

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861584

研究課題名(和文) 口腔微生物由来TLRリガンドによる糖尿病性正常圧水頭症の発症機構

研究課題名(英文) Mechanism of onset of diabetic normal pressure hydrocephalus by oral microorganism-derived TLR Ligands

研究代表者

加地 千晶 (KAJI, CHIAKI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：60707214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：この研究で、糖尿病マウスの脳室におけるP-cadherinとpodoplaninの発現が減少すること、P-cadherinとpodoplaninの抗体を定期的に腹腔投与した糖尿病マウスがhumane endpointに達することを見出しました。P-cadherinとpodoplaninはN-cadherinなどと協調して細胞接着と細胞骨格形成に寄与する分子です。糖尿病では脳のP-cadherinやpodoplaninが減少することで細胞同士の接着機能が低下し、脳脊髄液脳関門のバリア形成機能が低下することによって、水頭症などの原因となる可能性が考えられました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that the expression of P-cadherin and podoplanin in the ventricles of diabetic mice is decreased, and that diabetic mice regularly given P-cadherin and podoplanin antibodies intraperitoneally reach the humane endpoint. P-cadherin and podoplanin are molecules that contribute to cell adhesion and cytoskeleton formation in cooperation with N-cadherin and others. It is thought that in the diabetic brain the reduction of P-cadherin and podoplanin may cause the dysfunction of adhesion between the ventricle cells, which is responsible for the hydrocephalus due to the deterioration of brain cerebrospinal fluid barrier function.

研究分野：障害者歯科学

キーワード：糖尿病 水頭症 脳脊髄液脳関門 P-cadherin podoplanin

1. 研究開始当初の背景

日本の国民病である糖尿病は 2011 年に世界第 6 位の 1070 万人を数えた。その 40% に続発する合併症の原因物質は、血液高分子蛋白が高血糖環境で非酵素的糖修飾と酸化を受けた終末糖化産物 advanced glycosylated endproducts (AGE) とされる。血清 AGE で最も多い N ϵ -carboxymethyl- lysine (CML) の分子構造には免疫原性があり、血管内皮細胞は CML を AGE 受容体で認識して NF- κ B 活性化経路で白血球接着因子の発現を増強する^{1,2)}。腎臓では CML がメサンギウム細胞にサイトカイン産生を促すことで、IV 型コラーゲンなど細胞外基質の増生による糸球体硬化を亢進させることが明らかとなってきた¹⁻³⁾。最近、申請者らの研究グループは、口腔扁平上皮癌と糸球体上皮の共通抗原 podoplanin 特異抗体を開発した (Cancer Sci のトピックス In this issue に選定)^{4,5)}：ラット抗マウス podoplanin 抗体 (PMab-1)、ラット抗ヒト podoplanin 抗体 (NZ-1.2) (特許 PCT/JP2010/067141) (MBL, Imgenex, Sigma, Millipore で販売)。さらに、国内外で先行する抗体 (クローン D2-40, 8.1.1) より糸球体上皮特異性が強いこれら開発抗体を用いて糖尿病ヒトおよびマウス腎系球体の免疫分子発現を検索し、1 型および 2 型糖尿病環境にある腎系球体毛細血管は微生物成分の受容体 toll-like receptor (TLR) 2 と 4 を発現すること、このような現象は他の組織内血管では見られないことを初めて報告した⁶⁾。一方、脳脊髄液圧が正常であるにもかかわらず脳室が拡大する高齢者の特発性正常圧水頭症は、認知症の 5~10% を占め、治癒可能であるものの治療率は 0.5% とされる。危険因子は高血圧と糖尿病であるが、発症機構は全くわかっていない。申請者はこれまで、脈絡

叢上皮が腎系球体上皮で透過制御に関わる podoplanin⁷⁾ を脳室側に、また胎盤関門で発現する P-cadherin を基底側に、密着結合とは独立して発現し物質の透過制御を行う可能性を初めて見出した⁸⁾。さらにその応用研究において、糖尿病マウスでは脳室脈絡叢上皮に TLR 発現が見られる場合、podoplanin の発現が抑制されることに気づいた。そこで申請者は、CML 蓄積など長期的酸化ストレス環境下の脈絡叢では、毛細血管に TLR の発現が起こり、さらに辺縁性・根尖性歯周炎などの慢性口腔感染症で体循環系に侵入した微生物成分が TLR を介して脈絡叢毛細血管内皮細胞を刺激すると、炎症性サイトカインの産生とともに血液脳脊髄液関門が障害され、正常圧水頭症が発症する可能性を考えた。

2. 研究の目的

- 1) 高血糖環境下で TLR 発現の誘導された脈絡叢毛細血管内皮細胞が、体循環系に入った口腔微生物成分を TLR で認識し、炎症性サイトカインを産生すること
- 2) 炎症性サイトカインで刺激された脈絡叢を覆う脈絡叢上皮がタイト結合や接着結合の構成タンパクの消失を起こすことを、糖尿病モデルマウスと培養細胞によって明らかにする。

<参考文献>

- 1) Wang. Atherosclerosis. 2012;221:387-396.
- 2) Nerlich. Ann NY Acad Sci. 2007;1096:239-248.
- 3) Alkhalaf. PLoS One. 2012;7:e40427.
- 4) Kaji. Acta Histochem Cytochem 2012;45:227-237.
- 5) Kaneko. Cancer Sci, 2012; 103:1913-1919
- 6) Takata. Acta Histochem Cytochem 2013; 46:35-42.
- 7) Breiteneder-Geleff. Am J Pathol 1997;151:1141-1152
- 8) Kaji. J Anat 2012;220:435-446.

3 . 研究の方法

平成 2 5 年度

1 . 糖尿病環境下の脈絡叢毛細血管における TLR シグナル伝達系活性化の証明

1)糖尿病モデルマウスを応用した in vivo 検索

糖尿病モデルマウス脈絡叢内皮における TLR2 と TLR4 の発現を確認している。常態組織で TLR2 と TLR4 を発現する細胞は白血球である。そこで糖尿病モデルマウスの脈絡叢毛細血管に発現した TLR2 と TLR4 が TLR リガンドを認識して内皮細胞を活性化する可能性を検討した。

(1) 糖尿病モデルマウスの作製

Streptozotocin(STZ)投与誘発性の腓ラングルハンス島破壊型 1 型糖尿病マウス、KK/Ta・KK/AyJcl マウスを高カロリー餌で飼育した 2 型糖尿病マウスを使用した。

(2) 糖尿病モデルマウスへの TLR リガンドと CML 投与による水頭症発症の検討

糖尿病モデルマウスに、市販のリポ多糖 (*Porphyromonas gingivalis*)、また終末糖化産物 Ne-carboxymethyl-lysine (CML,Toronto Research Chemicals)を投与した (Darveau, Infect Immun 2004;72:5041-5051)。投与群の寿命をカプラン・マイヤー法、ログランク検定、コックス比例ハザードモデルを用いた計算と生存曲線によって、また投与群の空間学習と参照記憶をモリス水迷路、バーンズ迷路によって、非投与群を対照として検定する。マウス脳室の CT 画像の比較、肉眼解剖と脳の HE 組織像、および CD45RA/RO, CD3,CD4,CD8, Mac-1 等の白血球マーカー

一、ならびに IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ とこれらの受容体に関する免疫染色、ELISA によって、TLR リガンドおよび CML 投与群の脳室および脈絡叢の炎症反応を検討した。

2) 培養細胞を応用した in vitro 検索

市販の培養脈絡叢血管内皮細胞と上皮細胞 (Primary Cell)を用いた。CML(Toronto Research Chemicals)を含む種々の AGE 投与による TLR2 と TLR4 の発現の増大、炎症性サイトカインの発現促進、および podoplanin と P-cadherin の発現抑制を Cell ELISA、western-blot と免疫染色によって検索した。TLR リガンド投与による TLR シグナル伝達系・NF- κ B の活性化、またシグナル伝達系阻害剤と抗 TLR 抗体、抗 AGE 抗体による TLR を介した細胞活性化経路のブロック効果を、ゲルシフトアッセイ、NF- κ B 制御ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子分析、リアルタイム PCR、western-blot によって検討した。

平成 2 6 年度以降

2 . 頭頸部 podoplanin コンディショナル KO マウスの脳室拡大と生存率の検討

頭頸部 podoplanin コンディショナル KO マウス (通常の podoplanin KO マウスは胚性致死) について、脳室拡大と生存率を検討した。

1 . KO-first の作製

EUCOMMから購入したPDPNターゲティングベクターによるPDPN KO-firstヘテロとPDPN^{fl/+}マウスの作製をトランスジェニック

ク(TG)社に依頼した。

< EUCOMMのターゲティングベクター >
5'arm-FRT-(SA-IRES-LacZ-pA)-loxP-(\square -actin promoter-Neo-pA)-FRT-loxP- (floxed PDPN exon3)-loxP- は、カセット-(SA-IRES-LacZ-pA)-がGene Trap法にてランダムにゲノムに挿入し、首尾よくプロモーター下流の遺伝子領域に挿入された時、その遺伝子は破壊され代わりにLacZが発現する。EUCOMMはこのgene-trap cassetteをターゲティングベクターの共通構造として利用している。gene-trap cassetteにFRTで挟んだNeoによるselection cassetteを接続し、それをFlpで除去した時、Exon3をfloxedしたコンディショナルKOのアリルができる。

2. ヘテロマウスの導入

Gene-trap cassetteがPDPNエクソン3上流のイントロンに入りPDPNエクソン3がloxPでfloxedされたKO-firstのヘテロMm-C57BL/6N(B6)-TgH(PDPN)^{gt(KO-first)}をTG社から導入、PDPN全身KOのホモマウス(生下時致死)を作成した。

3. 神経堤細胞PDPNコンディショナルKOマウスの作出

1) PDPNエクソン3がfloxedされたB6-TgH(PDPN^{fl/+})をTransgenic社から導入、B6-TgH(PDPN)^{fl/fl}を作成する。Cre発現マウス Mm-C57BL/6J (B6)xCBA/J-TgN (Wnt1-Cre)

【 <http://cre.jax.org/Wnt1Gal4/Wnt1Gal4Craniofacial.html> 】 【 B6.Cg-Tg(Wnt1-cre)11Rth

Tg(Wnt1-GAL4)11Rth/J】を交配し、コンディショナルKOマウスヘテロMm-C57BL/6NJxCBA/J-TgHN(PDPN^{□/+};Wnt1-cre)を作成、Mm-B6-TgH(PDPN)^{fl/fl}と交配させ交雑系頭部PDPNコンディショナルKOMマウス Mm-C57BL/6NJxCBA/J-TgH(PDPN^{□/□};Wnt1-Cre)を作成した。

2) Mm-B6-TgH(R26R)

【 <http://cre.jax.org/R26RControls/R26RCntrls.html> 】 【 B6.129S4-Gt(Rosa)26Sortm1Sor/J (JAX#003309) 】 を Mm-B6xCBA-TgN (Wnt1-Cre)と交配、Wnt1-Cre reporter mouse Mm-B6xCBA-TgNH(Wnt1-Cre;R26R)を作成する。R26RマウスはloxP-stop-loxP-lacZ(大腸菌)がRosa26遺伝子プロモーター下にノックインされており、Wnt1-Cre;R26Rは神経堤細胞の遺伝子欠損=Cre発現をlacZでレポートする。R26Rマウスは受精卵へのインジェクションで作製するトランスジェニックマウスではなくESから相同組換えで作製するノックインマウスで、マウスRosa26遺伝子座はノックインに汎用され、プロモーター特異性はコピキタスである。Mm-B6xCBA-TgNH(Wnt1-Cre;R26R)を作成後、Mm-B6-TgH(PDPN)^{fl/fl}と交配させて神経堤細胞がPDPNをヘテロで欠損(Cre=lacZ発現)する Mm-B6xCBA-TgHNH(PDPN^{□/+};Wnt1-Cre;R26R)を作成する。さらにB6-TgH(PDPN)^{fl/fl}と交配させ神経堤細胞PDPNコンディショナルKOマウス Mm-B6xCBA-TgHNH(PDPN^{□/□};Wnt1-Cre;R26R)を作成、humane

endpointに注意し週令ごとに頸椎脱臼による安楽死で頭部を採取する。

人権の保護及び法令等の遵守への対応

福岡歯科大学倫理審査委員会承認 207号・DNA 実験安全管理委員承認 R12011号、動物実験委員会承認 10023号、遺伝子組換え生物安全委員会(第二種使用等拡散防止措置)承認 11003号

4. 研究成果

本研究では、streptozotocin 誘発性の膵ランゲルハンス島破壊型 I 型糖尿病マウスと KK/Ta-Jcl マウスを高カロリー餌で飼育した II 型糖尿病マウスについて、脳室脈絡叢上皮細胞、および脳室上衣細胞における P-cadherin と podoplanin の発現が減少することを見出した。さらに本研究では、P-cadherin と podoplanin の抗体を定期的に腹腔投与した糖尿病マウスが、同様に投与した健常マウスの全生存期間内に、全マウスが、生活活性がストレス行動によって humane endpoint に達した。また糖尿病マウス脳では、脳室脈絡叢上皮細胞における炎症性サイトカイン IL-1, IL-6 と TNF- α の産生が観察され、これらは健常マウスでは見られなかった。健常マウス脳では、P-cadherin が脈絡叢上皮細胞の外側、および脳室上衣細胞に強く発現する。また、N-cadherin が脳室上衣細胞に強く発現する。そして podoplanin が脈絡叢上皮細胞の内側に発現する。P-cadherin と podoplanin は細胞接着と細胞骨格形成に寄与する分子で、脳脊髄液脳関門の形成に貢献すると考えられている。糖尿病では、N-cadherin などと協調して働く P-cadherin が減少することで、隣接する上皮細胞同士の接着

機能が低下すること、さらに podoplanin の発現が減少することで、細胞骨格の伸展とバリア形成機能が低下することで、脳脊髄液脳関門の形成が損なわれる可能性が考えられた。従って、糖尿病性脳は、P-cadherin と podoplanin の発現異常によって水頭症など脳脊髄液脳関門の異常に基づく脳疾患が引き起こされる可能性が考えられた。

また、この研究を大きく進展させる podoplanin ノックアウトマウスの樹立に成功した。まず、podoplanin ターゲティングベクターを EUCOMM から購入、ノックアウト胚を作製、podoplanin KO1st を作出した。このホモマウスは生下時致死で、肺胞 I 型上皮が II 型上皮から発生しないことによる肺胞形成不全が原因であることがわかった。podoplanin を発現している腎、脳室、神経系、骨などその他の器官に異常は、少なくとも胎児では見られなかった。次いで podoplanin exon3 をフロックしたマウスを作製し、wnt1-Cre マウスと交配させて神経堤外胚葉の podoplanin をコンディショナルに KO したところ、象牙芽細胞における podoplanin の発現は見られなかったが、歯の発生にフェノタイプは出現しなかった。現在、podoplanin フロックホモマウスと nestin-Cre マウスを交配させて、脳神経系のグリア細胞における podoplanin のコンディショナルノックアウトマウスを作出している。

5. 主な発表論文等 〔論文〕(計1件)

1. Takara K, Maruo N, Oka K, Kaji C, Hatakeyama Y, Sawa N, Kato Y, Yamashita J, Kojima H, Sawa Y. Morphological study of tooth development in podoplanin-deficient

mice. PLoS One. 2017;12(2):e0171912.

〔学会発表〕(計2件)

国際学会

1. **Kaji, C.**, Takara, K., Hatakeyama, Y., Kojima, H., Sawa, Y. The distribution of podoplanin in the tooth and craniofacial bone. 94th International Association of Dental Research, Seoul, JUN 2016. J. Dent. Res. 94(S).
2. Takara, K., **Kaji, C.**, Hatakeyama, Y., Kojima, H., Sawa, Y. The morphological investigation of head and neck organs in the systemic podoplanin knockout mice. 94th International Association of Dental Research, Seoul, JUN 2016. J. Dent. Res. 94(S).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加地千晶 (KAJI, Chiaki)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：60707214