王静舒、松下健二 :
 NO 修飾のファゴサイトーシスへの関与
 第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/27 横浜
- 5) 王静舒、小林かおる、萩原真、石田直之、松下健二 :
 ずり応力と引張応力による血管内皮細胞のシグナル伝達機構の解析
 第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/26 横浜
- 6) 徳田雅行、川井絢矢、作田哲也、小山徹、宮下桂子、藤澤真理、江本真規子、森元陽子、鳥居光男、松下健二 :
 ヤマブシタケ抽出物の抗菌活性ー試験管内およびヒト口腔内における検討
 日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会 2014/10/30 山形市
- 7) Wang J, Kobayashi K, Hagiwara M ,Ishida N, Matsushita K :
 Analysis of Intracellular Signal Transduction Induced by Shear Stress and Stretch Force in Endothelial Cell Cultures.
 15th IUBMB -24th FAOBMB-TSBMB. Oct 23-24, 2014, Taipei, Taiwan.
- 8) Hagiwara M, Ishida N, Wang J, Matsushita K :
 Nitric oxide regulates phagocytosis.
 15th IUBMB -24th FAOBMB-TSBMB. Oct 21-22, 2014, Taipei, Taiwan.
- 9) 多田浩之、松下健二、高田春比古 :
 Porphyromonas gingivalis によるヒト歯肉上皮細胞の LL-37 発現誘導は IL-33 により下方制御される
 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 9/27/2014 福岡
- 1 0) Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Kato Y, Hagiwara M, Michikawa M, Noguchi T, Matsushita K :
 Periodontitis Induced by Porphyromonas Gingivalis Infection Exacerbates Features of Alzheimer's Disease in Transgenic Mice.
 100th Annual Meeting of American Academy of Periodontology.
 Sep 20, 2014, San Francisco, USA.
- 1 1) 萩原真、石田直之、王静舒、松下健二 :
 NO は化学修飾を介してファゴサイトーシスを調節する
 光イメージングに興味のある若手研究者の会 2014/9/6-7 明石

- 1 2) Yamada K, Kanekura T, and Matsushita K:
High concentration glucose ameliorates atopic dermatitis through active HMGB1 release.
The 12th Congress of the European Society of Contact Dermatitis.
June 27, 2014, Barcelona, Spain.
- 1 3) 萩原真、石田直之、王静舒、松下健二 :
細菌感染防御機構における一酸化窒素の新規な作用機構
第9回トランスポーター研究会 2014/6/14-15 名古屋
- 1 4) Makoto Hagiwara, Ryutaro Isoda, Yoshiko Kato, Naoyuki Ishida, Jingshu Wang and Kenji Matsushita :
How is phagocytosis regulated by NO?
The 66th Annual Meeting of Japan Society for Cell biology.
June 11, 2014. Nara

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