

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K11382

研究課題名(和文) 歯周炎組織におけるアルツハイマー病原因分子のネットワーク解析

研究課題名(英文) Gene network analyses of AD in periodontitis-affected gingival tissue

研究代表者

久保田 健彦 (KUBOTA, Takehiko)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：50303136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Amyloid beta (A4) precursor protein (APP), Neprilysin (NEP) が歯周炎罹患歯肉局所で有意に発現上昇していること、発現細胞がAPPがMacrophagesであることに対し、NEPでは炎症の程度によりその発現細胞に違いが見られ好中球、線維芽細胞に発現を認めた。(Archs Oral Biol 2017)。歯周炎罹患歯肉組織の炎症性組織代謝についてマトリックス破壊酵素(MMPs)とインヒビターのバランスからアルツハイマー病関連分子の発現調節に至る一連の研究成果を学術賞受賞を機に総説にまとめた(日本歯周病学会雑誌2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病と認知症の主体であるアルツハイマー病(AD)の関係は、加齢・炎症に伴う歯周-全身関連疾患として注目を集めている。我々は、歯周炎歯肉組織で、AD原因遺伝子のひとつであるAmyloid beta precursor protein (APP)をはじめAD関連遺伝子群が発現亢進していることを発見し、一連の研究を行ってきた。その結果、歯周病とADに共通する生物学的ネットワークから、慢性歯周炎が炎症を介してアルツハイマー病のリスクとなりうる機序の一端を明らかにした。歯周炎の予防・治療が認知症を防ぐとなれば、社会的意義が高く、超高齢化社会に向け極めて重要な研究成果を発信したこととなる。

研究成果の概要(英文)：We have first reported that the significantly elevated expression of Amyloid beta (A4) precursor protein (APP) and Neprilysin (NEP) transcript levels in human periodontitis-affected gingival tissues. The APP-expressing cells in inflamed gingival tissues were mainly macrophages, whereas NEP were expressed in neutrophils and fibroblasts (Archs Oral Biol 2017). The series of our research on inflammatory tissue metabolisms in periodontitis-affected gingival tissues including MMP/TIMP balance and Alzheimer's disease(AD)-related gene networks won the 2018 senior investigator award from Japanese Society of Periodontology. The review paper was published in Journal of JSP 2018.

研究分野：歯周病学

キーワード：医療・福祉 歯周病 アルツハイマー病 遺伝子解析 免疫病理学 ネットワーク解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) はアミロイドタンパクの沈着、タウ蛋白から成る神経原線維の変性を伴う原因不明の脳炎症性疾患である。一方、近年の超高齢化社会に伴い歯周炎有病者が増加するとともに全身疾患を併発する患者が増えている。中でも認知症の原因の大部分を占める AD は本人の QOL を損ねるだけでなく、患者家族や親族にも影響を及ぼし大きな社会問題となっている。アメリカ歯周病学会は、脳・心臓血管障害・糖尿病・リウマチ・悪性腫瘍と同列に加齢・炎症に伴う歯周病関連全身疾患として AD を挙げている (*J Periodontol*, 2010)。しかしながら本疾患と歯周炎との相互関係はレビュー (*Dementia* 2008) を含めいくつかの疫学研究があるものの生物学的関連メカニズムに関しては不明な点が多い。

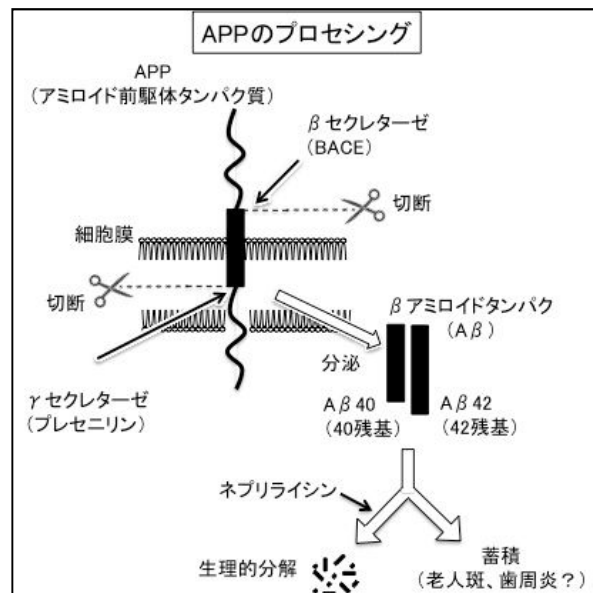
一方、AD は Amiloid beta (A β) precursor protein (APP) タンパクが遺伝・加齢・炎症に伴い蓄積するとことが一因となることが解っており、その合成と分解のバランスと最終的な組織破壊には、Matrix metalloproteinases (MMPs) が重要な役割を果たす (Nature, 2009) ことから、その病態形成に歯周炎との共通項が多い。

我々はこれまで歯周組織破壊必須酵素である MMPs とそのインヒビターである TIMPs について 20 年以上にわたり一連の分子生物学的及び免疫組織化学的研究を行ってきた (*Arch Oral Biol*, 1996, 2008, 2010, 2012, 2013, 2014; *J Periodontal Res*, 1997, 2001, 2011; *J Clin Periodontol*, 2004a, 2004b, *J Periodontol*, 2008, 2011, *Med Oral Pahol* 2008)。その後、歯周炎罹患歯肉局所で、特異的に転写増強される遺伝子群及び抑制される遺伝子群を画期的な DNA Microarray (GeneChip®, Human genome array U133) system を用いて、5 万余の遺伝子の中から網羅的検索を行った。その結果、歯周炎罹患歯肉組織中において、白血球血管内移動経路と同時にアルツハイマー病関連遺伝子群の発現上昇を歯周組織で発見し報告した (*J Periodontal Res* 2011)。

中でも、Amiloid beta (A β) precursor protein (APP), 炎症性サイトカイン interleukin (IL)-1 β , 補体成分 complement component 1 (q subcomponent, A chain) (C1QA) など歯周炎と AD に共通する炎症関連遺伝子群・生物学的経路の亢進及び、慢性歯周組織炎症局所において AD の原因遺伝子の 1 つである APP 発現細胞が浸潤マクロファージであることを蛍光抗体法による二重染色にて突き止めた (Kubota *et al*, *J Dent Res*, Sppl.3404, 2010; *Arch Oral Biol*, 2014)。

右図は、この APP が β タンパクを産生するプロセスを示している。我々は、先の DNA Microarray による歯周炎歯肉の Transcriptome 解析により右図に示すように APP が β -secretase (BACE), γ -secretase (Presenilin: PSEN) により β タンパクを産生し、NEP により分解されるバランスが、歯周炎及び AD における慢性炎症のメカニズム解明の鍵となるのではないかと本研究の着想に至った。

先行研究によって歯周炎罹患歯肉局所での APP の遺伝子発現が亢進する事が明らかとなったが、歯肉組織における APP の代謝についてはまだ報告が無い。A β の前駆体となる APP, A β の代謝に関わる β -secretase (beta-site APP cleaving enzyme (BACE), γ -secretase (Presenilin: PSEN), Neprilysin (NEP) の遺伝子の発現量及びそのバランス、更に歯肉組織内での局在、発現細胞を同定することは、慢性炎症による歯周炎組織破壊と原因不明な加齢関連炎症性疾患である AD とのつながりを考える上できわめて貴重な結果をもたらすことが期待され、研究を行う意義がある。



2. 研究の目的

慢性歯周炎により歯肉組織破壊をきたした病変部における、APP, BACE, PSEN 及び NEP 遺伝子発現量を定量し、そのタンパク組織局在と比較することにより機能を明らかにする。

(1) ヒト重度慢性歯周炎患者歯肉における APP, BACE, PSEN 及び NEP の遺伝子発現レベルを、臨床的健常部位歯肉における遺伝子発現レベルと quantitative reverse-transcription real-time polymerase-chain reactions (qRT-rtPCR)法を用いて比較検討する。

(2) ヒト重度慢性歯周炎歯肉中の APP, BACE, PSEN 及び NEP のタンパク質の局在について特異抗体を用いた免疫組織化学的手法を用いて解析する。

3. 研究の方法

(1) APP, BACE, PSEN及びNEP遺伝子発現レベルの解析

対象：新潟大学医歯学総合病院 歯周病診療室を受診し、重度慢性歯周炎と診断され、インフォームドコンセントの得られた患者より、歯周外科時に歯周ポケット底相当部上皮および結合組織を採取する。直ちに試料はRNA安定化溶液浸漬後-80℃にて保存する。組織解析用試料は4%パラホルムアルデヒドに24時間浸漬固定後PBSに保存する。

qRT-PCR解析：歯肉検体はホモジェナイズ後、全RNAを抽出し逆転写酵素反応によりcDNAを合成する。cDNAをテンプレートにquantitative Real time PCRを行い各遺伝子の発現量をcomparative threshold cycles (Ct) 法により定量する。

統計解析：APP, BACE, PSEN 及び NEP の Ct 値を glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 補正し、各々の相対定量値を算出する。それらについて、慢性歯周炎群と歯肉増殖症群との群間比較を行う。群間比較については Mann-Whitney U test の後に多重比較を行う。統計解析は SPSS 16.0 を用いて行う。また、各検定の有意水準は5%に設定する。

(2) 免疫組織学的解析

パラフィン切片作製：組織解析用試料も歯周外科時に採取し、通法に従ってパラフィンに包埋する。その後、ミクロトームにて5μmに薄切しパラフィン切片を作製する。

組織学的および免疫組織学的検索：通法どおり脱パラフィン、脱水後にヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行う。免疫染色にはH-E染色した切片の連続切片を用いる。1次抗体に抗APP, BACE, PSEN及びNEPポリクローナル抗体を用いる。H-E所見および免疫組織所見は同一部位を写真撮影し、APP, BACE, PSEN及びNEPの歯肉組織中での局在を解析する。

4. 研究成果

本研究は、新潟大学歯学部倫理委員会において承認された計画に基づき行われた(27 - R9-6-11)。インフォームドコンセントの得られた重度歯周炎患者 18 人とコントロールとして非歯周炎患者各 18 名の歯肉組織を対象として、定量 RT-PCR 及び免疫組織学的解析を行った。成果は「APP 及び NEP の歯周炎罹患歯肉組織における遺伝子発現レベル (図 1) および免疫組織化学的局在 (図 2-4)」を当該分野で初めて、歯科基礎分野の国際誌である *Archs Oral Biology* (2017) に報告した。

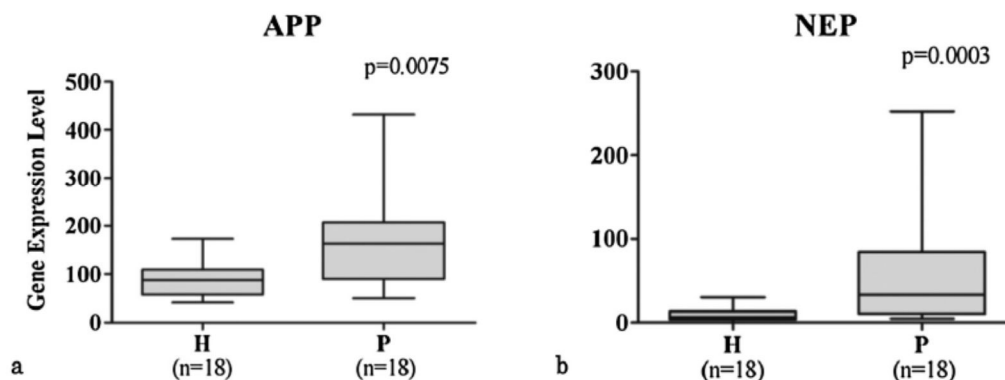


図 1：APP, NEP の遺伝子発現レベルの比較

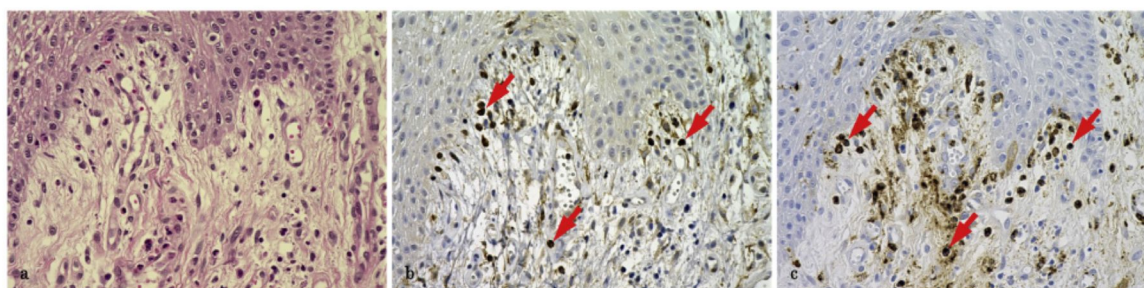


図 2：APP の免疫組織染色 (CD68+ Macrophages に陽性所見を認める)

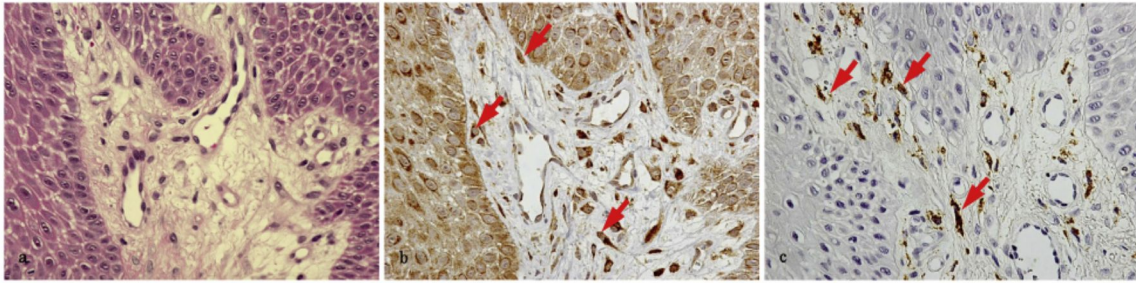


図 3：NEP の免疫組織染色 （fibroblasts に陽性所見を認める）

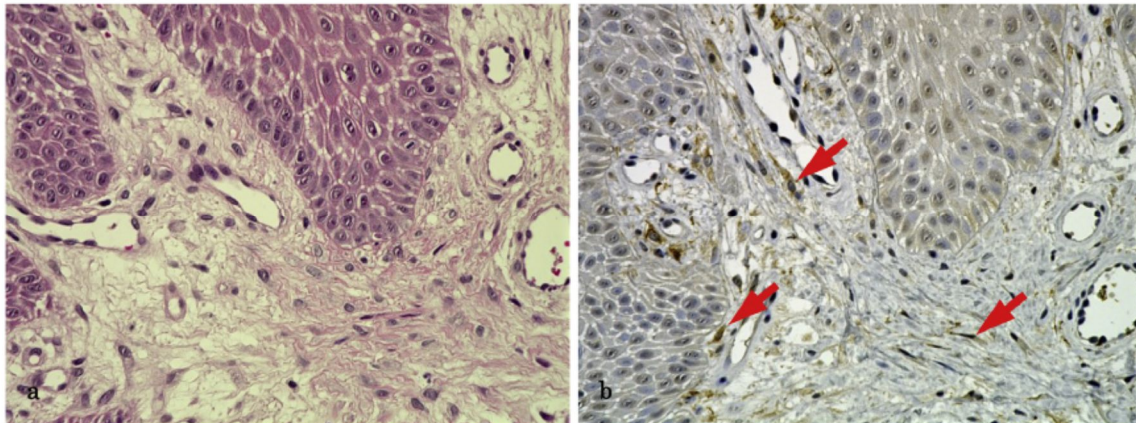


図 4：NEP の免疫組織染色 （Neutrophil elastase + Neutrophils に陽性所見を認める）

本研究の一連の研究成果は、”Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer’s Diseases” (PLOS ONE 2016) をはじめ 2019 年に至るまで当該分野の論文に高頻度に引用され AD と歯周炎を関連づける研究に多大な影響を与えている。（2018 日本歯周病学会学術賞受賞）

第 1 報から得られた結果から継続して BACE, PSEN 遺伝子発現を検討したところ、Unpublished data であるが、歯周組織での発現を確認・定量している。現在までの症例数では炎症による有意な発現量の変動はなく、APP のプロセッシングによる A β タンパク産生については、更なる研究が必要である。

第 2 報は、日本歯周病学会雑誌に MMP/TIMP から歯周炎と AD の関連について総説論文として掲載された。

歯周炎には AD pathway, TLR pathway, Leukocyte Migration pathway に代表される特徴的生物学的 pathways が関与していることが明らかになった。現在、AD 共通の加齢関連慢性炎症惹起遺伝子に着目し本研究課題を進展させるべくさらなる成果を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 久保田 健彦	4. 巻 60
2. 論文標題 歯周炎歯肉組織局所の細胞外マトリックス代謝調節遺伝子発現解析と全身疾患の関連解明	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯周病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 123-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 102329/periodo60.123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nezu A, Kubota T, Maruyama S, Nagata M, Nohno K, Morozumi T, Yoshie H	4. 巻 79
2. 論文標題 Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 35-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2017.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nezu A, Kubota T, Maruyama S, Nagata M, Horimizu M, Nohno K, Hokari T, Morozumi T, Yoshie H	4. 巻 19
2. 論文標題 Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Int Academy Periodontol	6. 最初と最後の頁 S-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nezu A, Kubota T, Maruyama S, Nagata M, Nohno K, Morozumi T, Yoshie H	4. 巻 79
2. 論文標題 Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 35-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2017.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 久保田 健彦
2. 発表標題 歯周炎歯肉組織局所の細胞外マトリックス代謝調節遺伝子発現解析と全身疾患の関連解明
3. 学会等名 日本歯周病学会春季学術大会(第61回) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田健彦
2. 発表標題 専門医が明かす歯周病
3. 学会等名 まちなかキャンパス長岡・講座 医療見聞録II (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保田健彦
2. 発表標題 専門医が明かす歯周病
3. 学会等名 2017年中国ハルビン歯科新発展研究会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nezu A, Kubota T, Maruyama S, Nagata M, Horimizu M, Nohno K, Hokari T, Morozumi T, Yoshie H
2. 発表標題 Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissues
3. 学会等名 6th International Congress of Periodontology of the International Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保田健彦
2. 発表標題 歯と健康 専門医が明かす歯周病
3. 学会等名 2017年度 新潟妙高会 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nezu A, Kubota T, Maruyama S, Nagata M, Horimizu M, Nohno K, Hokari T, Morozumi T, Saku T, Yoshie H
2. 発表標題 Expression of neprilysin in periodontitis-affected gingival tissue
3. 学会等名 102th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 根津 新, 久保田健彦, 丸山 智, 永田昌毅, 堀水 慎, 濃野 要, 保苺崇大, 両角俊哉, 朔 敬, 吉江弘正
2. 発表標題 歯周炎罹患歯肉組織におけるネプリライシンの遺伝子発現レベルと免疫組織局在の解析
3. 学会等名 平成28年度新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kubota T, Nezu A, Maruyama S, Horimizu M, Nohno K, Hokari T, Morozumi T, Saku T, Yoshie H
2. 発表標題 Alzheimer ' s diseases-related gene and protein expressions in periodontitis-affected gingival tissues
3. 学会等名 Europerio 8 (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 根津新、久保田健彦、丸山智、永田昌毅、堀水慎、濃野要、保苺崇大、両角俊哉、朔敬、吉江弘正
2. 発表標題 歯周炎罹患歯肉組織におけるNepri lysin (Alzheimer病関連遺伝子) の発現
3. 学会等名 第58回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 久保田健彦
2. 発表標題 歯周病・歯周治療に対する疑問に答えるー明日から役立つー 歯周基本治療・歯周再生治療・インプラント・全身疾患
3. 学会等名 2016 群馬県藤岡市歯科医師会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 A Nezu, T Kubota, S Maruyama, M Nagata, M Horimizu, K Nouno, T Hokari, T Morozumi, T Saku, H Yoshie
2. 発表標題 Expression of nepri lysin in periodontitis-affected gingival tissues
3. 学会等名 The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology and Japanese Academy of Clinical Periodontology
4. 発表年 2016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	丸山 智 (MARUYAMA Satoshi) (30397161)	新潟大学・医歯学総合病院・講師 (13101)	