

令和元年6月10日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17362

研究課題名(和文) 歯周病関連細菌の脳内移行に関する研究

研究課題名(英文) Study on the invasion of periodontal disease related bacteria into the brain

研究代表者

石田 直之(ishida, naoyuki)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50757622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々のこれまでの研究により、歯周病関連細菌であるPorphyromonas gingivalis(P. gingivalis)の感染によって引き起こされる歯周炎が、マウスモデルにおけるAlzheimer's disease (AD)の病理学的特徴を悪化させることが示された。しかし、そのメカニズムに関する研究は行われていなかった。本研究の結果、P. gingivalisとその菌体内毒素であるlipopolysaccharide(LPS)の影響により、血液脳関門の物質透過性が増加し、さらに脳内の炎症を惹起してADの病態を悪化させるメカニズムについて示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)の原因物質とされる脳内のアミロイドの沈着は、AD患者における認知障害の発症の20年以上前の40歳代前半に開始される。本研究により、この期間中に歯周病の治療を行う事によって、ADの発症または進行を遅らせるのに有効であり得ることが示唆された。

また、歯周病関連細菌LPSの血流への侵入経路として、腸内の関門を通過して侵入している可能性が示唆された。

以上のことから、壮年期からの歯周病のケアと並行して良好な腸内環境を維持していくこともADの発症予防に貢献する可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies show that periodontitis caused by infection with periodontitis-related bacteria Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) exacerbates the pathological features of Alzheimer's disease (AD) in a mouse model Indicated. However, there have been no studies to examine the mechanism.

As a result of this study, it was found that P. gingivalis and its bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) increase the permeability of blood-brain barrier. Furthermore, it was suggested about the mechanism by which the LPS causes inflammation in the brain and aggravates the pathological condition of AD.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 アルツハイマー病 Porphyromonas gingivalis 血液脳関門 lipopolysaccharide

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は生活習慣病の一つであり、糖尿病等の他の生活習慣病とも深い関係性が指摘され、現在研究が進められている。また、現在社会問題にもなりつつある認知症(アルツハイマー病)においても、原因である異常タンパク質(アミロイドβ)が特定され、アミロイドβを分解する薬剤の開発が進められるなど、研究が非常に盛んに行われている。さらに、アルツハイマー病はこれまでに脳内の慢性炎症性疾患であることも判明している。この2つの炎症性疾患の関連性については、すでにマウスを使用した実験において、歯周病がアルツハイマー病を増悪させる可能性を示唆する報告がある。さらに、そのメカニズムとして、歯周病関連細菌の菌体内毒素であるリポ多糖(LPS)が血流を介して脳内に侵入し、脳神経細胞に悪影響を与えている可能性が考えられた。しかし、脳には物体の選択的透過機能を持つ血液脳関門(BBB)が存在しており、脳内への異物の侵入を阻止していることがわかっている。研究開始時には実際にLPSがBBBを通過するか確認されておらず、歯周病がアルツハイマー病を増悪させるメカニズムは不明の状態であった。

2. 研究の目的

前述の背景とこれまでの研究成果を踏まえ、歯周病関連細菌のリポ多糖(LPS)が脳内に侵入して脳に影響を与えている可能性を、血液脳関門モデル細胞培養実験系を用いて明らかにすることを目的として研究を行った。

また、歯周病関連細菌のLPSが血液中に侵入するメカニズムとして、腸からの侵入経路を想定した。マウスに歯周病関連細菌を投与し、腸のタイトジャンクション構成タンパク質の一種であるZonulinの血清中含有量を測定することで、歯周病関連細菌が腸のタイトジャンクションを障害するかを確認した。

3. 研究の方法

(1) 血液脳関門 *in vitro* モデルを使用した歯周病関連細菌由来LPSの透過率算出

歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ATCC33277 株由来LPS(和光純薬)を1.0、10.0 μg/mLの各濃度で血液脳関門 *in vitro* モデル(ファーマコセル)の血管側に添加し、24時間培養した(図1)。LPS添加前に脳血管内皮細胞の電気抵抗値を経内皮電気抵抗測定装置(Merck Millipore)を用いて測定し、抵抗値が150kΩ以上となっており、正常なタイトジャンクション機能を有していることを確認した。培養後、脳内側の培養液を回収し、含まれるLPS濃度を測定した。LPS濃度の測定にはエンドスペシー(生化学工業)を使用し、定量を行った。実際に血管側に投与したLPS濃度と脳内側から検出されたLPS濃度を比較し、LPSの血液脳関門透過係数(Papp)を算出した。

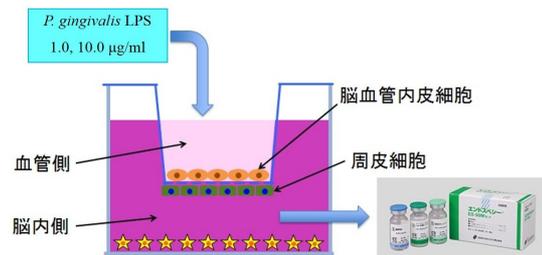


図1. 歯周病関連細菌由来LPSの透過率算出

(2) 血液脳関門 *in vitro* モデルに歯周病関連細菌由来LPSと大腸菌由来LPSを刺激した際の電気抵抗値(細胞間結合強度)の変化

脳血管内皮細胞の電気抵抗値を経内皮電気抵抗測定装置(Merck Millipore)を用いて測定し、抵抗値が150kΩ以上となり正常のタイトジャンクション機能を有していることを確認した血液脳関門 *in vitro* モデル(ファーマコセル)の血管側に歯周病関連細菌(*P. gingivalis* ATCC33277 株)由来LPS(和光純薬)と大腸菌由来LPS(和光純薬)を1.0 μg/mLの濃度で添加した(図2)。LPSの添加は細胞培養開始から72時間後に行った。細胞培養開始から72、96、120、144、168時間後に脳血管内皮細胞の経内皮電気抵抗値を測定し、タイトジャンクション機能が障害を受けるか、また、経時的にタイトジャンクション機能がどのように変化するかを検討した。

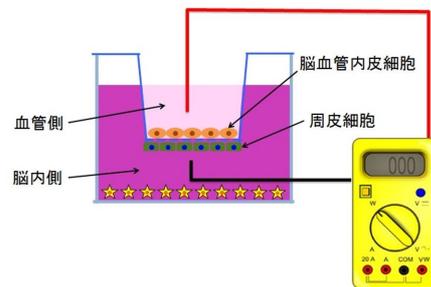


図2. 電気抵抗値(細胞間結合強度)の変化

3. マウスに歯周病関連細菌(*P. gingivalis*)を投与した際のマウス血清中におけるZonulin量定量

野生型 63 週齢雌 C57BL/6 マウス(日本クレア、東京)に2.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)溶液を用いて調製した *P. gingivalis* (ATCC 33277 株)菌体浮遊液(1×10⁹ CFU / 100 μl / 回 / 匹)を1日おきに計5回経口投与した。*P. gingivalis*の最終投与から3時間後に屠殺する群と1週間後に屠殺する群に分け、*P. gingivalis*非投与群には2.5% CMCのみを投与した。屠殺時、腹部下大静脈より採血して血清を採取し、Mouse Zonulin ELISA Kit (My BioSource, USA)

を用いて血清内に含まれる Zonulin 量を定量した。

4. 研究成果

1. 血液脳関門 *in vitro* モデルを使用した歯周病関連細菌由来 LPS の透過率算出

P. gingivalis ATCC33277 株由来 LPS の血液脳関門透過係数を算出した結果、コントロールである NaF と比較して、LPS を刺激した場合、1.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 共に有意に増加していた(図3)。このことから、*P. gingivalis* の LPS が血液脳関門に作用すると、物質の透過性が増加し、LPS が脳内に侵入する可能性があることが *in vitro* レベルで確認された。血液脳関門では、細胞と細胞が強固に結合し、タイトジャンクションを形成して物質の通過をコントロールしている。本結果から、血液脳関門に LPS が作用することでタイトジャンクションが障害され、LPS のみではなく、正常な状態では通過出来ない物質が脳内に侵入する可能性が示唆された。

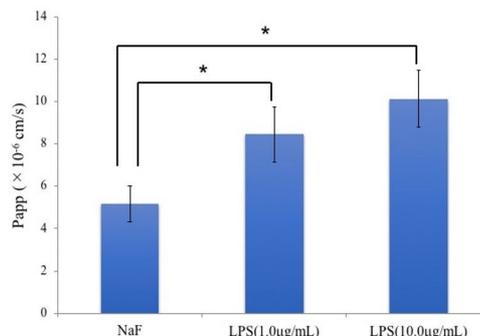


図3. 血液脳関門透過係数(Papp)
mean \pm S.D. n=5, * $p < 0.05$

2. 血液脳関門 *in vitro* モデルに歯周病関連細菌由来 LPS と大腸菌由来 LPS を刺激した際の電気抵抗値(細胞間結合強度)の変化

血液脳関門に *P. gingivalis* 由来 LPS と大腸菌(*E. coli*)由来 LPS を刺激した際のタイトジャンクション機能に与える影響を検討するために、細胞間の電気抵抗値を測定した。その結果、培養開始から 120 時間でコントロール、*E. coli*、*P. gingivalis* の全ての群で電気抵抗値が最大となった。しかし、LPS を刺激した 2 群では、コントロール群と比較して最大抵抗値が低下していた。さらに、コントロール群では、培養 120 時間以後電気抵抗値が緩やかに低下していくのに対して、LPS を刺激した 2 群では急激な低下が認められた。

また、*E. coli*、*P. gingivalis* の 2 群間では、*P. gingivalis* 群と比較して *E. coli* 群でより電気抵抗値が低下した(図4)。これは、LPS の毒性強度の影響であると考えられ、LPS の毒性が強い物の方がタイトジャンクションをより強く障害する可能性が示唆された。

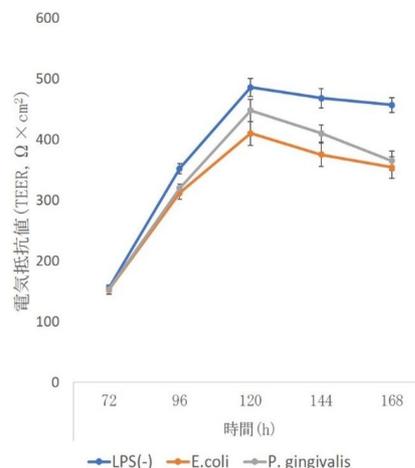


図4. LPS刺激時の血液脳関門*in vitro*モデルにおける電気抵抗値(細胞間結合強度の変化)

3. マウスに歯周病関連細菌(*P. gingivalis*)を投与した際のマウス血清中における Zonulin 量定量

近年の研究により、歯周病原細菌が小腸に移行したり、食習慣等の影響で間接的に腸内の腸内細菌叢に変化を与えたりすることにより、腸のタイトジャンクション構成タンパク質の一種である Zonulin に影響を与えることが判明している。これにより細菌の LPS や Zonulin が血中に侵入するようになり、全身の微小炎症を引き起こして様々な組織に障害を及ぼしている可能性が報告されている。本研究におけるマウスを用いた実験では、野生型 C57BL/6 マウス *P. gingivalis* 投与群と非投与群の血清中における Zonulin 量は、*P. gingivalis* 非投与群が $39.7 \pm 7.1 \text{ pg/ml}$ であったのに対して、*P. gingivalis* 投与 3 時間後群では $57.1 \pm 8.1 \text{ pg/ml}$ となり、有意に増加した($p < 0.05$)(図5)。

一方、*P. gingivalis* 投与 1 週間後群では $43.3 \pm 8.4 \text{ pg/ml}$ となり、*P. gingivalis* 非投与群と比較した場合、有意な差は無かった。このことから、*P. gingivalis*

が口腔から腸管に侵入すると、短期間ではあるが腸管のタイトジャンクションが障害を受け、*P. gingivalis* もしくは腸内細菌の LPS が血中に移行して全身を循環する可能性が考えられた。

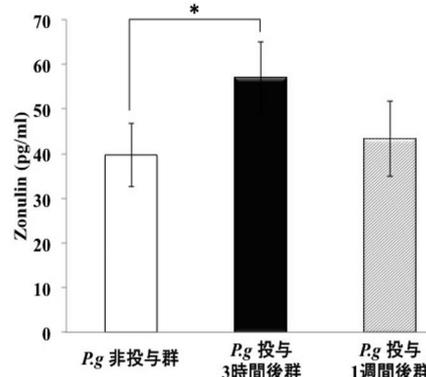


図5. マウス血清中の Zonulin 量比較
mean \pm S.D. n=5, * $p < 0.05$

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Ishida N, Yoshinari N, Matsushita K, Ishihara Y : Periodontal disease exacerbates Alzheimer's disease. 査読有, 2018, doi:10.2329/periodio.60.147

Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M, Ferdous T, Abdullah M, Mitani A, Michikawa M, Matsushita K : Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer ' s disease in transgenic mice. 査読有, NPJ Aging Mech Dis. 2017, doi:10.1038/s41514-017-0015-X.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

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。