

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11670

研究課題名(和文) 歯周病による中枢機能障害の基盤となるストレス応答性亢進機構の解明研究

研究課題名(英文) Research for elucidating mechanisms of stress vulnerability as basis of brain dysfunction caused by periodontal disease

研究代表者

山脇 洋輔 (Yamawaki, Yosuke)

第一薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90584061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病による末梢炎症が中枢に波及し、脳内炎症およびストレス脆弱性を引き起こすか、また抗うつ薬がこれらを抑制するかを歯周病モデルマウスと培養細胞を用いて検討を行った。その結果、P. gingivaris由来LPSは海馬でのミクログリアの活性化と炎症応答亢進を引き起こした。また、PgLPSはミクログリアのTLR2/4を介したNF- κ B経路活性化による炎症応答を惹起することで神経細胞死を引き起こした。さらに抗うつ薬はミクログリアでのNF- κ B経路の抑制することでミクログリアによる神経細胞死を抑制した。マウスにおいても抗うつ薬は海馬の炎症を抑制し、PgLPSによるうつ病様行動を抑制する傾向が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病はP. gingivarisなどの細菌が口腔に感染することで引き起こされる慢性的な局所炎症であるが、この炎症は全身へと波及し、心疾患や糖尿病などの全身疾患のみならず、認知機能障害のリスクファクターであることが明らかとなってきた。本研究は、歯周病への罹患がストレス脆弱性にも関与する可能性とその機序を示し、また既存の抗うつ薬が歯周病による中枢炎症を抑制することを示した。歯周病のリスクを知らしめることで認識を改め、また治療薬の可能性を示したという点で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether peripheral inflammation caused by periodontal disease spreads to the central nervous system, which causes neuro-inflammation and stress vulnerability, and whether antidepressants suppress them using periodontal disease model mice and cultured cells. As a result, lipopolysaccharide derived from P. gingivaris (PgLPS) caused microglial activation and inflammatory response in the hippocampus. In addition, PgLPS caused neuronal cell death by inducing an inflammatory response by activating the NF- κ B pathway via TLR2/4 in microglia. Furthermore, antidepressants suppressed microglia-induced neuronal cell death by inhibiting the NF- κ B pathway in microglia. In mice, antidepressants also suppressed hippocampal inflammation and tended to suppress PgLPS-induced depression-like behavior.

研究分野：精神薬理学

キーワード：歯周病モデル PgLPS ミクログリア 炎症性サイトカイン NF- κ B 抗うつ薬

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌感染が引き起こす口腔内の炎症反応である。こうした局所炎症反応は、波及して全身性の慢性炎症状態に移行することが明らかとなっている。近年、歯周病による慢性炎症は、心疾患や 2 型糖尿病に加えて、アルツハイマー病のリスクファクターであることが明らかにされた。すなわち、歯周病は、末梢のみならず中枢機能の障害をも引き起こすことが示唆された (Miklossy et al., *Aging*, 2016)。

精神的ストレスによって引き起こされるうつ病は、遺伝的・環境的要因による個体のストレス応答性の亢進が関与していると考えられている。また、ヒトおよび動物を用いた研究から、慢性的な炎症反応と精神疾患の関連性が明らかになってきた。これらの報告は、慢性的な末梢炎症反応は、ストレス応答性の亢進を引き起こし、うつ病のリスクファクターであることを示している。大腸菌の内毒素である lipopolysaccharide (LPS) 投与によって、全身性の炎症反応とともに、うつ病様行動が引き起こされることが報告された (Dantzer et al., *Nat. Rev. Neurosci.*, 2008)。

また、LPS 刺激は、ミクログリア (脳内免疫担当細胞) を活性化し、脳内の炎症性サイトカインの産生を亢進させる。その結果、脳内で神経障害が引き起こされる (Ni et al., *J Neurosci.*, 2015)。申請者は、LPS 投与による持続的なミクログリアの活性化が、マウスのストレス応答性を亢進させることを明らかにしてきた (Yamawaki et al., *Brain Res.* 2018)。さらに、抗うつ薬は抗炎症効果を持つことも報告されている。

代表的な歯周病原性細菌の 1 つである *P.gingivaris* 由来の LPS を投与された歯周病モデルマウスは認知機能障害を引き起こすことから、歯周病はミクログリア活性化を伴うストレス脆弱性を誘発し、抗うつ薬が抗炎症効果によりこれを抑制するという仮説を立て本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病による慢性的な炎症反応は、脳内ミクログリアを活性化させ、神経傷害による脳のストレス応答性の亢進を引き起こし、うつ病などの精神疾患の潜在的な危険因子となることに加えて、抗うつ薬投与による脳内炎症の鎮静化とストレス応答反応を正常化させることは、精神疾患発症リスクを低減させることができることを明らかにすることである。

3. 研究の方法

本実験を遂行するに当たり、広島大学および第一薬科大学における動物実験に関する指針に従った。

3-1: 歯周病モデルマウスの作製

8 週齢の C57BL/6J マウスの上顎両側第 1 臼歯歯髄腔に *P.gingivalis* (W83 株) 10^7 個を含有した小綿球を 6 週間留置し、感染させた。また、簡便化かつ効果の明瞭化のために、*P.gingivaris* 由来 LPS を腹腔内投与することでも歯周病モデルマウスを作製した。

3-2: 歯周病モデルマウスにおけるストレス脆弱性の評価

抗うつ薬および PgLPS を投与した歯周病モデルマウスに対して、PgLPS 投与 24 時間後に $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に調整した水を張ったシリンダー (直径 12 cm、水深 16 cm) に入れて 5 分間の無動時間を計測した。自発運動量はオープンフィールド試験により 5 分間の Crossing 回数を測定することで評価した。

3-3: 細胞培養

マウスミクログリア細胞株として MG-6 細胞を、10% fetal bovine serum (FBS), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ インスリン, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含有する Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地を用いて培養した。マウス神経細胞として Neuro2A 細胞を 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ペニシリン, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含有する DMEM 培地を用いて培養した。

3-4: 炎症応答の解析

歯周病モデルマウスから摘出した海馬および薬物刺激した MG-6 からサンプルを得、ミクログリア活性化マーカーである ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) や炎症性サイトカインの遺伝子発現変化および NF- κ B シグナル変化をリアルタイム PCR と Western Blot 解析によって評価した。

3-5: 細胞毒性試験

各種薬物および PgLPS の MG-6 に対する毒性および MG-6 から得た培養上清の Neuro2A に対する毒性は、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; 同仁化学研究所) を用いた細胞毒性試験により評価した。

4. 研究成果

4-1: 歯周病モデルマウスにおける海馬の炎症応答の解析

8 週齢の C57BL/6J マウスの上顎両側第 1 臼歯歯髄腔に *P.gingivalis* (W83 株) 10^7 個を含有した小綿球を 6 週間留置したマウスの肝臓(末梢組織の代表として)およびストレス脆弱性に関与する脳部位である海馬において炎症性サイトカインの遺伝子発現は軽微ではあるが有意に上昇していた。より明瞭な検討のために、代表的な歯周病原性細菌である *P.gingivaris* 由来の LPS (PgLPS) を腹腔内に投与したところ、投与 2 時間後において肝臓および海馬における炎症性サイトカインの遺伝子発現は有意に上昇した。用量検討において 1.0 mg/kg では炎症応答の増大傾向がみられ、5.0 mg/kg では有意な炎症性サイトカインの遺伝子発現の増大を観察し、投与 24 時間後においても海馬における炎症性サイトカイン (IL-1 β 、TNF- α) の遺伝子発現は有意に増大したままであった。また、この時、海馬ではミクログリアの活性化マーカーである Iba-1 の遺伝子発現が増大していた。この結果から、5.0 mg/kg の PgLPS の腹腔内投与により、海馬におけるミクログリアの活性化を伴う炎症応答が惹起されることが明らかとなった。

4-2: 歯周病モデルマウスにおけるストレス脆弱性の評価と抗うつ薬の効果の検討

イミプラミンなどの抗うつ薬には抗炎症効果がある。イミプラミンの前投与が PgLPS による炎症応答を抑制するかを検討した。イミプラミン (20 mg/kg) を腹腔内投与した 1 時間後に PgLPS (5.0 mg/kg) を腹腔内投与し、24 時間後に摘出した海馬において、イミプラミンは PgLPS による IL-1 β の遺伝子発現を抑制する傾向を示し、TNF- α の遺伝子発現は有意に抑制した。さらに、イミプラミンおよび PgLPS 投与 24 時間後にオープンフィールド試験および強制水泳試験を行ったところ、自発運動量には変化がない一方で、PgLPS は無動時間を延長し、イミプラミンはこれを抑制する傾向がみられた。よって、PgLPS による海馬の炎症応答はストレス脆弱性を亢進させること、また抗うつ薬であるイミプラミンはこれを抗炎症効果によるストレス脆弱性の改善効果を示す可能性が示された。

4-3: PgLPS によるミクログリアの炎症応答亢進と抗うつ薬の抗炎症効果の機序解明

培養ミクログリア細胞である MG-6 を用いて、PgLPS による炎症応答亢進および抗うつ薬の抗炎症効果の機序解明を試みた。最初に、炎症応答における PgLPS の用量検討を行ったところ、100 ng/mL および 1000 ng/mL において有意な炎症応答を引き起こしたが、細胞毒性試験において、100 ng/mL までは毒性を示さなかったが、1.0 μ g/mL の濃度で細胞死を引き起こした。よって、100 ng/mL の濃度を選択した。また抗炎症効果の検討における用量検討からイミプラミンは 25 μ M に決定した。この濃度において、MG-6 に対する毒性は観察されなかった。

炎症性サイトカインの遺伝子発現を指標として、PgLPS による炎症応答の機序を検討した。PgLPS による炎症応答は IKK α/β による I κ B の分解亢進を引き起こし、NF- κ B 阻害薬 (BAY11-7085 : 3 μ M) は PgLPS による炎症応答を抑制した。さらに、TLR2 阻害薬 (CU-CPT22 : 10 μ M) と TLR4 阻害薬 (TAK-242 : 10 nM) はそれぞれ PgLPS による炎症応答を抑制し、またこれらの併用は PgLPS による炎症応答亢進を相加的に抑制した。よって、MG-6 における PgLPS による炎症応答亢進は TLR2 および TLR4 の双方を介した NF- κ B シグナルによることが明らかとなった。

さらに、イミプラミンの前投与は PgLPS による IKK α/β のリン酸化および I κ B の分解を抑制したことから、イミプラミンは IKK α/β のリン酸化を抑制することで PgLPS による炎症応答を抑制することが明らかとなった。

4-4: PgLPS 刺激ミクログリアによる神経毒性に対するイミプラミンの抑制効果の検討

活性化ミクログリアは炎症性サイトカインなどの液性因子を介して神経細胞障害を引き起こすことが知られている。ここでは神経細胞死を指標として PgLPS がミクログリアによる神経細胞障害を引き起こすか、またイミプラミンがこれを抑制するかを検討した。PgLPS (100 ng/mL) で 24 時間刺激した MG-6 の培養上清を神経細胞である Neuro2A に処置したところ、神経細胞死は PgLPS 刺激群は PgLPS 非刺激群に比較して有意な神経細胞死を誘発した。一方で、イミプラミンを前処置した MG-6 の培養上清は PgLPS 刺激群に比較して神経細胞死が有意に減少した。また、NF- κ B 阻害薬も同様に神経細胞を抑制した。このことから、イミプラミンは NF- κ B シグナル抑制作用により PgLPS によるミクログリアを介した神経細胞死を抑制することが明らかとなった。

本研究において、歯周病原性細菌 *P.gingivaris* 由来 LPS による末梢炎症は中枢へと波及することでミクログリアの活性化と炎症応答亢進を伴うストレス脆弱性を引き起こし、抗うつ薬はこれらを抑制する可能性を示した。また、このような抗うつ薬の効果には NF- κ B シグナル抑制作用とそれによる神経細胞死抑制効果に関与することを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yoshino A, Aizawa H, Takamura M, Ichikawa N, Shibasaki C, Yamawaki Y, Sasaoka T, Okamoto Y, Yamawaki S.	4. 巻 70
2. 論文標題 The Role of the Habenula in Depression: A Review of the Human fMRI Studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Nerve	6. 最初と最後の頁 1017-1023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.11477/mf.1416201121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hosoi T, Kimura H, Yamawaki Y, Mori K, Ozawa K	4. 巻 508
2. 論文標題 Immobilization stress induces XBP1 splicing in the mouse brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 516-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue MK, Mizuno Y, Nakanishi M, Sano T, Yamawaki Y, Kushiyaama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ryo A, Ono H, Minamino T, Takahashi SI, Ohno H, Yoneda M, Takahashi K, Ishihara H, Katagiri H, Nishimura F, Kanematsu T, Yamada T, Asano T	4. 巻 26
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Suppresses Thermogenic Programs in Adipocytes by Promoting Degradation of Transcriptional Co-activator PRDM16	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 3221-3230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.066	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 Yamawaki Y, Nishida M, Harada K, Akagi H	4. 巻 18
2. 論文標題 Data on the effect of maternal separation coupled with social isolation in a forced swim test and gene expression of glial fibrillary acid protein in the prefrontal cortex of rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 496-500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.dib.2018.03.055.	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 Lotan A, Lifschytz T, Wolf G, Keller S, Ben-Ari H, Tatarsky P, Pillar N, Oved K, Sharabany J, Merzel TK, Matsumoto T, Yamawaki Y, Mernick B, Avidan E, Yamawaki S, Weller A, Shomron N, Lerer B.	4. 巻 -
2. 論文標題 Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s10905-018-9665-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, Shirawachi S, Asano S, Aizawa H, Yamawaki S, Kanematsu T, Akagi H.	4. 巻 1680
2. 論文標題 Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 13-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano S, Taniguchi Y, Yamawaki Y, Gao J, Harada K, Takeuchi H, Hirata M, Kanematsu T.	4. 巻 53
2. 論文標題 Suppression of cell migration by phospholipase C-related catalytically inactive protein-dependent modulation of PI3K signalling.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-017-05908-7.	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 Kanematsu T, Oue K, Okumura T, Harada K, Yamawaki Y, Asano S, Mizokami A, Irifune M, Hirata M.	4. 巻 61
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein: A novel signaling molecule for modulating fat metabolism and energy expenditure.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Bioscience	6. 最初と最後の頁 65-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.job.2019.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano S, Ikura Y, Nishimoto M, Yamawaki Y, Hamao K, Kamijo K, Hirata M, Kanematsu T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates cytokinesis by protecting phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate from metabolism in the cleavage furrow.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-019-49156-3.	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 Yamawaki Y, Shirawachi S, Mizokami A, Nozaki K, Ito H, Asano S, Oue K, Aizawa H, Yamawaki S, Hirata M, Kanematsu T.	4. 巻 131
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates lipopolysaccharide-induced hypothalamic inflammation-mediated anorexia in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.neuint.2019.104563.	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 Nozaki K, Ito H, Ohgidani M, Yamawaki Y, Sahin EH, Kitajima T, Katsumata S, Yamawaki S, Kato TA, Aizawa H.	4. 巻 162
2. 論文標題 Antidepressant effect of the translocator protein antagonist ONO-2952 on mouse behaviors under chronic social defeat stress.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107835.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sanada T, Sano T, Sotomaru Y, Alshargabi R, Yamawaki Y, Yamashita A, Matsunaga H, Iwashita M, Shinjo T, Kanematsu T, Asano T, Nishimura F.	4. 巻 22
2. 論文標題 Anti-inflammatory effects of miRNA-146a induced in adipose and periodontal tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100757.	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 Yoshino A, Okamoto Y, Sumiya Y, Okada G, Takamura M, Ichikawa N, Nakano T, Shibasaki C, Aizawa H, Yamawaki Y, Kawakami K, Yokoyama S, Yoshimoto J, Yamawaki S	4. 巻 14
2. 論文標題 Importance of the habenula for avoidance learning including contextual cues in the human brain: A preliminary fMRI study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Human Neuroscience	6. 最初と最後の頁 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fnhum.2020.00165	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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yamawaki Y, Shirawachi S, Takaishi M, Yamawaki S, Kanematsu T
2. 発表標題 Imipramine enhances the expression of astrocytic interleukin-10 under inflammatory state
3. 学会等名 8th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山脇 洋輔、高石 宗佳、山脇 成人、兼松 隆
2. 発表標題 グリア細胞間相互作用におけるイミプラミンの抗炎症効果の検討
3. 学会等名 第28回日本臨床精神神経薬理学会・第48回日本神経精神薬理学会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 曾 浩紀, 山脇 洋輔, 谷本 幸太郎, 兼松 隆
2. 発表標題 歯周病原細菌由来リポ多糖 (PgLPS) が惹起する脳内炎症の解析
3. 学会等名 第102回広島大学歯学会例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白輪地 聡美, 山脇 洋輔, 兼松 隆
2. 発表標題 Lipopolysaccharideが誘発する摂食抑制行動におけるPLC-related catalytically inactive proteinの役割
3. 学会等名 第59回 歯科基礎医学会学術大会,
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山脇 洋輔, 白輪地 聡美, 高石 宗佳, 山脇 成人, 兼松 隆
2. 発表標題 Anti-inflammatory effects of antidepressant in glial cells
3. 学会等名 第50回 広島大学歯学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山脇 洋輔, 兼松 隆
2. 発表標題 炎症誘発性摂食抑制行動における新規分子の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamawaki Y, Shirawachi S, Takaishi M, Yamawaki S, Kanematsu T
2. 発表標題 Possible involvement of AKT-GSK3 signal-upregulated MEF2D protein in imipramine-enhanced the expression of astrocytic interleukin-10 under inflammatory state
3. 学会等名 AsCNP2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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	兼松 隆 (Kanematsu Takashi) (10264053)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	