

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16998

研究課題名（和文）歯周病原菌による脳内BBB構成細胞のエピジェネティクスの網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of epigenetics of BBB cells in the brain by periodontal pathogens.

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） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）と歯周病との関連が示されており、脳内へ歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (P. g) の侵入が確認されている。歯周病原菌または病原菌由来物質が、血液脳関門の機能低下を導き、ADの原因となることが知られてきている。そこで、本研究ではP. gと脳血管内皮細胞を用いた研究を行った。P. g添加12時間後にRNA抽出し、RNAシーケンスを用いて解析を行なった。解析の結果、対照群に対して実験群では92の遺伝子発現減少と83の遺伝子発現増加を確認した。発現変化した遺伝子の中に有意差のある遺伝子は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血液脳関門を構成する細胞の一つである脳血管内皮細胞を用いて歯周病原菌による遺伝子発現変化を確認した。その結果、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* の刺激により脳血管内皮細胞の遺伝子発現に変化が生じる可能性が示唆された。血液脳関門の機能低下はアルツハイマー病の原因となることが知られており、歯周病原菌による血液脳関門の機能低下メカニズムについては明らかとなっていない。本研究は、歯周病とアルツハイマー病の関係性の解明とアルツハイマー病予防につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) has been shown to be associated with periodontal disease, and invasion of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* (P. g) into the brain has been confirmed. It is known that periodontal pathogens or pathogen-derived substances lead to dysfunction of the blood-brain barrier and cause AD. In this study, P. g and cerebral vascular endothelial cells were used. 12 hours after the addition of P. g, RNA was extracted and analyzed using RNA sequencing. The analysis showed a decrease in gene expression of 92 genes and an increase in gene expression of 83 genes in the experimental group compared to the control group. No significant differences were found among the genes whose expression was altered.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：口腔病理

キーワード：歯周病原菌 アルツハイマー病 血液脳関門 網羅的解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身的な感染症においても、細菌や、細菌由来物質が脳に達することが知られているが、その際には、血液脳関門 (BBB) を通過する必要がある。最近、歯周病原菌または病原菌由来物質も、BBB の機能低下を導き、アルツハイマー病の原因となることも知られてきているが、そのメカニズムは不明である。BBB は脳血管内皮細胞やアストロサイト、ペリサイトから構成されており (図 1)、血中の物質がここを通過するルートには、“細胞の間隙を通る paracellular route” と“細胞内を通る

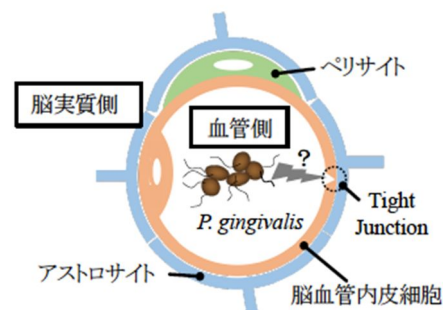


図1. 歯周病原菌によるBBB への影響

transcellular route”の2つがある。脳血管内皮細胞には密着結合 (Tight junctions) と呼ばれる細胞間接着装置が存在し、アストロサイトは、第二のバリアとして機能し、ペリサイトは内皮細胞を被覆し血管を物理的に安定化させている。歯周病原菌由来の LPS が BBB を透過するルートとして“transcellular route”を介しているとの報告は僅かにあるものの、その詳細は不明である。アルツハイマー病の剖検例の脳から *P. gingivalis* の存在が確認されていること (Poole S et al. J. Alzheimer Dis., 2013) や、マウスを用いた研究でも脳内への *P. gingivalis* の侵入が確認されていることから (Ishida, N et al., Aging Mech Dis., 2017) “paracellular route”を介したルートの存在も示唆されるが、その詳細は明らかとなっていない。これまで申請者らの研究グループでは、*P. gingivalis* 由来内毒素 lipopolysaccharide (*P. gingivalis* 由来 LPS) が歯周組織由来細胞にエピジェネティクス変化を引き起こすことを報告してきた (Takai R, et al. J Periodontal Res. 2016)。

エピジェネティクスとは、環境因子により影響を受ける遺伝子表現系で、DNA の塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現が変化する現象であり、代表的なものに DNA メチル化やヒストン修飾、miRNA がある。最近、BBB の構造維持のために miRNA が重要な役割をしていることが示唆された (Yugang Z et al., Mediators Inflamm., 2016)。これらのことから、*P. gingivalis* による BBB 機能低下には BBB を構成する細胞のエピジェネティクス変化があるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病原菌である *P. gingivalis* による BBB 構成細胞の一つであるヒト脳血管内皮細胞の遺伝子発現について網羅的に検索し、BBB の機能低下に関わる遺伝子発現変化と遺伝子発現変化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

ヒト脳血管内皮細胞への歯周病原菌添加

60 mm ディッシュにヒト脳血管内皮細胞を 1.0×10^6 cells を播種し 5 倍量の *P. gingivalis* (MOI=5) を添加し、12 時間培養した。対照群には *P. gingivalis* 非添加群とし生理食塩水を添加した。12 時間の培養後、培養細胞サンプルから RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて、total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA は Illumina NovaSeq 6000 を用いて RNA シーケンスによる網羅的遺伝子解析を行なった。また、24 ウェルプレートとインサート膜 (0.4 μ m) を用いて細胞培養を行った、インサート膜上にヒト脳血管内皮細胞を播種し、細胞播種から 6 時間の前培養後に *P. gingivalis* 添加した。*P. gingivalis* 添加後、12 時間培養し、Sodium fluorescein (NaF) を用いて透過性試験を行った。

4. 研究成果

1. *P. gingivalis* 菌体添加によるヒト脳血管内皮細胞の遺伝子発現変化

P. gingivalis 菌体添加によるヒト脳血管内皮細胞の遺伝子発現変化を確認するために、ヒト脳血管内皮細胞に *P. gingivalis* を添加した。生きている細菌を想定し、*P. gingivalis* とヒト脳血管内皮細胞共培養時間は 12 時間とした。*P. gingivalis* を添加の 12 時間後に total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA は Illumina NovaSeq 6000 を用いてデータを取得した。得られたデータは iDEP 2.01 を用いて解析した。解析の結果、対照群 (Control 群) に対して実験群 (*P. g* 添加群) では 92 の遺伝子発現減少と 83 の遺伝子発現増加を確認した。サンプル間の遺伝子発現の類似度を可視化する Principal component analysis (PCA) においては群間で大きな変化は認められなかった (図 1)。また、発現変化した遺伝子の中に統計学的に有意な差のある遺伝子は認められず、パスウェイ解析においても統計学的に有意な変化は認められなかった (表 1)。パスウェイ解析においても有意な変化は認められなかったが、不飽和脂肪酸の生合成やパーキンソン病、コレステロール代謝に関わるパスウェイが変化している可能性が示唆された (表 1)。

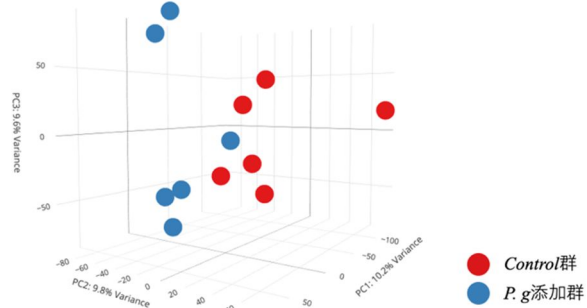


図 2

表 1

Direction	C vs Pg Pathways	adj.Pval
Down	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5.80E-02
	Collecting duct acid secretion	7.30E-02
	Basal transcription factors	7.30E-02
	Phosphatidylinositol signaling system	7.30E-02
	Synaptic vesicle cycle	7.40E-02
	Parkinson disease	7.40E-02
Up	Cholesterol metabolism	5.80E-02

2. 細胞透過性試験

P. gingivalis とヒト脳血管内皮細胞共培養により、血液脳関門の機能変化を確認することを目的として細胞透過性試験を行った。血液脳関門を構成しているヒト脳血管内皮細胞の接着を評価するために NaF を用いた。NaF は血液脳関門の細胞間透過性を蝕化する試験として用いられており、*P. gingivalis* を添加することによって、脳血管内皮細胞の透過性が亢進するとの報告がある。脳血管内皮細胞間の透過性亢進は、脳内への細菌やその毒素の移動が増加することが考えられる。本研究で行った細胞透過性試験においては、Control 群と比較して *P. gingivalis* 添加群でわずかな透過性の上昇が認められたが、統計学的に有意な変化は認められなかった (図 2)。

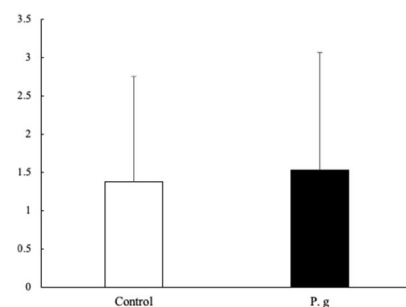


図 3 NaFを用いた透過性試験

これらの結果については、*P. gingivalis* の添加条件や添加時間を再検討する必要があると考えられる。統計学的な変化は認められなかったが、不飽和脂肪酸の生合成やパーキンソン病、コレステロール代謝に関わるパスウェイが変化している可能性が示唆されたことについては今後の研究課題である。

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 1件）

1 . 発表者名 Tetsuro Morikawa
2 . 発表標題 Systemic administration of lipopolysaccharide decreased expression of neprilysin in mouse
3 . 学会等名 AADOCR/CADR（国際学会）
4 . 発表年 2023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
---------	---------