

長寿医療研究開発費 平成27年度 総括研究報告

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

本研究ではアルツハイマー病 (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。*P. g* LPS は、神経細胞から A β の産生を誘導すること、さらにミクログリア培養系において、A β と共同して炎症サイトカインの産生を増強することが明らかとなった。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

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、脳外に病態の首座を持つ歯周病がいかにして脳内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的とする。慢性炎症性疾患である歯周病との対照試験として、抜歯や咀嚼機能障害などの口腔機能低下の病態を検討する。

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。

6) *P. g* LPS による A β 産生誘導

各種濃度の *P. g* LPS をマウス神経細胞培養系に添加し 24 時間培養した。その後、培養上清を回収し、同上清中の A β 40 および A β 42 の量を ELISA で測定した。

7) *P. g* LPS による炎症サイトカインの誘導

A β 42 で前処理したミクログリア培養系に各種濃度の *P. g* LPS を添加し、24 時間培養した。その後、上清中の IL1 β および INF- α の濃度を ELISA で測定した。

8) 抜歯および流動食による認知機能低下との比較

慢性炎症性疾患である歯周病との対照試験として、抜歯や咀嚼機能障害などの口腔機能低下の病態の検討を行なった。咀嚼機能低下モデルとして、APP-Tg マウス、野生型マウスを用いて、①臼歯を抜歯し咬合接触がない状態にした、②三叉神経切断実験により口腔からの刺激を遮断したマウスを作製した、③リキッドダイエット食で飼育する、という条件下で飼育し、アルツハイマー病の分子病態 (A β 沈着、シナプス脱落、細胞脱落、タウ蛋白質のリン酸化) の解析および認知機能を解析した。

(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

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、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。その結果、*P. g* 菌投与マウスの歯周組織においては、歯槽骨吸収の増加はみられるものの有意な炎症像は認められなかった。次に、歯周病群、対照群それぞれのマウスから採取した血液から血清を分離した後、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。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。次に、マウスの脳抽出液中の *P. g* 菌の有無を qPCR 法で検討するとともに、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同菌が存在していることが確認された。加えて、*P. g* 菌投与マウスの脳内に有意に高いエンドトキシン活性が認められた。*P. g* LPS は、神経細胞から A β の産生を誘導すること、さらにミクログリア培養系において、A β と共同して炎症サイトカインの産生を増強することが明らかとなった。

慢性炎症性疾患である歯周病との対照試験として、抜歯や咀嚼機能障害などの口腔機能低下の病態の検討を行なった。その結果、臼歯を抜歯したマウスでは、認知機能の低下は見られたが、脳内 A β 沈着の増悪は認めなかった。一方、液状食で飼育したマウスでも、認知機能障害が認められたが、脳内 A β 沈着の増悪は認めなかった。

D. 考察と結論

本研究の結果から、*P. g* 菌の脳内への伝搬経路は歯周組織から血行性に伝搬されるだけでなく、腸管経由でも伝搬される可能性が考えられた。具体的には、口腔の *P. g* 菌は腸管に達した後、腸内細菌叢に変調をもたらす。その結果、腸管の透過性が亢進し、腸管から血管内に漏れ出した細菌やその毒素は血行性に脳に到達して、マウスの病態に影響をおよぼす可能性が推察された。今後さらにその可能性を詳細に解析するとともに、脳内に移行した同菌やその毒素が脳内の炎症反応を増悪する機序および神経細胞を障害する機序についてさらに検討する予定である。

また、歯牙欠損や液体食摂取による咀嚼機能低下は、AD 分子病態には影響せず、何らかのメカニズムにより BDNF カスケードを障害し、その結果、海馬神経細胞数の低下を誘発して認知機能障害を来す可能性があると考えられる。すなわち、「歯の喪失」「咀嚼機能低下」はアミロイド・カスケード仮説とは異なるメカニズムで AD の分子病態に影響を及ぼすことが明らかとなり、「歯の喪失」と AD 発症との関連を解明するうえに有益な所見を集積することができた。ただし、この場合でも AD の発症閾値を低下させるため、AD のリスクになる可能性が考えられた。

本研究の結果から、歯周病原細菌の感染は、アルツハイマー病の分子病態を増悪すること、またその一機序として歯周病原細菌の毒素が脳内で神経炎症を惹起する事によることが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 松下健二

歯周病と全身の健康. 第2部 8) アルツハイマー病.

特定非営利活動法人日本歯周病学会 (編), 特定非営利活動法人日本歯周病学会,
114-116, 2016

2) Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Kato Y, Isoda R, Hagiwara M, Michikawa M,
Noguchi T, and Matsushita K

Periodontal disease as a possible risk factor for Alzheimer's disease.

In Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface 2014 (Sasaki K, Suzuki O,
and Takahashi N eds). Springer Japan, Chapter 26:237-243, 2015

3) Tada H, Shimauchi H, Takada H, and Matsushita K

Possible roles of IL-33 in periodontal diseases: Porphyromonas gingivalis induced IL-33 in
human gingival epithelial cells.

In Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface 2014 (Sasaki K, Suzuki O,
and Takahashi N eds). Springer Japan, Chapter 31:293-304, 2015

4) 松下健二

腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 第11章 認知症.

シーエムシー出版, p176-182, 2015

5) 松下健二

質疑応答 (歯科・口腔外科) ー加齢による歯と血管の変化ー.

週刊日本医事新報, 4754:61, 2015

6) 松下健二

機能的口腔ケアのすすめ.

へるすあっぷ 21, 1:40, 2015

7) Matsushita K

Periodontal Disease as a Possible Risk Factor for Alzheimer's Disease.

Proceedings of 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, Hiroshima
University, p25-27, 2015

2. 学会発表

- 1) J.Wang, M.Hagiwara, A.Takada, K.Matsushita
Dynamics of Nitric Oxide and Ca²⁺ Induced by Short Exposure to Mechanical Stresses in Human Endothelial Cell Cultures.
第 8 回 NAGOYA グローバルリトリート, Feb 12, 2016, Obu, Japan.
- 2) J.Wang, M.Hagiwara, A.Takada, K.Matsushita
Correlation between Dynamics of Nitric Oxide and Ca²⁺ Induced by Short Exposure to Mechanical Stresses in Human Endothelial Cell Cultures.
ASCB2015, Dec 15, 2015, San Diego, USA.
- 3) TOKUDA MASAYUKI, KAWAI JUNYA, SAKUTA TETSUYA, OYAMA TORU, MIYASHITA KEIKO, EMOTO MAKIKO, MORIMOTO YOKO, TORII MITSUO, MATSUSHITA KENJI
Antimicrobial effects of Hericium erinaceus extracts. -In vitro and in vivo studies.
4th International Conference on Probiotics, Functional and Baby Foods, Nov 5, 2015, Valencia, Spain.
- 4) Matsushita K
Periodontal Disease as a Possible Risk Factor for Alzheimer's Disease.
6th Hiroshima conference, Oct 23, 2015, Hiroshima.
- 5) Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Hagiwara M, Michikawa M, Matsushita K
Porphyromonas gingivalis infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice.
Europerio 8, Jun 4, 2015, London, UK.
- 6) 松下健二、石田直之、石原裕一、多田浩之、王 静舒、高田鮎子、石田和人、道川 誠
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。
第 21 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会総会, 2015 年 12 月 5 日, 東京
- 7) 多田浩之、高瀬 彩、松下健二、高田春比古
Porphyromonas gingivalis ジンジパインによるヒトマスト細胞からの IL-31 産生誘導。
第 21 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会総会, 2015 年 12 月 5 日, 東京
- 8) 王 静舒、萩原 真、高田鮎子、松下健二
短時間の機械的ストレスによるヒト血管内皮細胞内一酸化窒素とカルシウムイオンの動態。
第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸

- 9) 萩原 真、多田浩之、石田直之、王 静舒、高田鮎子、松下健二
NOによるニトロシル化修飾を介したファゴサイトーシス促進機構。
第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月1日, 神戸
- 10) 山田きよ子、王 静舒、指宿敦子、松下健二、金蔵拓郎
高濃度グルコースの局所塗布はアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける上皮
障害を修復する: HMGB1 関与の可能性。
第45回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会, 2015年11月21
日, 松江
- 11) 高田鮎子、松下健二、萩原真、堀岡悟、古市保志、角屋保徳
310nm 紫外線 LED の口腔内細菌に対する殺菌作用の検討。
第58回秋季日本歯周病学会学術大会, 2015年9月12日, 浜松
- 12) 多田浩之、松下健二、高田春比古
Porphyromonas gingivalis fimbriae による樹状細胞のクロスプレゼンテーション
誘導。
第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年9月12日, 新潟
- 13) 高瀬 彩、多田浩之、西岡貴志、松下健二、高田春比古
Porphyromonas gingivalis はヒトマスト細胞から IL-31 産生を誘導する。
第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年9月12日, 新潟
- 14) 萩原真、多田浩之、石田直之、王静舒、高田鮎子、松下健二
ファゴサイトーシスは NO 修飾によって調節される。
第67回日本細胞生物学会大会, 2015年7月2日, 東京
- 15) 多田浩之、高田春比古、松下健二
Porphyromonas gingivalis によるヒトマスト細胞からの interleukin-31 産生誘導。
第142回日本歯科保存学会春季大会, 2015年6月26日, 北九州
- 16) 萩原真、多田浩之、石田直之、王静舒、高田鮎子、松下健二
食食細胞における NO 産生による食作用促進機構。
第10回トランスポーター研究会年会, 2015年6月21日, 東京
- 17) 多田浩之、松下健二、高田春比古
Porphyromonas gingivalis ジンジバインによる IL33 誘導はヒト歯肉上皮細胞の
LL37/CAP-18 の産生を抑制する。
第58回春季日本歯周病学会学術大会, 2015年5月14日, 幕張
- 18) 松下健二
健やかに老いるためのお口のケアのすすめ ―口腔と全身の関連性―
平成27年度「8020 よい歯の高齢者表彰・お口と身体の講習会」, 2015年11月
23日, 大垣

1 9) 松下健二

長生きを享受するための口腔の重要性.

ライオンオーラルケア研究所セミナー, 2015 年 9 月 29 日, 東京

2 0) 松下健二

長生きを享受するための口腔の重要性.

平成 27 年度歯周病と糖尿病との医科歯科連携講演会, 2015 年 9 月 19 日, 大府

2 1) 松下健二

健康寿命延伸のための口腔の重要性

松本歯科大学イブニングセミナー, 2015 年 7 月 17 日, 松本

2 2) 松下健二

健康寿命延伸のための口腔の重要性

平成 27 年度算定事務講習会ならびに健康管理講習会 (大阪講演), 2015 年 6 月 17 日, 大阪

2 3) 松下健二

健康寿命延伸のための口腔の重要性

平成 27 年度算定事務講習会ならびに健康管理講習会 (東京講演), 2015 年 6 月 10 日, 東京

2 4) 松下健二

医療保険者における歯科保健の重要性 ―口腔と全身の関わりから考える―

第 168 回社会保険静岡特別研究会, 2015 年 4 月 21 日, 静岡

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