

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592171

研究課題名（和文） 歯周病による脳炎症誘発および加齢に伴う増悪における「髄膜－グリア連関」破綻の関与

研究課題名（英文） Age-dependent differential responses of glial cells and Leptomeningeas during systemic inflammation

研究代表者

新道 まゆみ (SHINDOU MAYUMI)

独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構・神経生物学ユニット・研究員

研究者番号：10444796

研究成果の概要：末梢炎症を誘発した若年ラットの大脳皮質のグリア細胞において抗炎症性サイトカインの IL-10 ならびに TGF- $\beta$ 1 の発現が認められた。一方、末梢炎症を誘発した中年ラットの大脳皮質では、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  の発現が髄膜に加えて脳実質内のグリア細胞にも認められた。さらに、末梢炎症を誘発した中年ラットの大脳皮質では髄膜における密着結合タンパク質であるオクルディンならびに ZO-1 の発現が低下しており、髄膜透過性の増大ならびに血球細胞の脳実質内への浸潤が認められた。初代培養髄膜細胞において IL-1 $\beta$  ならびに PGE<sub>2</sub> は各々オクルディンならびに ZO-1 の発現を有意に低下させた。IL-10 ならびに TGF- $\beta$ 1 は IL-1 $\beta$  ならびに PGE<sub>2</sub> の作用を抑制した。以上の結果、慢性の末梢炎症に対して髄膜－グリア連関は若齢ではニューロン保護的に、中年では逆にニューロン傷害的に作用することが明らかとなった。このことから特に中高年者では慢性の末梢炎症が深刻な脳炎症を引き起こすことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：病者行動、末梢炎症、脳炎症、髄膜、グリア細胞、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病などの慢性の末梢炎症は特に中高年者において認知症やアルツハイマー病の危険因子となることが知られている。ところが慢性の末梢炎症が脳にどのような影響を及ぼし、その影響が加齢によってどのように変容するのかについては不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

歯周病などの慢性感染症時には病者行動と呼ばれる食欲低下、体重減少、疲労感、鬱などの生理的・精神的变化が誘発される。病者行動は加齢により増悪することが知られているがそのメカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究は(1)末梢炎症により誘発される病者行動ならびに脳炎症に及ぼす加齢の影響ならびに(2)末梢炎症に伴う脳バリア機能の動態の加齢による変容に

ついて解析することを目的として行った。

### 3. 研究の方法

歯周病のモデルとしてアジュバント関節炎によって誘発される慢性炎症モデルを用いた。また急性炎症モデルとしてはリポポリサッカライド (LPS) の末梢投与を用いた。若齢 (2ヶ月齢) ならびに中年 (12ヶ月齢) の雌性ルイスラットの後肢にアジュバント関節炎を誘発し、炎症ピーク時に灌流固定した。脳を摘出した後に凍結切片を作成し、ABC法ならびに間接蛍光抗体法を用いて種々の抗体による免疫染色を行った。またHRPの静注によりバリア機能の変化を解析した。さらに初代培養髄膜細胞を用い、密着結合タンパク質であるオクルディンならびにZO-1に対する炎症性ならびに抗炎症性因子の影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 平成19年度はLPSにより誘発される病者行動ならびに脳炎症に及ぼす加齢の影響について検討した。4、12、24ヶ月齢のC57BL/6Jマウスを用い、LPS腹腔内投与後の自発運動ならびに社会行動量の変化を解析した。さらに、脳凍結切片を用いて免疫染色により脳炎症の状態を調べた。その結果、LPS投与後何れのグループにおいても自発運動ならびに社会行動量は有意に減少した。しかし、LPS投与24時間後には4ヶ月齢では投与前のレベルに回復したが、12ならびに24ヶ月齢では回復しなかった。また、24ヶ月齢では4ヶ月齢と比較してLPS投与後のグリア細胞におけるIL-1 $\beta$ 産生の増大が認められた。さらに、ルイスラットにおけるアジュバント関節炎モデルを用いて大脳皮質の髄膜ならびにそれに近接したグリア細胞の動態における加齢変化の検討を行った。その結果、4ヶ月齢ではアジュバント関節炎に伴い髄膜ならびにそれに近接したグリア細胞に抗炎症性サイトカインのIL-10ならびにTGF- $\beta$ 1の発現が認められた。一方、12ヶ月齢では炎症性サイトカインのIL-1 $\beta$ の発現が認められた。以上の結果より、髄膜-グリア細胞を介した炎症反応増大が中高年者における病者行動の増悪に関与していることが示唆された。

(2) 平成20年度は、「末梢炎症の髄膜バリア機能が加齢に伴って変容するのか」を明らかにする目的で、若齢ならびに中年ラットにおいてアジュバント関節炎に伴う末梢性炎症細胞の脳実質内への浸潤、ならびに髄膜における密着結合タンパク質 (オクルディン、ZO-1) の動態を解析した。若齢ラットではアジュバント関節炎のピーク時においても末梢性炎症細胞の脳実質内への浸潤ならびに

密着結合タンパク質の変化は認められなかった。一方、中年ラットではアジュバント関節炎に伴い好中球ならびにヘルパーT細胞の大脳皮質脳実質内への浸潤が見られた。さらに、オクルディンならびにZO-1の免疫反応性も有意に低下した。さらに初代培養髄膜細胞を用いて解析した結果、IL-1 $\beta$ はオクルディンの発現を抑制し、プロスタグランジンE<sub>2</sub>はZO-1の発現を抑制することが明らかとなった。このことから中年では末梢炎症時にグリア細胞から産生分泌されるIL-1 $\beta$ ならびにプロスタグランジンE<sub>2</sub>は密着結合タンパク質の発現を低下させ、末梢性炎症細胞の脳実質内への浸潤を促進することで脳炎症をさらに増強することが強く示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① Wu Z., Tokuda Y., Zhang X. W., and Nakanishi H.: Age-dependent responses of glial cells and leptomeninges during systemic inflammation. *Neurobiol. Disease* 32, 543-551 (2008), 有
- ② Hayashi Y., Yoshida M., Yamato M., Ide T., Wu Z., Ochi-Shindou M., Kanki T., Kang D., Sunagawa K., Tsutsui H., and Nakanishi H.: Reverse of brain aging by an overexpression of human mitochondrial transcription factor A in mice. *J. Neurosci.* 28: 8624-8634 (2008), 有
- ③ Sakamoto M., Miyamoto K. I., Wu Z., and Nakanishi H.: Possible involvement of cathepsin B released by microglia in methylmercury-induced cerebellar pathological changes in the adult rats. *Neurosci. Lett.* 442: 292-296 (2008), 有
- ④ Zhang R., Yamada J., Hayashi Y., Wu Z., Koyama S., Nakanishi H.: Inhibition of NMDA-induced outward currents by interleukin-1 $\beta$  in hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372: 816-820 (2008), 有
- ⑤ Yamada J., Hayashi Y., Jinno S., Wu Z., Inoue K., Kohsaka S., Nakanishi H.: Reduced synaptic activity precedes synaptic stripping in vagal motoneurons after axotomy. *Glia* 56: 1448-1462 (2008), 有
- ⑥ Yamasaki R., Zhang J., Koshiishi I., Sastradipura Suniarti D.F., Wu Z., Peters C., Schwake M., Uchiyama Y., Kira J. I., Saftig P., Utsumi H., and Nakanishi H.: Involvement of lysosomal storage-induced p38 MAP kinase activation in the

overproduction of nitric oxide by microglia in cathepsin D-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 35: 573-584 (2007), 有

⑦Hao H. P., Doh-ura K, and Nakanishi H.: Impairment of the microglial responses to the facial nerve axotomy in cathepsin S-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 85: 2196-2206 (2007), 有

⑧Hashioka S., Han Y. H., Fujii S., Kato H., Monji A., Utsumi H., Sawada M., Nakanishi H., and Kanba S.: Phosphatidylserine and phosphatidylcholine-containing liposomes inhibit amyloid  $\beta$  and interferon- $\gamma$ -induced microglial activation. *Free Rad. Biol. Med.* 42: 945-954 (2007), 有

⑨Hashioka S., Han Y. H., Fujii S., Kato H., Monji A., Utsumi H., Sawada M., Nakanishi H., and Kanba S.: Phospholipids modulate superoxide and nitric oxide production by lipopolysaccharide and phorbol 12-myristate-13-acetate-activated microglia. *Neurochem. Int.* 50: 499-506 (2007), 有

⑩ Wu Z., Hayashi Y. Zhang J., and Nakanishi H.: Involvement of PGE<sub>2</sub> released from leptomeningeal cells in increased expression of TGF- $\beta$ 1 in glial cells and cortical neurons during systemic inflammation. *J. Neurosci. Res.* 85: 184-192 (2007), 有

[学会発表] (計 19 件)

① Wu Z. et al. Age-dependent differential modulation of the barrier function of the leptomeninges in the cerebral cortex by activated glial cells during the systemic inflammation., 第 26 回国際精神神経薬理学会, 2008 年 7 月 14 日, ミュンヘン

②武 洲 他, 破骨細胞の食食機能に着目した新たな骨破壊抑制法, 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 24 日, 東京

③馬 紅梅 他, Phosphatidylserine-containing liposomes ameliorates the cytokine imbalance in the ankle joints of adjuvant arthritic rats. 第 50 回歯科基礎医学会, 東京

④Zhang R. et al., Inhibition of NMDA-induced outward currents by interleukin-1 $\beta$  in hippocampal neurons. 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 24 日, 東京

⑤徳田 幸恵 他, 中高年における慢性炎症は深刻な脳炎症を引き起こす, 第 50 回歯科基礎医学会, 2008 年 9 月 24 日, 東京

⑥林 良憲 他, TFAM 過剰発現によるミクログリア内レドックス制御と老化に伴う脳機能低下の防止, 第 13 回グリア研究会, 2008 年 1 月 8 日, 東京

⑦山田 純 他, 細胞内染色法を用いたミクログリアならびにアストロサイト 2008 年 1 月 8 日突起の微細構造の解析, 第 13 回グリア研究会, 東京

⑧Nakanishi H. et al., Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 $\beta$  in chromogranin A-stimulated microglia, 米国神経科学会議, 2008 年 1 月 17 日, ワシントン DC

⑨Wu Z. et al., Age-dependent differential regulation of tight junction proteins in the leptomeninges by glial cells during systemic inflammation. 米国神経科学会議, 2008 年 1 月 19 日, ワシントン DC

⑩Hayashi Y. et al., Overexpression of human TFAM prevents age-dependent memory impairment in mice by suppression of mitochondrial oxidative stress. 米国神経科学会議, 2008 年 1 月 19 日, ワシントン DC

⑪Yamada J. et al., Reduced synaptic activity mediated by extracellular nucleotides precedes synaptic stripping after an axotomy., 米国神経科学会議, 2008 年 1 月 19 日, ワシントン DC

⑫中西 博 他, ミトコンドリア転写因子 A の過剰発現によるミクログリア内レドックス制御ならびに老化に伴う脳機能低下の抑制, 第 61 回日本西南部会, 2008 年 1 月 28 日, 米子

⑬武 洲, 末梢炎症に対する髄膜-グリア連関の反応の老化に伴う変容, 第 61 回日本西南部会, 2008 年 1 月 28 日, 米子

⑭Zhang R., Involvement of p38 MAPK in interleukin-1 $\beta$ -induced inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal neurons, Berlin Brain Days 2008, 2008 年 1 月 11 日, ベルリン

⑮Nakanishi H. et al., Involvement of cathepsin B in the processing and secretion of interleukin-1 $\beta$  in chromogranin A-stimulated microglia, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日, 横浜

⑯ Wu Z. et al., Age-dependent differential microglial and astrocytic responses through leptomeninges during systemic inflammation, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日, 横浜

⑰Wu Z. et al., Systemic inflammation induces age-dependent differential activation of glial cells through the leptomeninges. 第 8 回ヨーロッパグリア (Euroglia) 会議, 2007 年 9 月 6 日, ロンドン

⑱ Nakanishi H. et al., Overproduction of nitric oxide by microglia due to lysosomal storage-induced p38 MAP kinase activation in cathepsin D-deficient mice.,

米国神経科学会議，2007年11月6日，  
サンディエゴ

⑱中西 博, Synaptic Stripping における細胞外ヌクレオチドの関与, 第81回日本薬理学会総会, 2008年3月17日, 横浜

〔図書〕(計2件)

① Wu Z. and Nakanishi H., Nova Science Publishers Inc., Age-dependent differential activation profiles of glial cells by the leptomeninges during systemic inflammation: In Neuroimmunology Research Focus (2007) 108-118.

② Nakanishi H., Kluwer Publishing Corporation, Microglial Proteases: In Neural Protein Metabolism and Function. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology (2007) 552-564.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新道 まゆみ (SHINDOU MAYUMI)

独立行政法人沖縄科学技術研究基盤整備機構・神経生物学ユニット・研究員

研究者番号：10444796

### (2) 研究分担者

中西 博 (NAKANISHI HIROSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：20155774

武 洲 (TAKE HIRO)

九州大学・大学院歯学研究院・研究員

研究者番号：10420598

### (3) 連携研究者

なし