

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18492

研究課題名(和文) 歯周病原細菌のメンブレンベシクルはアルツハイマー病の病原因子となるのか

研究課題名(英文) Are membrane vesicles of periodontopathogenic bacteria a pathogenic factor in Alzheimer's disease?

研究代表者

平山 悟 (HIRAYAMA, SATORU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70778555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の発症に歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* のメンブレンベシクルが関与する可能性について検討することを目的に、*P. gingivalis* ベシクルを調製し、血液脳関門モデルを用いた *in vitro* 試験に供した。また、研究を効率的に進行させるため、細菌ベシクル産生量が増大する条件を検討した。大腸菌をモデルとして培養時にグリシンを添加すると、ベシクル収量は顕著に増大した。非誘導ベシクルと比較すると、エンドトキシン活性が減少したが、同等の免疫誘導活性を保持していた。グリシンによる誘導は *Acinetobacter baumannii* においても有効だった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病は発症の原因が特定されておらず、認知症を根治できる薬物療法も存在しない。したがって治療が困難であるため、アルツハイマー病の予防や進行を遅らせることは極めて重要である。したがって、*Porphyromonas gingivalis* とアルツハイマー病との関連性を明らかにできれば、アルツハイマー病の発症メカニズムの理解や予防に貢献できる。また、グリシンによる細菌のメンブレンベシクル産生誘導法は、感染症をはじめとしてメンブレンベシクルが関連する様々な研究の進展に役立てられ、アジュバントやワクチン開発等の幅広い分野への応用展開も期待することができる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the possible role of membrane vesicles of the periodontopathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *P. gingivalis* vesicles were prepared and used in an *in vitro* study using a blood-brain barrier model. In order to efficiently conduct the study, we investigated the conditions under which the production of bacterial vesicles increases. The vesicle yield was significantly increased when glycine was added during culture using *Escherichia coli* as a model. Compared to non-induced vesicles, endotoxin activity was decreased, but the same immunoinductive activity was maintained. Glycine induction was also effective in *Acinetobacter baumannii*.

研究分野：細菌学

キーワード：メンブレンベシクル 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* アルツハイマー病 グリシン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は複雑な進行性神経変性障害であり、認知症の主な原因である。世界中で約 5,000 万人が AD を含む認知症の影響を受けており、AD の有病率は 2050 年までに 2 倍以上になると予測されている (Cummings *et al.* J Alzheimers Dis 2019)。AD 患者の増加は高齢化社会において深刻な社会的・経済的コストを生じさせる (Pritchard *et al.* Front Aging Neurosci 2017)。

AD の主な病態として、脳神経細胞外におけるタンパク質の凝集沈着であるアミロイド (A $\beta$ ) と呼ばれる老人斑の形成、脳神経細胞内における神経原線維変化 (タウタンパク質の凝集線維化) が生じることが挙げられ、これらにより神経細胞が死滅すると考えられている (Selkoe, *Physiol Rev* 2001)。しかしながら、AD は発症の原因が特定されておらず、認知症を根治できる薬物療法も存在しない。したがって治療が困難であるため、AD の予防や進行を遅らせることは極めて重要である。

歯周病原細菌は咀嚼、ブラッシング、歯科処置等をきっかけに血流に侵入し、菌血症を誘発することが示唆されており (Poole *et al.* J Alzheimers Dis 2013)、歯周病変は歯周病原細菌を継続的に全身に拡散させるリザーバーとなる。慢性歯周炎はアテローム性動脈硬化等の血管疾患をはじめ、糖尿病、呼吸器疾患、腎疾患、関節リウマチ、さらには AD を含む全身性疾患への関連が報告されている (Poole *et al.* J Alzheimers Dis 2013)。

最近の疫学的なコホート研究により、10 年間の慢性歯周炎が AD 発症リスクを 1.7 倍に増加させることが示された (Chen *et al.* Alzheimers Res Ther 2017)。また、歯周病を有する AD 患者は、歯周病でない患者に比較して、有意に認知機能が低いという別の報告もある (Kamer *et al.* J Alzheimers Dis 2012)。

それだけでなく、歯周病原細菌の中でも *Porphyromonas gingivalis* の LPS が AD 患者の脳より検出され、その LPS によって脳炎症を引き起こすことが報告されている (Poole *et al.* J Alzheimers Dis 2013)。また、動脈硬化のモデルである ApoE 欠損マウスを用いた検討では、*P. gingivalis* の経口感染が脳への感染をもたらした一方で、*P. gingivalis* とともに歯周病に関連が深い *Treponema denticola*、*Tannerella forsythensis* は経口感染後も脳から検出されなかった (Poole *et al.* J Alzheimers Dis 2015)。

以上のことから、歯周病原細菌の中でも特に *P. gingivalis* の感染が AD の発症や増悪に関与する可能性が強く示唆されつつある。したがって *P. gingivalis* と AD との関連性を詳らかにすることは、AD の発症メカニズムの理解や予防に貢献できる重要な課題である。

### 2. 研究の目的

メンブレンベシクル (以下ベシクルと記述する) は 20~400 nm ほどの小胞であり、グラム陰性・陽性問わずあらゆる細菌が産生し、細菌細胞外に放出する。*P. gingivalis* のベシクルも一般的なベシクルのように細菌細胞由来のリン脂質や膜タンパク質、LPS 等で構成されるが、それだけでなく、病原因子である gingipain が優先的に濃縮されることが示されている (Mantri *et al.* Microbiologyopen 2015)。*P. gingivalis* のベシクルは、病原因子の宿主細胞への伝達に加え、ヒト口腔上皮細胞・歯肉線維芽細胞・臍静脈内皮細胞への侵入や細胞障害、炎症反応の誘導等、*P. gingivalis* 細胞と同様の特徴的な性質を示し (Xie *Future Microbiol* 2015)、種々の疾患に関与する可能性が示唆されている。一方で、*P. gingivalis* のベシクルが AD の発症や増悪に関与する可能性については、これまでに検討がなされていない。

そこで本研究では、*P. gingivalis* のベシクルが病原因子のキャリアとなり、血液脳関門を突破して脳に到達し、AD の発症や増悪に関与する可能性について、血液脳関門モデルを用いた *in vitro* 実験、マウスを用いた *in vivo* 実験から明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *P. gingivalis* ベシクルに関する検討

*P. gingivalis* のベシクル調製は、Hirayama and Nakao *Methods Mol. Biol.* 2020 の方法に従って行った。*P. gingivalis* の培養上清をフィルトレーション後、超遠心分離することにより、ベシクルを含む画分を回収した。さらに必要に応じて、iodixanol を用いた密度勾配遠心分離によって、ベシクルを精製した。Bradford 法によるタンパク質定量や蛍光色素 FM4-64 を用いた脂質定量を行うとともに、走査型電子顕微鏡・透過型電子顕微鏡による観察を行った。

#### (2) ベシクル産生の誘導に関する検討

研究を効率的に進行させるため、ベシクル産生量が増大する培養条件を検討した。細菌のベシクル産生モデルとして大腸菌を用いた。大腸菌はプロバイオティクスとして使用実績のある *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) 株を使用した。はじめに、ベシクル画分に鞭毛が混入すること

を防ぐため、鞭毛の欠損株 (EcN *flhD* 株) を作製した。*flhD* 遺伝子の欠損は Datsenko and Wanner の方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000) に従った。ベシクルのタンパク質定量は Bradford 法で行い、脂質定量はリノール酸を標準物質として蛍光色素 FM4-64 を用いて行った。エンドトキシン活性の測定ではエンドスペシー ES-50M セット (生化学工業株式会社) を使用した。ベシクルに含まれるタンパク質について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロットによって解析した。また、マウスマクロファージ様細胞 J774.1 におけるサイトカイン発現をリアルタイム PCR 及び ELISA によって解析した。マウス経鼻ワクチンモデルを用いて、オボアルブミン (OVA) とともにベシクルや他のアジュバントをマウスに接種し、OVA に対する特異的抗体産生を ELISA によって測定した。産生が誘導されたベシクルは、非誘導ベシクルとの特性比較を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) *P. gingivalis* ベシクルに関する検討

タンパク質定量や脂質定量、また電子顕微鏡観察から、*P. gingivalis* のベシクルが調製できていることを確認した。培養条件を一定にすることにより、一定の量と質のメンブレンベシクル調製を確立することができた。血液脳関門モデルを用いた *in vitro* 実験により、*P. gingivalis* のベシクルが血液脳関門を通過するかどうかを検討中である。

##### (2) ベシクル産生の誘導に関する検討

大腸菌の培養に用いる LB 培地に様々な化合物を添加して検討した中で、グリシンを添加することが顕著なベシクル産生量の増大を導いた。EcN  $\Delta flhD$  株の培養時に 1.0~1.2% のグリシンを添加することで、ベシクルの収量は最大となった。1.0% グリシン添加条件で調製したベシクル画分は、非誘導条件に比較して、タンパク質量が約 70 倍、脂質量が約 50 倍となった。グリシン誘導ベシクルと非誘導ベシクルのサイズ (粒径) を電子顕微鏡観察像から比較すると、グリシン誘導ベシクルはサイズの増大が認められた。また、グリシン誘導によってベシクルのタンパク質組成に変化が生じており、細胞質タンパク質及び内膜タンパク質の割合が増大していることが示された。グリシン誘導ベシクルは、非誘導ベシクルとは異なったメカニズムによって産生されていることが考えられた。加えて、グリシン誘導ベシクルのエンドトキシン活性は、非誘導ベシクルに比較して約 1/8 に減少した。一方で、グリシン誘導の有無に関わらず、どちらのベシクルも、マウスマクロファージ様細胞 J774.1 からの IL-6、IL-12 及び TNF- $\alpha$  の産生を添加量依存的に誘導した。また、グリシン誘導ベシクルは、OVA を抗原としたマウス経鼻ワクチンモデルにおいて、アジュバントとして用いたコレラトキシン B サブユニットや poly (I:C) と同等もしくはそれ以上に強力な粘膜アジュバント活性を示した。

これらのことから、グリシンによって大腸菌ベシクルの産生を顕著に誘導することができた。グリシンによるベシクル産生の誘導は大腸菌のみに限らず、*Acinetobacter baumannii* においても有効だった。グリシンによって産生を誘導した EcN MV が有する上記の利点を活用すれば、安全で効果的なアジュバントやワクチン開発等、幅広い分野へ応用展開することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirayama Satoru, Nakao Ryoma	4. 巻 2414
2. 論文標題 Glycine Induction Method: Effective Production of Immunoactive Bacterial Membrane Vesicles with Low Endotoxin Content	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology	6. 最初と最後の頁 207 ~ 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1900-1_13	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平山悟, 中尾龍馬
2. 発表標題 グリシンによる細菌メンブレンベシクル産生の誘導とその特性
3. 学会等名 生物工学Webシンポジウム2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平山悟, 中尾龍馬
2. 発表標題 グリシンにより誘導された細菌メンブレンベシクルの特性解析 歯周病原細菌ベシクルワクチンの粘膜アジュバント開発等に向けて
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平山悟, 中尾龍馬
2. 発表標題 グリシンにより誘導された細菌メンブレンベシクルの性質とアジュバント活性の解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	中尾 龍馬 (Nakao Ryoma)  (10370959)	国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官  (82603)	

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