様 式 C－19、F－19－1、Z－19 （共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ５ 月 １９ 日現在

機関番号：３５４０８
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ１９６５０

研究課題名（和文）歯周病によるアルツハイマー病悪化の要因としてのミクログリア活性化のゲート機構破綻

研究課題名（英文）Possible involvement of impaired intrinsic microglial clock in Periodontotis-associated exacerbation of Alzheimer's disease

研究代表者
中西　博（Nakanishi, Hiroshi）

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：２０１５５７７４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：アミロイド前駆体タンパク質ノックイン（APP-KI）マウスと野生マウスのミクログリアにおける時計遺伝子ならびに炎症性メディエーターのmRNA発現を比較した。その結果、時計遺伝子REV-ERBalphaの増大がミクログリアの炎症反応を促進することが明らかになり、REV-ERBalphaの発現量がミクログリアの活性化反応を規制するゲート機構の実体であることが示唆された。さらに、REV-ERBalphaによるミクログリアにおける炎症反応は、Abetaオリゴマーにより促進されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ミクログリアの活性化反応を活動期に規制するゲート機構が存在し、ミクログリア分子時計の制御下にあることが想定された。本研究ではREV-ERBalphaの発現量がミクログリアの活性化反応を規制するゲート機構の実体であることを突き止めた。さらに、REV-ERBalphaによるミクログリアにおける炎症反応は、Abetaオリゴマーにより促進されることが明らかとなった。本研究成果より、ミクログリアの時計遺伝子（特にREV-ERBalpha）を制御することによりアルツハイマー病に伴う過剰な慢性炎症を抑制できる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：It is well known that disturbances in clock genes affect almost all patients with Alzheimer’s disease (AD). As microglia-mediated neuroinflammation proved to be a driver of AD rather than a result of the disease, we evaluated the relationship between clock gene disturbance and neuroinflammation in microglia and their contribution to the onset of AD. Pro-inflammatory genes in microglia isolated from APP knock-in mice were significantly higher than those isolated from wild-type mice. The expression of pro-inflammatory genes was positively associated with NF-κB activation and negatively associated with the BMAL1 expression. SR9009 induced the activation of microglia, the increased expression of pro-inflammatory genes, and cognitive decline in APP knock-in mice. Therefore, clock gene disturbance in microglia is involved in the early onset of AD through the induction of chronic neuroinflammation.

研究分野：神経化学

キーワード：ミクログリア　時計遺伝子　炎症性反応　アルツハイマー病

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

最近、歯周病菌（*Porphyromonas gingivalis*、ジンジバリス菌）ならびにその菌体成分がアルツハイマー病患者脳内に検出され、ジンジバリス菌の脳内感染がアルツハイマー病の増悪因子であることが示唆されている。また、疫学研究によってもアルツハイマー病患者の認知機能障害の程度と歯周病の重症度には正の相関があることが示されている。さらに最近、脳内感染したジンジバリス菌に対しミクログリアは突起伸展反応を示し、この突起伸展反応は非活動期に最大となり、活動期に最小となることが明らかになった。このことから、脳内に感染したジンジバリス菌に対するミクログリアの一連の活性化反応は非活動期に最大となり、活動期には活性化反応を規制するゲート機構の存在が想定される。

２．研究の目的

最近、歯周病菌がアルツハイマー病の増悪因子であることが明らかとなっている。脳内に感染した主要な歯周病菌のジンジバリス菌に対し、ミクログリアは突起伸展反応を示す。この突起伸展反応は非活動期に最大となり、活動期に最小となる。このことから、脳内に感染したジンジバリス菌に対するミクログリアの一連の活性化反応は非活動期に最大となり、活動期には活性化反応を規制するゲート機構の存在が想定される。そこで本研究はこの想定されるミクログリアの活性化反応を規制するゲート機構の実態を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

❶アルツハイマー病モデルマウスとして家族性アミロイド前駆体タンパク質（APP）変異であるSweden変異とBeyreuther変異をもつAPPをノックインしたマウス(APP-KIマウス)を用いた。野生型マウスの全脳よりMACS法を用いて9時ならびに21時に単離したミクログリアよりRNAを抽出し、CAGE法による網羅的遺伝子解析を行った。
❷GAGE法で差異の認められた時計遺伝子に関連した遺伝子ならびに免疫・炎症反応に関連した遺伝子について定量的PCR解析を行った。
❸大脳皮質ミクログリアにおいて時計遺伝子（BMAL1ならびにREV-ERBα）が転写因子NF-κB、転写因子RORαならびにNF-κBの内因性インヒビターIκBαの発現をどのように制御しているのかを解析した。
❹REV-ERBαアゴニストであるSR9009の脳炎症反応ならびに学習行動に対する影響を解した。

４．研究成果

APP-KI マウスならびに野生マウスのミクログリアにおける時計遺伝子ならびに炎症性メディエーターのmRNA発現を比較し、次のことが明らかとなった。

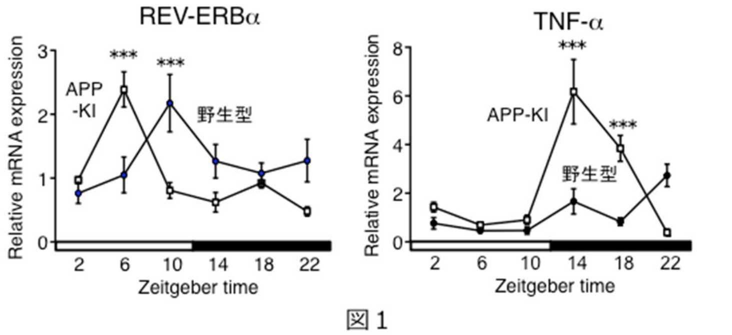

図１

❶野生型とAPP-KIマウスとでは時計遺伝子（BMAL1，PER1，PER2ならびにREV-ERBα）ならびに炎症性メディエーター（TNF-α，IL-1β，NOS2ならびにIL-6）のmRNA発現の日内変動に位相のズレが認められた（図１）。REV-ERBαは概日リズム、炎症ならびに代謝に関与する遺伝子発現を抑制することが知られている。一方、転写因子RORαはREV-ERBαに競合的に拮抗する。これらの結果より炎症性メディエーターの発現増大は時計遺伝子発現の位相のズレが関与している可能性が示唆された。

❷次に、大脳皮質ミクログリアにおいて時計遺伝子（BMAL1 ならびに REV-ERBα）が転写因子 NF-κB、転写因子 RORαならびに NF-κB の内因性インヒビターIκBαの発現をどのように制御しているのかを解析した。その結果、APP-KI マウスの大脳皮質から単離したミクログリアにおける IκBαならびに RORαの mRNA 発現量の ZT14 での値ならびに暗期における平均値は野生型マウスと比較して有意に低い値を示した（図２）。一方、IκBαならびに RORαの mRNA 発現量の明期における平均値はグループ間で有意な差はなかった。

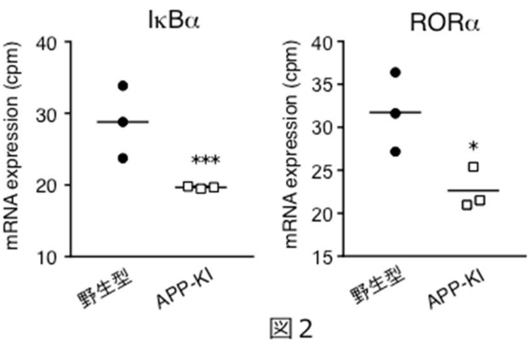

図2

❸REV-ERBαアゴニストである SR9009 の脳炎症反応ならびに学習行動に対する影響を解析した結果、APP-KI マウスの大脳皮質における REV-ERBαの mRNA 発現量の有意な増大が認められた。さらに SR9009 の投与により、APP-KI マウスの海馬における Iba1、NOS2 ならびに成熟型 IL-1βのタンパク質発現量は有意に増大した（図３）。さらに新奇物体認識テストに対する SR9009 の影響を解析したところ、SR9009 の投与により APP-KI マウスでは馴染物体と新奇物体の区別ができなくなることが明らかとなった。

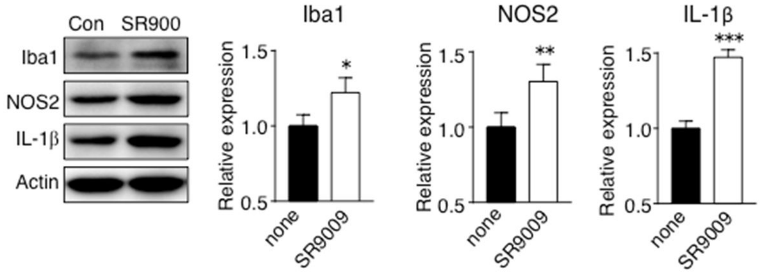

図3

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計16件（うち査読付論文　16件／うち国際共著　3件／うちオープンアクセス　12件）

１．著者名 Harada Y, Zhang J, Imari K, Yamasaki R, Ni J, Wu Z, Yamamoto K, Kira JI, Nakanishi H, Hayashi Y.	４．巻 160
２．論文標題 Cathepsin E in neutrophils contributes to the generation of neuropathic pain in experimental autoimmune encephalomyelitis.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Pain	６．最初と最後の頁 2050-2062
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/j.pain. 0000000000001596.	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 Hatakeyama J, Anan H, Hatakeyama Y, Matsumoto N, Takayama F, Wu Z, Matsuzaki E, Minakami M, Izumi T, Nakanishi H	４．巻 61
２．論文標題 Induction of bone repair in rat calvarial defects using a combination of hydroxyapatite with phosphatidylserine liposomes.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 J. Oral Sci.	６．最初と最後の頁 111-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.17-0488.	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 Ni J, Wu Z, Meng J, Saito T, Saido TC, Qing H, Nakanishi H.	４．巻 16
２．論文標題 An impaired intrinsic microglial clock system induces neuroinflammatory alterations in the early stage of amyloid precursor protein knock-in mouse brain.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 J. Neuroinflamm.	６．最初と最後の頁 173-173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-019-1562-9.	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 Yang L, Ran Y, Quan Z, Wang R, Yang Q, Jia Q, Zhang H, Li Y, Peng Y, Liang J, Wang H, Nakanishi H, Deng Y, Qing H.	４．巻 236
２．論文標題 Pterostilbene, an active component of the dragon's blood extract, acts as an antidepressant in adult rats.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Psychopharmacology (Berl)	６．最初と最後の頁 1323-1333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00213-018-5138-7.	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 該当する

1．著者名 Li NM, Liu KF, Qiu YJ, Zhang HH, Nakanishi H, Qing H.	4．巻 14
2．論文標題 Mutations of beta-amyloid precursor protein after the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis.	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Neural Regen Res.	6．最初と最後の頁 658-665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.247469.	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 Nonaka S, Nakanishi H.	4．巻 707
2．論文標題 Microglial clearance of focal apoptotic synapses.	5．発行年 2019年
3．雑誌名 Neurosci. Lett.	6．最初と最後の頁 134317-134317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.134317.	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 Nakanishi H.	4．巻 15
2．論文標題 Microglial cathepsin B as a key driver of inflammatory brain diseases and brain aging.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Neural Regener. Res.	6．最初と最後の頁 25-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4103/1673-5374.264444.	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 Yan X, Wu Z, Wang B, Yu T, Hu Y, Wang S, Deng C, Zhao B, Nakanishi H, Zhang X.	4．巻 2020
2．論文標題 . Involvement of cathepsins in innate and adaptive immune responses in periodontitis.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Evid Based Complement Alternat Med.	6．最初と最後の頁 4517587-4517587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/4517587.	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	4．巻
Li NM, Liu KF, Qiu YJ, Zhang HH, Nakanishi H, Qing H.	14
2．論文標題	5．発行年
Mutations of beta-amyloid precursor protein after the consequence of Alzheimer's disease pathogenesis.	2019年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Neural Regen Res.	658-665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.4103/1673-5374.247469.	有
オープンアクセス	国際共著
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	－

1．著者名	4．巻
Yang L, Ran Y, Quan Z, Wang R, Yang Q, Jia Q, Zhang H, Li Y, Peng Y, Liang J, Wang H, Nakanishi H, Deng Y, Qing H.	14
2．論文標題	5．発行年
Pterostilbene, an active component of the dragon’s blood extract, acts as an antiderpressant in adult rats.	2019年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Psychopharmacology (Berl)	658-665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1007/s00213-018-5138-7.	有
オープンアクセス	国際共著
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	－

1．著者名	4．巻
Ni J, Wu Z, Stoka V, Meng J, Hayashi Y, Peters C, Qing H, Turk V, Nakanishi H.	e12856
2．論文標題	5．発行年
Increased expression and altered subcellular distribution of cathepsin B in microglia induces cognitive impairment through oxidative stress and inflammatory response in mice.	2019年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Aging Cell	e12856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1111/acel.12856.	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

1．著者名	4．巻
Fujii T, Yamasaki R, Iinuma K, Tsuchimoto D, Hayashi Y, Saitoh BY, Matsushita T, Kido MA, Aishima S, Nakanishi H, Nakabeppu Y, Kira JI.	84
2．論文標題	5．発行年
A novel autoantibody against plexin D1 in patients with neuropathic pain.	2018年
3．雑誌名	6．最初と最後の頁
Ann Neurol	208-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）	査読の有無
10.1002/ana.25279.	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている（また、その予定である）	－

１．著者名 Song D, Yang Q, Lang Y, Wen Z, Xie Z, Zheng D, Yan T, Deng Y, Nakanishi H, Qing H	４．巻 155
２．論文標題 Manipulation of hippocampal CA3 firing via luminopsins modulates spatial and episodic short-term memory, especially working memory, but not long-term memory.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Neurobiol Learn Mem	６．最初と最後の頁 435-445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nlm.2018.09.009.	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 Meng J, Ni J, Wu Z, Jiang M, Zhu A, Qing H, Nakanishi H.	４．巻 2018:1083596
２．論文標題 The critical role of IL-10 in the antineuroinflammatory and antioxidant effects of Rheum tanguticum on activated microglia.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Oxid Med Cell Longev	６．最初と最後の頁 2018:1083596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/1083596.	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 Zhu A, Wu Z, Zhong X, Ni J, Li Y, Meng J, Du C, Zhao X, Nakanishi H, Wu S	４．巻 63
２．論文標題 Brazilian green propolis prevents cognitive decline into mild cognitive impairment in elderly people living at high altitude.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 J Alzheimers Dis.	６．最初と最後の頁 551-560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-170630.	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 Liu Y, Wu Z, Nakanishi Y, Ni J, Hayashi Y, Takayama F, Zhou Y, Kadowaki T, Nakanishi H.	４．巻 8(1):10304
２．論文標題 Infeaction of microglia with Porphyromonas gingivalis promotes cell migration and inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Sci Rep	６．最初と最後の頁 8(1):10304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-12173-1.	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14件（うち招待講演　2件／うち国際学会　1件）

1．発表者名 Nonaka S, Iseki A, Amano A, Nakanishi Y, Ni J, Wu Z, Nakanishi H.
2．発表標題 Involvement of endosomal signaling in gingipain-induced migration, inflammation response and phagocytosis in microglia after activation of PAR2、
3．学会等名 XIV European meeting on glial cells in health and disease (GLIA 2019)（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Junjun Ni、中西 博 、武 洲
2．発表標題 An impaired intrinsic microglial clock system induces neuroinflammatory alterations in the early stage of amyloid precursor protein knock-in mouse brain
3．学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Nonaka S, Nakanishi H.
2．発表標題 Secreted gingipains from Porphyromonas gingivalis induce microglia migration through endosomal signaling by protease-activated receptor 2
3．学会等名 第24回グリア研究会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Ni J, Wu Z, Nakanishi H,
2．発表標題 Cathepsin H deficiency suppresses hypoxic-ischemia-induced hippocampal atrophy in mice through reduced secretion of IFN-beta from microglia
3．学会等名 第24回グリア研究会
4．発表年 2019年

１．発表者名 中西　博
２．発表標題 アルツハイマー病治療のパラダイムシフト -歯周病とミクログリアの不都合な関係-
３．学会等名 第142回日本薬学会中国四国支部例会（招待講演）
４．発表年 2020年

１．発表者名 中西　博
２．発表標題 カテプシン群と痛みの治療
３．学会等名 第18回痛みの研究会（招待講演）
４．発表年 2019年

１．発表者名 佐藤泰司、諸橋 徹、林 良憲、板倉沙也子、川口慎憲、中西 博、メレディス アンドレア、石塚 俊晶
２．発表標題 脊髄ミクログリアBKチャネルの神経障害性疼痛における役割
３．学会等名 第92回日本薬理学会年会
４．発表年 2019年

１．発表者名 土本大介、古賀祐一郎、林 良憲、アボルハッサニ ノナ、米嶋康臣、中西　博、中別府雄
２．発表標題 ITPA欠損によるヒトてんかん性脳症のモデルとしての神経幹細胞特異的Itpaノックアウトマウス
３．学会等名 第41回日本分子生物学会
４．発表年 2018年

１．発表者名 Ni J, Wu Z, Nonaka S, Saido TC, Nakanishi H
２．発表標題 Involvement of reduced microglial BMAL1 expression in excessive neuroinflammation of APP knock-in (APP-KI) mice.
３．学会等名 第23回グリア研究
４．発表年 2018年

１．発表者名 孟ジェイ、朱愛琴、Junjuin Ni、林 良憲、中西 博、武　洲
２．発表標題 チベット薬Ratanasampilは、低酸素によるミクログリアにおける酸化ストレスならびにNF-kappaB活性化に依存した炎症反応を抑制する
３．学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
４．発表年 2018年

１．発表者名 Junjuin Ni、武 洲、林 良憲、中西 博
２．発表標題 ミクログリアにおけるカテプシン増大と細胞内の分布変化は、酸化ストレスならびに炎症反応を介して認知障害をもたらす
３．学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
４．発表年 2018年

１．発表者名 朱　愛琴、Junjun Ni、Jie Meng、中西　博、武　洲
２．発表標題 ブラジル産グリーンプロポリスはチベット高原に住む高齢者の全身炎症を軽減して認知機能の低下を防ぐ
３．学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
４．発表年 2018年

１．発表者名 Jie Meng、Junjun Ni、林　良憲、中西　博、朱　愛琴、武　洲
２．発表標題 チベット薬Ratanasampilは低酸素によるミクログリアにおける酸化ストレスならびにNF-kappaB活性化に依存した炎症反応を抑制する
３．学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
４．発表年 2018年

１．発表者名 Junjun Ni、武　洲、林　良憲、中西　博
２．発表標題 ミクログリアにおけるカテプシンBの発現増加及び細胞内分布変化はマウスにおける酸化ストレスや炎症反応による認知障害を誘発する
３．学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計1件

１．著者名 中西　博、野中さおり	４．発行年 2019年
２．出版社 実験医学増刊号	５．総ページ数 73-79
３．書名 脳の半分を占める グリア細胞:歯周病菌とミクログリアの不都合な関係 -アルツハイマー病治療のパラダイムシフト-	

〔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	倪　軍軍 (Ni Junjun) (00783953)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関