

令和元年6月6日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11478

研究課題名(和文) ミクログリアによる脳炎症を主軸とする歯周病のアルツハイマー病増悪メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of Alzheimer's disease exacerbation mechanism of periodontitis centering on microglia-related neuroinflammation

研究代表者

武 洲 (Take, Hiro)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：10420598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 成分PgLPSを全身投与した野生型中年マウス学習記憶脳低下、ミクログリアの依存性脳炎症並びに海馬ニューロン内アミロイドAbeta蓄積というアルツハイマー病(AD)様病態が誘発されること(Cat) B欠損した中年マウスではAD病態は生じないことからCatBが誘発されるAD様病態の原因酵素となることを明らかにした。PgLPS全身投与した野生型マウスの脾臓に認められた樹状細胞ならびにTh17細胞の有意な増加に伴う脾臓肥大はCatSを欠損したマウスに認められないことからCatSが炎症増幅の原因酵素となる可能性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は口腔ケアの認知症予防における重要性を広く発信するに加え、CatBならびにCatSの特異的阻害剤は認知症の発症ならびに進行を阻む可能性が示され、今後の展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have found that systemically exposure of PgLPS, a component of periodontitis *Porphyromonas gingivalis* (Pg) induces the Alzheimer-disease (AD) -like phenotypes, including learning and memory decrease, microglia-dependent neuroinflammation and hippocampal intraneuronal amyloid A beta accumulation were induced in the wild-type middle-aged mice. It was revealed that AD-like phenotypes did not induced in middle-aged cathepsin (Cat) B deficient mice after exposure PgLPS, therefore it is considered that CatB is a causative enzyme for PgLPS-induced AD-like pathology. On the other hand, spleen hypertrophy associated with a significant increase in dendritic cells and Th17 cells observed in the spleen of wild-type mice after systemically exposure of PgLPS, however the phenotypes in spleen was not observed in mice deficient in CatS deficient mice, thus indicates that CatS may as a causative enzyme of PgLPS induced systemic inflammatory amplification.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周病 ミクログリア アルツハイマー病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年、重度歯周病の罹患と認知機能低下との相関性が報告され、*Pg* 菌 LPS がアルツハイマー病患者の脳内に検出されたこのため *Pg* 菌が脳炎症を引き起こし認知症の悪化を招くと考えられたが、詳細なメカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

そこで私たちは全身投与した *Pg* 菌 LPS が学習行動や脳炎症に及ぼす影響ならびに脾臓における免疫応答・炎症の持続について解析を行う。

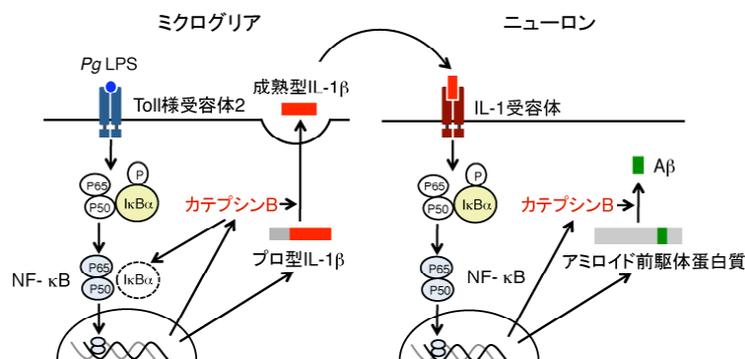
### 3. 研究の方法

カテプシン B (CatB) 欠損マウスを用いて *Pg* 菌 LPS を全身に慢性投与したマウスにおける学習・記憶脳低下、ミクログリア活性化による脳炎症ならびに海馬ニューロン内 Amyloid (A)  $\beta$  蓄積などアルツハイマー様病態の誘発に CatB の関与を、カテプシン S (CatS) 欠損マウスを用いて CatS が *Pg* 菌 LPS の全身曝露中に脾臓における免疫応答・炎症の持続に CatS の関与について解析を行った。

### 4. 研究成果

*Pg* 菌 LPS を全身に慢性投与した野生型の中年マウスでは学習・記憶脳低下、ミクログリア活性化による脳炎症ならびに海馬ニューロン内 A $\beta$  蓄積が認められた。一方、カテプシン B を欠損した中年マウスでは *Pg* 菌 LPS を全身に慢性投与を行ってもアルツハイマー様病態は生じなかった。初代培養海馬ニューロンでは *Pg* 菌 LPS の直接作用は認められず、*Pg* 菌 LPS で刺激したミクログリア培養上清を添加するとカテプシン B 発現が増大し、カテプシン B に依存した A $\beta$  蓄積が認められた。また、ミクログリア培養上清の作用は抗 IL-1 $\beta$  中和抗体の添加により消失した。私たちは以前の研究において LPS はミクログリアに発現する Toll 様受容体を介した転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化によりプロ型 IL-1 $\beta$  の産生を引き起こし、さらにカテプシン B により活性化されたカスパーゼ 1 がプロ型 IL-1 $\beta$  を成熟型に変換することを報告している。従って、中年マウスが *Pg* 菌 LPS を全身性に曝露されると、活性化されたミクログリアがカテプシン B 依存的に IL-1 $\beta$  を産生分泌し、ニューロンにおけるカテプシン B に依存した A $\beta$  産生・蓄積ならびに学習・記憶能低下などアルツハイマー様病態を引き起こすと考えらる。

今回の研究により (1) 歯周病菌の菌体成分により中年マウスにおいてアルツハイマー様病態が誘発されること、さらに (2) カテプシン B が歯周病菌の菌体成分により誘発されるミクログリア活性化により惹起される脳炎症、ニューロンにおける A $\beta$  産生・蓄積ならびに学習・記憶能低下などアルツハイマー様病態の原因酵素となることを初めて明らかにした(論文3)。(図



1 *Pg* 菌 LPS によるカテプシン B を介したミクログリアにおける IL-1 $\beta$  の産生分泌ならびにニューロンにおける A $\beta$  産生

中年の野生型マウスに *Pg* 菌 LPS を全身に慢性投与したところ脾臓肥大が生じ、脾臓周辺領域において樹状細胞ならびに Th17 細胞が有意に増加した。一方、Th1 ならびに Th2 細胞の増加

は認められなかった。また、脾臓における CatS ならびに IL-6 の発現が有意に増加した。一方、中年の CatS 欠損マウスに *Pg* 菌 LPS を全身曝露しても中年の野性型マウスで生じた変化は認められなかった。そこで培養系を用い *Pg* 菌 LPS で刺激した樹状細胞を介した Th17 細胞の分化における CatS の関与について解析を行った。野生型マウスの脾臓から単離した樹状細胞を *Pg* 菌 LPS で刺激すると IL-6 の産生分泌が著明に増加した。*Pg* 菌 LPS により誘導される樹状細胞からの IL-6 の産生分泌は、CatS の特異的阻害剤の前処理により抑制された。一方、*Pg* 菌 LPS により誘導される樹状細胞におけるプロテアーゼ活性化受容体 (PAR) 2 の発現は CatS の特異的阻害剤により有意に抑制された。さらに、*Pg* 菌 LPS により誘導される IL-6 産生は、Akt 特異的阻害剤ならびに PAR2 阻害ペプチドによる前処理によって有意に抑制された。これらの結果から、全身曝露した *Pg* 菌 LPS は樹状細胞において CatS 依存的に PAR2 を活性化し、IL-6 の産生分泌を介して Th17 細胞の分化を促進することで全身炎症を増幅することが示唆された (論文 5)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Meng, J., Wu, Z., Ni, J., Hayashi, Y., Nian, W., Wu, S., Nakanishi, H. & Zhu, A. (2018) Ratanasampil Suppresses the Hypoxia-related Inflammatory Responses by Inhibiting Oxidative Stress and NF- $\kappa$ B Activation in Microglia, *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*. 8(5): 451. (国際共著)
2. Meng J, Ni J, Wu Z, Jiang M, Zhu A, Qing H, and Nakanishi H. (2018): The Critical Role of IL-10 in the Antineuroinflammatory and Antioxidative Effects of *Rheum tanguticum* on Activated Microglia. *Oxid Med Cell Longev*. 2018: 1083596.
3. Wu Z, Ni J, Liu Y, Teeling J, Takayama F, Collcutt A, Paul I, Nakanishi H. (2017): Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Behav. Brain Immun.*, 65:350-361. (国際共著)
4. Takayama F, Zhang X, Hayashi Y, Wu Z, Nakanishi H. (2017): Dysfunction in diurnal synaptic responses and social behavior abnormalities in cathepsin S-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490(3), 447-452.
5. Dekita M, Wu Z, Ni J, Zhang X, Liu Y, Yan X, Nakanishi H, Takahashi I. (2017): Cathepsin S Is Involved in Th17 Differentiation Through the Upregulation of IL-6 by Activating PAR-2 after Systemic Exposure to Lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 470. (国際共著)
6. Liu Y, Wu Z, Nakanishi Y, Ni J, Hayashi Y, Takayama F, Zhou Y, Kadawaki T, Nakanishi H. (2017): Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice. *Sci Rep*. 2017; 7: 11759.
7. Ni J, Wu Z, Meng J, Zhu A, Zhong X, Wu S, Nakanishi H. (2017): The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells *Oxid Med Cell Longev*. 2017: 7984327. (国際共著)
8. Li X, Wu Z, Ni J, Liu Y, Meng J, Yu W, Nakanishi H, Zhou Y. (2016): Cathepsin B Regulates Collagen Expression by Fibroblasts via Prolonging TLR2/NF $\kappa$ B activation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016: 7894247. (国際共著)

9. Takayama F, Hayashi Y, Wu Z, Liu Y, Nakanishi H. (2016): Diurnal dynamic behavior of microglia in response to infected bacteria through the UDP-P2Y<sub>6</sub> receptor system. *Sci Rep.* 6:30006.
10. 武 洲、中西 博 (2018): 歯周病のアルツハイマー病における関与メカニズム. *細胞* 50 (10): 45-49. (総説)
11. 武 洲、中西 博 (2017) 古くて新しいアルツハイマー病の脳炎症仮説と感染症仮説: 鍵を握るミクログリアの老化と慢性的脳炎症. *日本薬理誌* 150、P1-7. (総説)
12. 武 洲、中西 博 (2017) 歯周病のアルツハイマー病における関与メカニズム: 慢性全身性炎症からミクログリア活性化脳炎症へ. *BIO Clinica* 32 (8): 75-80. (総説)
13. Wu Z, Yu J, Zhu A, Nakanishi H (2016): Nutrients, Microglia Aging, and Brain Aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:7498528. (総説) (国際共著)

[学会発表] (計 16 件)

1. 武 洲: 「ジンジバリス菌とアルツハイマー病」 第60回歯科基礎医学会学術大会・メインシンポジウム, オーガナイザー・講演. 2018年9月、福岡
2. Ran Nie, Junjun Ni, Yoshinori Hayashi, Zhou Wu, Yanmin Zhou: 「慢性全身性 *Porphyromonas gingivalis* 感染に伴う全身性アミロイドβ代謝におけるマクロファージの関与」 第60回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表 2018年9月、福岡
3. Yebo Gu, Junjun Ni, Zhou Wu, Ichiro Takahashi: 「*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS の慢性投与は中年マウスにおける骨量低下ならびに記憶低下を誘発する」 第60回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表 2018年9月、福岡
4. 中西 悠梨香 (九州大学 歯学部 5 年生) 「*Porphyromonas gingivalis* 菌慢性末梢感染により老齢 female マウスミクログリアにおける抗炎症能が低下する」 第60回歯科基礎医学会学術大会 学部学生ポスター発表 2018年9月、福岡
5. 武 洲: 「ミクログリアによる脳炎症を主軸とする歯周病のアルツハイマー病増悪メカニズムの解明」 第90回日本薬理学会年会・年会企画シンポジウム「口腔ブレインサイエンスに学ぶ健康長寿」 2017年3月、長崎
6. ZhouWu: Cathepsin B, novel therapeutic target for microglia-mediated neuroinflammation. Special invited lecture in University of Southampton, 2017年2月、Southampton, UK (国際発表,招待講演)
7. Ycong Liu, Zhou Wu, Hiroshi Nakanishi: Gingipains Induce Microglia Migration through Activation of Protease-activated Receptor-2 (PAR-2). IADR 2017, 2017年3月、San Francisco, USA. (国際発表)
8. Junjun Ni, Zhou Wu, Hiroshi Nakanishi: Brazilian Green Propolis Protects Human Neuronal SH-SY5Y Cells by Upregulates the Activity-regulated Cytoskeleton-associated Protein. 2017年5月、Barcelona, Spain. (国際発表)
9. Zhou Wu: Microglia-mediated neuroinflammation in cognitive decline: Evidence, Mechanism and Prevention by natural productions. Neuro Talk- 2017. Symposium 「Alzheimer's Disease and Demetria」 Speaker, Co-chair, 2017年5月、Barcelona, Spain. (国際発表)
10. Zhou Wu, Junjun Ni, Yicong Liu, Hiroshi Nakanishi Critical roles of cathepsin B in Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to *Porphyromonas gingivalis* ISN-ESN 2017. 2017年8月 Paris, France. (国際発表)
11. 武 洲: 「歯周病菌感染による脳内アルツハイマー様病態の誘発メカニズム」 第58回歯科基礎医学会学術大会・サテライトシンポジウム「健康長寿社会実現を目指す口腔ブレインサイエンスの最前線」 2016年8月、札幌

12. 出来田雅人, 武 洲, 中西 博, 高橋一郎 *Porphyromonas gingivalis* 由来LPSによるTh17細胞への分化誘導におけるカテプシンSの役割 第58回歯科基礎医学会学術大会2016年8月、札幌
13. Zhou Wu: Cathepsin B, novel therapeutic target for microglia-aging. XV<sup>th</sup> Symposium on Proteases, inhibitors and Biological Control. 2016年7月、Portoroz, Slovenia (国際発表、招待講演)
14. 出来田雅人 武洲 中西博 高橋一郎: リソソーム酵素カテプシンSは *Porphyromonas gingivalis*由来LPSによるTh17細胞の分化を促進する. 第75回日本矯正歯科学会、2016年11月、徳島
15. 武 洲、倪 軍軍、高山 扶美子、中西 博. *Porphyromonas gingivalis*由来LPSの慢性的末梢投与によって誘発されるAD様フェノタイプにおけるカテプシンBの役割. 第89回薬理学会・年会、2016年3月、横浜
16. Wu Zhou : Internationalization of the actuality and prospect of dental medicine education 中国吉林大学 教育講演 (国際発表、招待講演)

[図書] (計 1 件)

1. 武 洲 (2018) : 歯周病によるアリツハイマー病の関与メカニズム 《アリツハイマー病—発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発》 (研修者 新井平伊) pp. 40-44. エヌ・ティーエス株式会社、東京、日本

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

[その他]

新聞掲載：日本歯科新聞 (2017年7月4日)、科学新聞 (2017年7月4日)、西日本新聞 (2017年7月4日、2018年6月18日)、朝日新聞 (2018年4月4日)。テレビ出演：朝日放送「名医とつながる！たけしの家庭の医学 (2018年1月23日)。市民講演会：宗像市 (2018年年6月24日、福岡市 (2018年8月4日)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。