

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24078

研究課題名(和文) 歯周炎による血液脳関門障害遺伝子の解析およびアルツハイマー病への影響

研究課題名(英文) Effect of periodontitis on blood-brain barrier related genes and its relation to Alzheimer's disease

研究代表者

森川 哲郎 (MORIKAWA, Tetsuro)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：90845463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病のアルツハイマー病への関与が示唆されている。本研究では、歯周病原菌の一つである *P. gingivalis* による脳の血液脳関門への影響を確認した。本研究は、ヒト脳血管内皮細胞を用いた。血管内皮細胞に対して、*P. gingivalis* の Lipopolysaccharide (LPS) を 1.0 ug/ml の濃度で添加し 24 時間血管内皮専用培地にて培養を行った。タイトジャンクションの構成に関わる遺伝子 (Claudin-1, 3, 5, 12, Occludin, ZO-1, VE-cadherin) の発現変化を確認した。その結果、Claudin-5 において発現低下が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳には血液脳関門 (BBB) があり、血液中から脳組織への物質の移行は厳密に制限されている。BBB は脳毛細血管内皮細胞が密接に結合し、その周囲に脳血管周皮細胞とペリサイトが存在する。これまで、この 3 種類の BBB 構成細胞の機能についての研究は進められてきたが、歯周病原菌が BBB 構成細胞にどのように影響するかについては仮説の域を出ていないのが現状である。そこで本研究では、LPS が BBB に対してどのような機序で障害を及ぼし、脳海馬へ影響するかについて検証する。これらの機序が明らかとなれば、*P. gingivalis* によるアルツハイマー病発症・進行の病態解明が大きく前進するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that periodontal disease may have a role in pathogenesis of Alzheimer's disease. In this study, we investigated the effect of *Porphyromonas gingivalis*, one of the periodontal pathogens, on the blood-brain barrier. Human Brain Microvascular Endothelial cells were cultured in a vascular endothelial medium for 24 hours and *P. gingivalis* derived Lipopolysaccharide (LPS) was added to the cells at a concentration of 1.0 ug / ml. The tight junction related genes such as Claudin-1, -3, -5, -12, Occludin, ZO-1 and VE-cadherin were analyzed for changes in mRNA expression level using qRT-PCR. The results showed that the mRNA level of Claudin-5 was significantly downregulated in cells cultured with LPS as compared to control.

研究分野：口腔病理

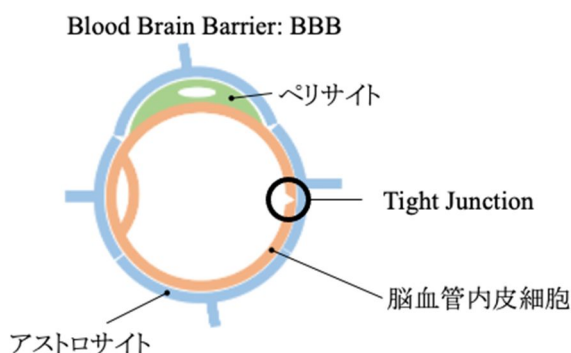
キーワード：血液脳関門 LPS 歯周病

1. 研究開始当初の背景

脳には血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) があり、血液中から脳組織への物質の移行は厳密に制限されている。歯周病は口腔内でおこる慢性炎症性疾患であり、主要な歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は歯周炎の発症および進行に強く関与している。近年、歯周病は糖尿病、呼吸器疾患、感染性心内膜炎、自己免疫疾患等の全身性疾患の危険因子であることが知られている。近年、正常なヒトの脳組織にはみられない歯周病原菌である *P. gingivalis* がアルツハイマー病患者の剖検脳組織において検出されたとの報告がある。また、マウスを用いた研究においても、脳内から *P. gingivalis* や *P. gingivalis* 由来の内毒素が検出され、脳内のアミロイドタンパクが増加していることから、歯周病原菌のアルツハイマー病への関与が示唆されている。しかし、*P. gingivalis* がどのような機序で BBB を通過しているのかについては未だ明らかとされていない。

2. 研究の目的

BBB は脳毛細血管内皮細胞が密接に結合し、その周囲に脳血管周皮細胞 (アストロサイト) とペリサイトが存在する、3種類の細胞により構成されている (図1)。これまで、この3種類の BBB 構成細胞の機能についての研究は進められてきたが、*P. gingivalis* や *P. gingivalis* 由来 Lipopolysaccharide (LPS) が BBB 構成細胞にどのように影響するかについては仮説の域を出ていないのが現状である。そこで本研究では、*P. gingivalis* がどのように BBB を障害した後に脳海馬へ到達し、アルツハイマー病の発症・進行に影響するかについてそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。



3. 研究の方法

(1) 細胞への *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激

本研究ではヒト脳血管内皮細胞に *P. gingivalis* 由来 LPS を 1.0 ug/ml 添加し 24 時間の培養を行った。*P. gingivalis* 由来 LPS 添加前に細胞を 18 時間～24 時間前培養した。細胞培養には血管内皮細胞専用培地を用いた。対照群として *P. gingivalis* 由来 LPS 非添加群を用いた。細胞培養後、RNA、DNA 及びタンパク質の抽出を行った。それぞれのサンプルの抽出には RNeasy mini kit(QIAGEN)、DNeasy Blood&Tissue kit(QIAGEN)、EzRIPA Lysis kit(ATTO)を使用した。

(2) mRNA の発現解析

上記研究の方法 (1) で抽出した RNA を用いて、mRNA 発現解析を行った。mRNA 発現変化は、定量的 real-time PCR (RT-PCR) 法により解析した。今回はタイトジャンクションの構成に関わる遺伝子として知られている、Claudin-1,3,5,12, Occludin, ZO-1, VE-cadherin の発現変化を確認した。

(3) Methylation Specific PCR (MSP) 解析

上記研究の方法(2)で変化のみられた遺伝子について抽出した DNA を用いて MSP 解析を行った。MSP 解析は mRNA 発現のメカニズムを調べるために、抽出した DNA を EpiectBisulfiteKit(QIAGEN)を用いて Bisulfite 処理を行った。

(4) miRNA 発現解析、タンパク発現解析

mRNA 発現解析により変化のみられた遺伝子について mRNA 発現変化のメカニズムを調べるために miRNA 発現解析を行った。miRNA の発現解析は miScriptII RT kit(QIAGEN)を用いて行った。タンパク質抽出より得られたサンプルを用いてタンパク発現解析を行った。タンパク質発現解析にはウエスタンブロットングを用いた。

4. 研究成果

(1) mRNA 発現解析

定量的 RT-PCR 法を用いて、BBB のバリア機能として働いているタイトジャンクションにみられる遺伝子である Claudin-1,3,5,12、Occludin、ZO-1、VE-cadherin の発現変化を確認した。

その結果、Claudin-5 においては対照群と比較して、*P. gingivalis* 由来 LPS 添加群においては有意に発現が低下していることが確認された。

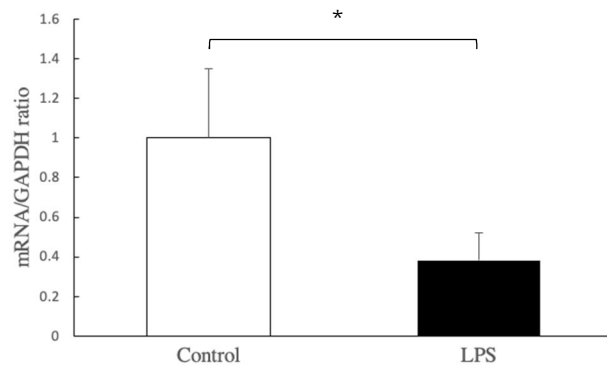


図. Claudin-5におけるmRNA発現解析

(2) MSP 解析、miRNA 発現解析、タンパク発現解析

上記研究結果より発現変化がみられた Claudin-5 について mRNA 変化のメカニズムを調べるために MSP 解析、miRNA 発現解析を行った。

MSP 解析結果

MSP 解析ではメチル化変化が起こっている割合が、対照群では 72.6%、*P. gingivalis* 由来 LPS 添加群では 69.5%であり有意な変化はみられなかった。

miRNA 発現解析結果

miRNA 発現解析では miR21 について発現解析を行った。図に示すように miR21 の発現は対照群と比較して *P. gingivalis* 由来 LPS 添加群において低下していたが有意な差は認められなかった。

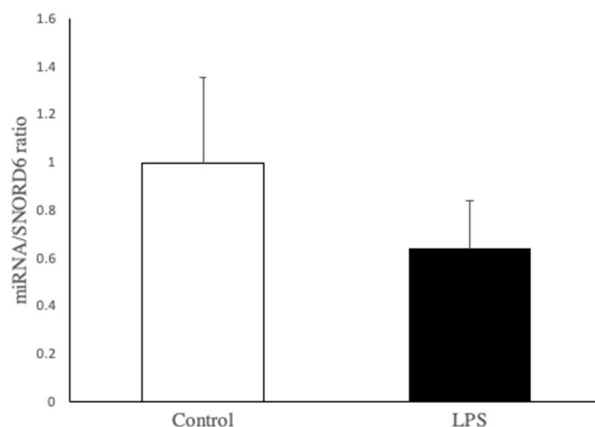


図. miR21におけるmiRNA発現解析

タンパク質発現結果

Claudin-5 のタンパク質発現変化を確認するために、Claudin-5 Monoclonal 抗体 (invitrogen) を用いてウエスタンブロットングを行なった。ウエスタンブロットングによるタンパク発現解析においては対照群と *P. gingivalis* 由来 LPS 添加群には発現変化がみられなかった。

以上より、*P. gingivalis* 由来 LPS が BBB のタイトジャンクションを構成している遺伝子の一つである Claudin-5 に影響を与えることが示唆された。しかし、詳細なメカニズムについては不明な点が多いので更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森川哲郎, 植原治, Durga Paudel, 高橋周平, 吉田光希, 佐藤惇, 安彦善裕
2. 発表標題 P. gingivalis由来LPSによる脳血管内皮細胞の遺伝子発現の変化
3. 学会等名 第33回日本口腔診断学会・第30回日本口腔内科学会・第13回日本口腔検査学会合同学術大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------